

**ESTUDOS POR ANCORAMENTO E
DINÂMICA MOLECULAR DE POTENCIAIS
INIBIDORES DA NUCLEOSÍDEO
HIDROLASE DE
*Bacillus anthracis***

ANA PAULA GUIMARÃES

2010

ANA PAULA GUIMARÃES

**ESTUDOS POR ANCORAMENTO E DINÂMICA MOLECULAR DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA NUCLEOSÍDEO HIDROLASE DE
*Bacillus anthracis***

Dissertação apresentada á Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Guimarães, Ana Paula.

Estudos por ancoramento e dinâmica molecular de potenciais
inibidores da Nucleosídeo Hidrolase de *Bacillus anthracis* / Ana
Paula Guimarães. – Lavras : UFLA, 2010.

170 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. Agentes de guerra biológica. 2. Defesa. 3. Antraz. 4.
Fármacos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 615.19

ANA PAULA GUIMARÃES

**ESTUDOS POR ANCORAMENTO E DINÂMICA MOLECULAR DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA NUCLEOSÍDEO HIDROLASE DE
*Bacillus anthracis***

Dissertação apresentada á Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de janeiro de 2010.

Prof. Dr. Tanos Celmar Costa França IME

Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas UFLA

Dr. Arlan da Silva Gonçalves UFRJ

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Estou profundamente grata,

Primeiramente a Deus, pela vida e esperança, pelo aprendizado, coragem e crescimento, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Instituto Militar de Engenharia, pela oportunidade da realização deste trabalho.

Aos professores Teodorico de Castro Ramalho, Elaine F. F. da Cunha e Tanos Celmar Costa França, pela orientação, paciência, ensinamentos e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Química Computacional, pela convivência saudável, amizade e cooperação.

Aos meus pais, Edna e Luiz, e meus irmãos, por todo amor, exemplos de coragem, dignidade e perseverança.

Ao meu namorado, Helvécio Júnior, pelo carinho e compreensão.

Aos meus amigos e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, à Capes e ao Ministério da Defesa (Edital CAPES/PRODEFESA 2008), e a FAPERJ, pelo financiamento dos recursos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Agentes de guerra biológica.....	3
2.2 Aspectos históricos.....	4
2.3 Antraz.....	8
2.4 A nucleosídeo hidrolase (NH)	11
2.5 Modelagem molecular.....	15
2.6 Ancoramento molecular.....	17
2.7 Mecânica molecular.....	19
2.8 Otimização da estrutura.....	22
2.8.1 Método do máximo declive.....	23
2.8.2 Método dos gradientes conjugados.....	23
2.9 Dinâmica molecular.....	24
3 OBJETIVOS.....	27
4 METODOLOGIA.....	28
4.1 Inibidores de NH estudados.....	28
4.2 Ancoramento dos inibidores.....	33
4.3 Procedimento utilizado para o ancoramento molecular.....	33
4.4 Dinâmica molecular.....	34
4.5 Análise de estruturas e geração de figuras e gráficos.....	36

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Estudos por ancoramento molecular.....	37
5.2 Estudos por dinâmica molecular	79
5.2.1 Análise dos gráficos de variação da energia total	80
5.2.2 Análise dos gráficos de desvio padrão.....	81
5.2.3 Análise do comportamento dinâmico dos inibidores.....	86
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
APÊNDICES.....	131
Apêndice A – Parametrização dos inibidores.....	131
Apêndice B – Programas do pacote GROMACS 4.0.....	131
B.1 Construindo os arquivos de entrada.....	132
B.1.1 Inserindo íons para equilibrar a carga do sistema.....	132
B.2 Minimização de energia e dinâmica molecular.....	133
B.3 Procedimento para a análise de resultados de dinâmicas.....	135
B.4 Conteúdo dos arquivos de parâmetros .mdp.....	137
Apêndice C – Gráficos de energia total.....	141
Apêndice D – Gráficos de distância.....	148

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Mecanismo enzimático da hidrólise da inosina catalisada pelas NHs.....	14
FIGURA 2	Estrutura da <i>Ba</i> NH extraída do PDB (código 2C40). A ribose é representada em amarelo, o cofator Ca^{2+} é a esfera cinza, as α -hélices estão em vermelho e as folhas β em azul.....	34
FIGURA 3	Volume da cavidade da <i>Ba</i> NH com a ribose e o cofator Ca^{2+}	37
FIGURA 4	Correlação entre os valores de constante de inibição e Energia Intermolecular obtida com o Ancoramento Molecular para os inibidores do grupo 1.....	42
FIGURA 5	Correlação entre os valores de constante de inibição e Energia Intermolecular obtida com o Ancoramento Molecular para os inibidores do grupo 2, descritos por Goeminne (Goeminne et al., 2008a; Goeminne et al., 2008b).....	43
FIGURA 6	Correlação entre os valores constante de inibição e Energia Intermolecular obtida com o Ancoramento Molecular para os inibidores do grupo 2, descritos por Boutellier. (Boutellier et al.,1994).....	43
FIGURA 7	Correlação entre os valores de constante de afinidade e Energia Intermolecular obtida com o Ancoramento Molecular para os substratos inosina, uridina e adenosina.....	46

FIGURA 8	Superfície eletrostática gerada em torno do sítio ativo da <i>BaNH</i> . Em vermelho são representadas as regiões hidrofílicas, em azul as regiões hidrofóbicas e em verde a cavidade.....	47
FIGURA 9	Ligações hidrogênio entre a inosina (A) e a uridina (B) e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	48
FIGURA 10	Sobreposição da uridina (A) e inosina (B), após o ancoramento, A ribose é representada em amarelo, inosina e uridina em verde, as regiões hidrofílicas em vermelho e as hidrofóbicas em azul.....	49
FIGURA 11	Ligações hidrogênio entre a adenosina e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	50
FIGURA 12	Sobreposição do composto 1 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	53
FIGURA 13	Ligações hidrogênio entre o composto 2 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	54
FIGURA 14	Sobreposição do composto 2 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	55
FIGURA 15	Ligações hidrogênio entre o composto 3 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	56

FIGURA 16	Sobreposição do composto 3 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	56
FIGURA 17	Ligação hidrogênio entre o composto 4 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	57
FIGURA 18	Sobreposição do composto 4 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	58
FIGURA 19	Orientação dos ligantes 3 (A) e 4 (B), após o ancoramento no sítio ativo da <i>BaNH</i> . Em vermelho regiões hidrofílicas e em azul regiões hidrofóbicas.....	59
FIGURA 20	Ligação hidrogênio entre o composto 5 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	60
FIGURA 21	Ligação hidrogênio entre o composto 6 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	61
FIGURA 22	Orientação do composto 6 após o ancoramento no sítio ativo da <i>BaNH</i> , em vermelho regiões hidrofílicas em azul regiões hidrofóbicas e em verde a cavidade.....	62
FIGURA 23	Sobreposição do composto 6 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	63
FIGURA 24	Ligação hidrogênio entre o composto 7 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	64
FIGURA 25	Sobreposição do composto 7 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	65

FIGURA 26	Ligação hidrogênio entre o composto 8 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	66
FIGURA 27	Sobreposição do composto 8 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	67
FIGURA 28	Ligação hidrogênio entre o composto 9 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	68
FIGURA 29	Sobreposição do composto 9 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	69
FIGURA 30	Ligação hidrogênio entre o composto 10 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	70
FIGURA 31	Sobreposição do composto 10 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	71
FIGURA 32	Orientação do composto 10 após o ancoramento no sítio ativo da <i>BaNH</i> , em vermelho regiões hidrofílicas em azul regiões hidrofóbicas e em verde a cavidade.....	72
FIGURA 33	Ligação hidrogênio entre o composto 11 e os aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	73
FIGURA 34	Sobreposição do composto 11 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	74
FIGURA 35	Orientação do composto 11 após o ancoramento no sítio ativo da <i>BaNH</i> , em vermelho regiões hidrofílicas em azul regiões hidrofóbicas e em verde a cavidade.....	75
FIGURA 36	Ligação hidrogênio entre o composto 12 e os	

	aminoácidos do sítio ativo da <i>BaNH</i>	76
FIGURA 37	Sobreposição do composto 12 (verde) após o ancoramento, em amarelo a base ribose. Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.....	77
FIGURA 38	Orientação do composto 12 após o ancoramento no sítio ativo da <i>BaNH</i> , em vermelho regiões hidrofílicas em azul regiões hidrofóbicas e em verde a cavidade.....	78
FIGURA 39	Variação da energia total para o sistema <i>BaNH</i> /inibidor 1.....	80
FIGURA 40	Variação DRMQ temporal para a simulação <i>BaNH</i> /inibidor 12. A curva da enzima é representada em preto e a do inibidor em vermelho.....	82
FIGURA 41	Variação DRMQ espacial para a simulação <i>BaNH</i> /inibidor 12, em preto a variação da <i>BaNH</i> , em vermelho a cadeia principal e em verde a cadeia lateral.....	85

FIGURA 42	Ilustração qualitativa do DRMQ espacial para o sistema <i>BaNH</i> /inibidor 12. Quanto maior a espessura do tubo maior o DRMQ. O ligante foi omitido na figura.....	85
FIGURA 43	Quadros da dinâmica molecular da inosina no sítio ativo da <i>BaNH</i>	88
FIGURA44	Número de ligações hidrogênio formadas entre a inosina e a <i>BaNH</i>	89
FIGURA 45	Quadros da dinâmica molecular da uridina no sítio ativo da <i>BaNH</i>	89
FIGURA 46	Número de ligações hidrogênio formadas entre a uridina e a <i>BaNH</i>	90
FIGURA 47	Quadros da dinâmica molecular do composto 1 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	91
FIGURA 48	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 1 e a <i>BaNH</i>	91
FIGURA49	Quadros da dinâmica molecular do composto 2 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	93
FIGURA 50	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 2 e a <i>BaNH</i>	93
FIGURA 51	Quadros da dinâmica molecular do composto 3 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	95
FIGURA 52	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 3 e a <i>BaNH</i>	95
FIGURA 53	Quadros da dinâmica molecular do composto 4 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	97

FIGURA54	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 4 e a <i>BaNH</i>	97
FIGURA 55	Quadros da dinâmica molecular do composto 5 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	98
FIGURA 56	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 5 e a <i>BaNH</i>	99
FIGURA57	Quadros da dinâmica molecular do composto 6 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	101
FIGURA 58	Interações causadas pelo efeito hidrofóbico entre o composto 6 e o Trp238 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	101
FIGURA 59	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 6 e a <i>BaNH</i>	102
FIGURA 60	Quadros da dinâmica molecular do composto 7 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	103
FIGURA 61	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 7 e a <i>BaNH</i>	104
FIGURA 62	Quadros da dinâmica molecular do composto 8 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	105
FIGURA 63	Interações causadas pelo efeito hidrofóbico entre o composto 8 e os resíduos Trp238 e Trp77 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	106
FIGURA 64	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 8 e a <i>BaNH</i>	107
FIGURA 65	Quadros da dinâmica molecular do composto 9 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	109

FIGURA 66	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 9 e a <i>BaNH</i>	109
FIGURA 67	Quadros da dinâmica molecular do composto 10 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	110
FIGURA 68	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 10 e a <i>BaNH</i>	111
FIGURA 69	Quadros da dinâmica molecular do composto 11 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	112
FIGURA 70	Interações causadas pelo efeito hidrofóbico entre o composto 11 e os resíduos Trp238 e Trp172 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	113
FIGURA 71	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 11 e a <i>BaNH</i>	113
FIGURA 72	Quadros da dinâmica molecular do composto 12 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	115
FIGURA 73	Interações causadas pelo efeito hidrofóbico entre o composto 12 e o Trp238 no sítio ativo da <i>BaNH</i>	116
FIGURA 74	Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 12 e a <i>BaNH</i>	116

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Estrutura dos inibidores de NH estudados no presente trabalho com os respectivos valores de K_i	29
TABELA 2	Estruturas dos substratos naturais das NHs estudados no presente trabalho com os respectivos valores de K_M	32
TABELA 3	Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a enzima <i>BaNH</i> , os valores de energia intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol), e os valores de K_i (μM) (Goeminne et al., 2008a, 2008b).....	38
TABELA 4	Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a enzima <i>BaNH</i> , os valores de energia intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol), e os valores de K_i (μM) (Boutellier et al., 1994).....	41
TABELA 5	Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os substratos naturais das NHs e a enzima <i>BaNH</i> , os valores de energia intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol) e os valores de K_M (μM) (Versées, et al., 2002).....	44
TABELA 6	Aminoácidos pertencentes aos sítios ativos da <i>BaNH</i> e da <i>TvNH</i> . Os aminoácidos iguais são representados em	

preto, os semelhantes em vermelho e os diferentes em
roxo.....

51

TABELA 7	Médias dos DRMQ temporais e desvios médios tomados ao longo de cada sistema simulado.....	83
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Å	Angstrom
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato ou ácido aspártico, dependendo do pH
ATCC	Do inglês “American Type Culture Collection”
BaNH	Nucleosídeo hidrolase de <i>Bacillus anthracis</i>
Cf-IUNH	Inosina-uridina nucleosídeo hidrolase da <i>C. fasciculata</i>
DM	Dinâmica molecular
DRMQ	Desvio da raiz média quadrática
EsIE	Escola de instrução especializada
EUA	Estados Unidos da América
CPAB	Convenção para Prevenção de Armas Biológicas
CPAQ	Convenção para Prevenção de Armas Químicas
FDA	Do inglês “Food and Drug Administration”
fs	Fentossegundos
cg	Do inglês “conjugate gradients”
Glu	Glutamato ou ácido glutâmico, dependendo do pH
Gly	Glicina
GROMACS	<i>GROningen MACHine for Chemical Simulation</i>
GROMOS	<i>GROningen MOlecular Simulation</i>
HF	Hartree-fock
His	Histidina
IAGNH	Inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase
IU-BaNH	Inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de <i>Bacillus anthracis</i>
IUNH	Inosina-uridina nucleosídeo hidrolase
IUPAC	Do inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry”
LdNH	Nucleosídeo hidrolase de <i>L. donovane</i>
LmNH	Nucleosídeo hidrolase de <i>L. major</i>
K	Kelvin
K _i	Constante de inibição
l-bgps	<i>quasi</i> Newton rapsom
Leu	Leucina
LQC	Laboratório de Química Computacional
LMDQB e Biológica	Laboratório de Modelagem Molecular Aplicada à Defesa Química
Lys	Lisina
MM	Mecânica molecular
MDV	Molegro virtual docker
NH	Nucleosídeo hidrolase

NHs	Nucleosídeo hidrolases
nm	Nanômetro
NNH	Nucleosídeo hidrolase não específica
NNHs	Nucleosídeo hidrolase não específicas
ns	Nanossegundos
pAPIR	p-aminofenil-(1 <i>S</i>)-iminoribitol
PDB	Protein Data Bank
Phe	Fenilalanina
ps	Picossegundos
RMN	Ressonância magnética nuclear
SNH	Nucleosídeo hidrolase específica
<i>Tbb</i> -IAGNH	inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase de <i>T. brucei</i>
<i>brucei</i>	
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
<i>Tv</i> -IAGNH	Inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de <i>T. vivax</i>
<i>Tv</i> NH	Nucleosídeo Hidrolase de <i>T. vivax</i>
Val	Valina
µm	Micrômetro
UCP	Unidade central de processamento.

RESUMO

GUIMARÃES, Ana Paula. **Estudos por ancoramento e dinâmica molecular de potenciais inibidores da nucleosídeo hidrolase de *Bacillus anthracis***. 2010. 170 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras¹.

A enzima nucleosídeo hidrolase (NH) se encontra largamente distribuída na natureza e, por não ter sido encontrada ainda em mamíferos, tem sido vista como um alvo ideal para a quimioterapia seletiva de doenças parasitárias e infecções bacterianas como o antraz. Apesar da disponibilidade de quimioterapia contra o antraz atualmente, o risco de desenvolvimento de resistência contra esses fármacos está sempre presente. Além disso, é muito provável que esses fármacos sejam ineficientes contra cepas geneticamente modificadas do *Bacillus anthracis*. Portanto, considerando o risco que esse agente de guerra biológica representa hoje em dia, é imperativa a busca por novos fármacos, bem como novos alvos moleculares para o desenvolvimento de quimioterapia contra o *B. anthracis*. Com base nisso, foram realizados, no presente trabalho, estudos por ancoramento molecular, visando analisar o posicionamento tridimensional de 12 inibidores conhecidos da NH de *Trypanosoma vivax* (TvNH) no sítio ativo da NH de *B. anthracis* (BaNH), assim como as principais interações desses compostos com os aminoácidos do sítio ativo da BaNH, e também avaliar os fatores relevantes para a atividade biológica de tais compostos. Posteriormente, foram realizadas simulações por dinâmica molecular (DM) para checar os resultados do ancoramento e selecionar os compostos mais promissores como *lead compounds* para o planejamento de potenciais inibidores para a BaNH. Os resultados de ancoramento, além de corroborar com os de dinâmica, sugerem uma boa correlação com os resultados experimentais dos ligantes. Também foi observado que os inibidores de TvNH podem vir a ser excelentes inibidores da BaNH.

PALAVRAS CHAVE: nucleosídeo hidrolase, *Bacillus anthracis*, ancoramento molecular, dinâmica molecular, defesa contra agentes de guerra biológica.

¹ Orientador: Teodorico de Castro Ramalho - UFLA

ABSTRACT

GUIMARÃES, Ana Paula. **Docking and molecular dynamics studies of potential inhibitors of nucleoside hydrolase from *Bacillus anthracis***. 2010. 170 p. Dissertation (Master in Agrochemistry) – Universidade Federal de Lavras, Lavras².

The enzyme nucleoside hydrolase (NH) is largely found in nature but not in mammals being, for this reason, seen as an ideal target to selective chemotherapy against parasitic diseases and bacterial infections like anthrax. Despite of availability of chemotherapy against anthrax today, the risk of resistance emergence is always present. Besides, it is likely that this drug be inefficient against genetically modified strains of *Bacillus anthracis*. So, considering the risk represented by anthrax today, as a chemical warfare agent, it is mandatory the search for new drugs against *B. anthracis*. In line with this, we performed in the present work, molecular docking studies in order to analyze the tridimensional positioning of 12 known inhibitors *Trypanosoma vivax* NH (*TvNH*) in the active site of *B. anthracis* NH (*BaNH*), as well as the main interactions of these compounds with aminoacids of the *BaNH* active site, and, also, to evaluate the relevant factors to the biological activity of such compounds. Further, we performed Molecular Dynamics (MD) simulations in order to check the docking results and select the most promising inhibitors as lead compounds to the design of potential inhibitors to *BaNH*. Docking results, besides corroborating with the MD simulations, suggested a good correlation with experimental results. We also observed that *TvNH* inhibitors could, as well, be excellent *BaNH* inhibitors.

KEYWORDS: Nucleoside hydrolase, *Bacillus anthracis*, molecular docking, molecular dynamics, biological warfare defense.

² Adviser: Teodorico de Castro Ramalho - UFLA

1 INTRODUÇÃO

Os agentes biológicos de guerra consistem de microrganismos vivos ou suas toxinas, quando empregados como armas. Podem ser bactérias, vírus, fungos, protozoários e toxinas e não necessariamente têm como alvo o ser humano. Um agente biológico pode ser utilizado contra animais ou contra plantações, por exemplo. Sua utilização em guerras é reportada desde os tempos da Grécia e da Roma antigas, quando seu impacto ainda era relativamente limitado, em relação aos tempos atuais, devido ao conhecimento restrito da época.

Com os avanços tecnológicos advindos da Revolução Industrial, aliados aos avanços do conhecimento na área de biotecnologia, a produção desses agentes em larga escala e com uma letalidade muito maior, passou a ser viável e acessível. Isso fez com que esses agentes passassem a representar um risco sério à segurança mundial, principalmente após a Segunda Guerra mundial, quando as nações passaram a se preparar para ataques com agentes biológicos em larga escala.

Desde a década de 1950, os Estados Unidos da América (Parkinson et al., 2003), a Rússia e as potências europeias possuem programas de defesa biológica envolvidos em pesquisas, com o objetivo de desenvolver medidas defensivas contra ataques desse tipo. Todos os anos, o governo dos EUA gasta centenas de milhões de dólares em seus programas de biodefesa, com o objetivo de preparar o país para um ataque biológico que eles têm certeza que não tardará a acontecer (Lindler et al., 2005).

No Brasil, a pesquisa em defesa biológica ainda está em seu estágio inicial. Em termos de unidade de pronto emprego para resposta a ataques biológicos o país dispõe apenas da Companhia de Defesa Química, Biológica e

Nuclear (Cia Def QBN), instalada na Escola de Instrução Especializada (EsIE) do Exército Brasileiro, localizada no Rio de Janeiro (França et al., 2008a).

No presente trabalho, foi realizado um estudo por modelagem molecular de potenciais fármacos contra um dos mais importantes agentes de guerra biológica: o *Bacillus anthracis*, a bactéria esporulante causadora do antraz, doença infecciosa altamente letal, muito comum em animais domésticos e selvagens, mas que também pode infectar humanos (Parkinson et al., 2003). O antraz já foi utilizado para fins de guerra biológica, tanto por militares como por grupos terroristas e é comum em regiões agrícolas em todo o mundo, onde infecta normalmente animais (Lindler et al., 2005).

Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas na busca de novos fármacos contra o antraz. O tratamento consiste do uso de penicilinas. A ciprofloxacina é utilizada para o tratamento e a profilaxia, sendo o único medicamento aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, capaz de combater a infecção por antraz na forma pulmonar, que é a mais perigosa. O uso dos antibióticos deve ser iniciado o mais rápido possível, pois o tratamento após o desenvolvimento dos sintomas graves pode não ser efetivo (Sousa et al., 2004).

Diante do exposto, evoca-se a necessidade do planejamento de novos fármacos que poderão propiciar grandes avanços no tratamento do antraz.

Este trabalho faz parte de um projeto maior entre o Laboratório de Química Computacional (LQC), da Universidade Federal de Lavras e o Laboratório de Modelagem Molecular Aplicada à Defesa Química e Biológica (LMDQB), do Instituto Militar de Engenharia, financiado pelo programa Capes/Prodefesa. O objetivo principal desse projeto é propor e estudar novos alvos moleculares para o planejamento, síntese e testes de atividade biológica de novos potenciais agentes protetores contra os principais microrganismos empregados como agentes de guerra biológica.

A compreensão das interações específicas entre ligantes e os seus receptores auxilia no conhecimento das razões moleculares da atividade dos ligantes. Assim, com a realização de estudos por ancoramento e dinâmica molecular será possível o conhecimento das principais interações entre os potenciais inibidores com o sítio ativo da enzima *BaNH*, bem como avaliar o comportamento dinâmico desses inibidores, com a finalidade de planejar novos e/ou mais eficientes inibidores da *BaNH*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agentes de guerra biológica

Os agentes biológicos de guerra consistem de microrganismos vivos ou suas toxinas, quando empregados como armas. Os agentes clássicos são bactérias, vírus, fungos, protozoários e toxinas. Estas últimas, em particular, por se tratarem de substâncias químicas tóxicas, são incluídas tanto na categoria de armas químicas como biológicas, sendo banidas tanto pela Convenção para Prevenção de Armas Químicas (CPAQ) (<http://www.opcw.org/>) quanto pela Convenção para Prevenção de Armas Biológicas (CPAB) (<http://www.opbw.org/>). As armas biológicas são fundamentalmente diferentes das químicas, no que diz respeito às seguintes características:

- 1 - habilidade do microrganismo em se reproduzir no hospedeiro;
- 2 - efeito retardado. Os sintomas resultantes da contaminação por um microrganismo aparecem apenas após um período específico para cada agente, conhecido como período de incubação, dificultando a identificação da origem de um ataque;

3 - a inexistência, atualmente, de detectores biológicos com as mesmas capacidades dos detectores químicos (portáteis, confiáveis e rápidos), dificultando a identificação de um ataque biológico antes que seus efeitos se espalhem;

4 - impacto psicológico ainda maior que o das armas químicas;

5 - relativa simplicidade e baixo custo de produção;

6 - possibilidade de disseminação por meio de animais e insetos (vetores) (Taylor & Taylor, 1992; Sidell et al., 1997; França et al., 2008a).

A produção de agentes biológicos, tal como a de agentes químicos, não oferece grandes obstáculos técnicos, sendo ainda mais simples e barata. A cultura desses agentes em laboratório é feita por técnicas básicas de microbiologia, utilizando materiais de amplo emprego e fácil aquisição. Amostras desses microrganismos são rotineiramente comercializadas para fins de pesquisa de vacinas e medicamentos, podendo também, em certos casos, ser obtidas diretamente de animais infectados na natureza (França et al., 2008a).

A defesa civil contra um ataque terrorista, ou mesmo convencional, por agentes biológicos é complicada por uma variedade de fatores. Equipes civis de emergência, geralmente, não possuem equipamentos de proteção e detecção, nem são treinadas especificamente para a resposta a esse tipo de incidente. No caso específico de agentes biológicos, a identificação de um ataque é complicada pela inexistência de detectores com desempenho satisfatório e pelo período de incubação da doença, que dificulta a determinação da origem do ataque. Além disso, nem sempre é possível distinguir entre um ataque biológico e uma epidemia natural (França et al., 2008a).

2.2 Aspectos históricos

O emprego de armas biológicas não é um fenômeno recente. Essas armas têm sido utilizadas desde a antiguidade. Como exemplos de táticas de

guerra biológica antiga, podem-se citar o envenenamento da água com cadáveres coléricos ou contaminados com a peste bubônica, prática muito frequente nas guerras da Idade Média (Wheelis, 2002; Frischknecht, 2003; França et al., 2008a) e a disseminação de varíola entre os nativos da América Latina pelos espanhóis, durante o século XV (Frischknecht, 2003; França et al., 2008a). Durante o século XX, as táticas de guerra biológica se tornaram mais sofisticadas. Existem ainda vários relatos de uso de armas biológicas pelos alemães durante a Primeira Guerra mundial (Moon, 1999; Tascheto, 2002; França et al., 2008a), os quais incluem tentativa de exportar gado e cavalos contaminados com *Bacillus anthracis* (o agente causador do antraz) e *Pseudomonas pseudomallei* para os EUA e outros países; tentativa de espalhar cólera na Itália e peste-negra em São Petersburgo, na Rússia, além de frutas, chocolates, biscoitos e brinquedos contaminados atirados sobre cidades da Romênia, como Bucareste. Todas as alegações foram negadas pelos alemães e não há provas conclusivas de nenhum desses relatos (Harris, 2002; Tascheto, 2002; França et al., 2008a).

Durante a Segunda Guerra mundial e até o início dos anos 1970, surgiram várias acusações de uso de armas biológicas contra Japão, Alemanha, Inglaterra e EUA. Com exceção dos japoneses, nenhuma dessas acusações foi realmente comprovada. O Japão foi acusado de lançar pulgas contaminadas com peste bubônica sobre onze cidades chinesas, o que causou uma epidemia nunca antes registrada naqueles locais. O Japão também possuía em seu exército duas unidades dedicadas às armas biológicas (Harris, 2002; Tascheto, 2002; França et al., 2008a). A primeira, chamada de unidade 731, usou prisioneiros de guerra como cobaias para experimentos com antraz, botulismo, brucelose, cólera, disenteria, gangrena gasosa, infecções meningocócicas, peste bubônica e tetrodoxina. Acredita-se que cerca de 3.000 prisioneiros de guerra coreanos, mongóis, americanos, soviéticos, ingleses e australianos morreram durante

experimentos ou foram executados quando não eram mais necessários. A outra unidade, batizada de unidade 100, era responsável pela construção de armas biológicas. Ao final da guerra, vários pesquisadores que trabalhavam nesta unidade foram anistiados pelos EUA, em troca de resultados e dados das pesquisas conduzidas por eles (Harris, 1992, 2002; Frischknecht, 2003; França et al., 2008a).

As pesquisas médicas alemãs, durante a Segunda Guerra mundial, incluíram a infecção deliberada de prisioneiros com *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia mooseri*, o vírus da hepatite A e protozoários causadores da malária. Porém, ao final da guerra, não houve qualquer acusação formal contra a Alemanha, nesse sentido (Leitenberg, 2001; Tascheto, 2002; França et al., 2008a). Também nesta época, a Inglaterra iniciou pesquisas para a adaptação de munições para a utilização com cargas biológicas (weaponization). Foram testadas granadas de artilharia contendo esporos de antraz em uma ilha próxima à costa escocesa, a ilha de Gruinard (Tascheto, 2002; Willis, 2002; França et al., 2008a) Para verificar a viabilidade dos esporos, ovelhas eram amarradas em cercas de madeira e as granadas lançadas próximas a elas. Em três dias as ovelhas começaram a morrer. Todavia, apesar dos esforços para a descontaminação, os esporos remanescentes dos testes mantiveram a ilha inabitável por quase 50 anos (Willis, 2002; França et al., 2008a).

Os EUA também mantiveram um programa de armas biológicas e muitos dos padrões de biossegurança utilizados hoje em dia, em laboratórios de nível 3 e 4, foram desenvolvidos no forte Detrick, onde havia uma planta piloto para a produção de agentes biológicos que empregava 3.800 militares e 100 civis, no ano de 1943. Os esforços de produção se concentravam, principalmente, em antraz e toxina botulínica, no entanto, tularemia, brucelose, pseudomonose e psitacose também foram estudados. Agentes que atacam plantas também foram pesquisados e havia planos para dizimar as plantações

japonesas. As pesquisas americanas, nos anos 1940 e 50, envolveram testes de campo que incluíram testes de vulnerabilidade ao ar livre e contaminação de sistemas de distribuição de água urbanos com microrganismos vivos supostamente inofensivos, em várias grandes cidades americanas (Moon, 1999; Tascheto, 2002; França et al., 2008a).

A facilidade de produção dos agentes químicos e biológicos, seu baixo custo e a grande quantidade de informações disponíveis sobre o assunto, inclusive na internet, tornaram esse tipo de arma muito atrativa para grupos terroristas motivados por ideologias de extrema direita, ódio racial, fanatismo religioso ou filosofias apocalípticas (Atlas, 2001; Tascheto, 2002; França et al., 2008a). Embora ainda não tenha sido registrado um ataque terrorista de grandes proporções envolvendo agentes biológicos, muitos especialistas afirmam que é apenas uma questão de tempo, uma vez que é quase impossível evitar um ataque como esses (França et al., 2008a). Tem sido cada vez maior o número de incidentes envolvendo tentativas de aquisição e ou utilização desses agentes. Entre eles, podem-se citar, segundo Tascheto (2002) e França et al. (2008a):

1 - em 1972, foi descoberto, em poder de uma organização chamada “Order of the Rising Sun”, de 30 a 40 kg de culturas da bactéria causadora do tifo, destinados a um ataque aos suprimentos de água de várias cidades norte-americanas;

2 - na década de 1980, a polícia francesa descobriu uma casa, em Paris, utilizada pelo exército vermelho para a cultura e estocagem de *Clostridium botulinum*, microrganismo produtor da toxina botulínica;

3 - vários incidentes foram registrados nos EUA, nas décadas de 1980 e 90, envolvendo tentativas de produção e utilização de ricina por grupos de extrema direita;

4 - em 1984, membros de um grupo religioso no Oregon, EUA, contaminaram 10 restaurantes com *Salmonella typhimurium*, resultando em infecções gastrointestinais (gastroenterite) em 751 pessoas;

5 - em 1995, um militante de extrema direita nos EUA comprou, pelo correio, cultura de peste bubônica da American Type Culture Collection (ATCC), uma empresa especializada na venda de insumos para pesquisa biológica que também forneceu culturas de *Bacillus anthracis* e *Clostridium botulinum* para o Iraque, no início da década de 1980;

6 - em 2001, algumas cartas contaminadas com *Bacillus anthracis* foram postadas nos EUA. Cinco pessoas morreram e, até o momento, o governo norte-americano ainda não identificou os responsáveis.

As opções de emprego de microrganismos e suas toxinas como potenciais agentes de guerra biológica, hoje em dia, são quase inimagináveis. Com os recentes avanços na engenharia genética, tornou-se possível a criação de microrganismos geneticamente modificados muito mais letais que os microrganismos selvagens e para os quais não existe vacina ou terapia disponível. Além disso, também é possível converter um patógeno relativamente inofensivo num agente biológico letal.

2.3 Antraz

O antraz é uma doença infecciosa causada pela bactéria esporulante *Bacillus anthracis*, muito comum em animais domésticos e selvagens (gado, ovelhas, cabras, antílopes e outros herbívoros), mas que pode também contaminar humanos, quando estes são expostos a animais infectados ou tecidos de animais infectados. O *Bacillus anthracis* é uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete, encontrada em muitas partes do mundo e capaz de produzir esporos quase indestrutíveis, resistentes a desinfetantes, ao calor, à desidratação e ao congelamento. Está entre as maiores bactérias patogênicas, medindo de $\frac{1}{4}$

um a 10 µm de comprimento (Sterne, 1967; Dixon et al., 1999; Turnbull, 1996). É mais comum em regiões agrícolas em todo o mundo, onde normalmente infecta animais, incluindo América do Sul e Central, Leste Europeu, Ásia, África, Caribe e Oriente Médio. Os seres humanos são, geralmente, contaminados devido a uma exposição ocupacional a animais infectados ou a seus produtos. A infecção com *Bacillus anthracis* é pouco frequente na maioria dos países desenvolvidos, mas é onipresente em países cujas economias dependem da agricultura e da agropecuária (Lindler et al., 2005).

A infecção por antraz pode ocorrer de três formas: cutânea, por inalação ou gastrointestinal. Os esporos de *Bacillus anthracis* podem sobreviver no solo por muitos anos e os humanos podem se contaminar por meio do manejo de animais infectados ou da inalação de esporos a partir de produtos animais contaminados. A disseminação pode ocorrer também por meio da carne mal cozida de animais. Os sintomas variam dependendo da forma de antraz contraída, mas, normalmente, começam em torno de 7 dias após a exposição (Lindler et al., 2005).

No caso do antraz cutâneo, a maior parte das infecções (em torno de 95%) ocorre quando a bactéria entra, através de um corte ou abrasão, na pele. A infecção na pele começa como uma mancha vermelha, que lembra uma picada de inseto, mas, por volta de 1 a 2 dias, se forma uma vesícula e, depois, uma úlcera indolor, usualmente com 1 a 3 cm de diâmetro, com uma área preta necrótica em seu centro. Glândulas linfáticas em regiões adjacentes podem inflamar. Em torno de 20% dos casos não tratados de antraz cutâneo resultam em morte (Dixon et al., 1999).

Quando a contaminação por antraz se dá por inalação, os sintomas iniciais lembram um resfriado comum e, após vários dias, podem evoluir para sérios problemas respiratórios e choque. A inalação de antraz é, normalmente, fatal (Dixon et al., 1999).

A forma gastrointestinal do antraz pode ocorrer após ingestão de carne contaminada e é caracterizada por uma inflamação aguda do trato gastrointestinal. Os sinais iniciais são náusea, perda de apetite, febre seguida de dor abdominal, vômito de sangue e diarreia severa. O antraz gastrointestinal resulta em morte em 25% a 60% dos casos (Dixon et al., 1999).

O *Bacillus anthracis* já foi utilizado para fins de guerra biológica tanto por militares como por grupos terroristas. Esporos foram transformados em armas (*weaponized*), pelos EUA, nas décadas de 1950 e 1960; a Inglaterra realizou experimentos com esta bactéria na ilha de Gruinard, na década de 1950, conforme descrito anteriormente e o Iraque admitiu ter realizado pesquisas, em 1991 e 1995, visando o uso ofensivo desse microrganismo. Além disso, o *Bacillus anthracis* foi enviado em cartas para membros do governo americano logo depois dos atentados terroristas de 11 de setembro de 2001. O *Bacillus anthracis* pode ser produzido na sua forma úmida ou seca e, então, estabilizado para *weaponization* e a sua disseminação pode ser feita por aerossol. Estima-se que um ataque em larga escala em uma grande cidade, como Nova York, possa causar milhares de vítimas (Lindler et al., 2005).

Para a quimioterapia do antraz, normalmente, se utiliza penicilina, mas também podem ser utilizados a eritromicina, a tetraciclina ou o cloramfenicol. Contudo, o tratamento com esses fármacos só é efetivo se iniciado logo no início dos primeiros sintomas (<http://www.saudeanimal.com.br/antraz.htm>). A vacina contra o antraz está disponível apenas para pessoas que ocupam cargos de alto risco e protege 93% contra o antraz cutâneo (<http://www.saudeanimal.com.br/antraz.htm>).

Embora haja quimioterapia disponível para o tratamento do antraz hoje em dia, o risco de desenvolvimento de resistência contra esses fármacos está sempre presente. Além disso, é também muito provável que estes fármacos sejam ineficientes contra cepas geneticamente modificadas do *B. anthracis*.

Sendo assim, tendo em vista a atual situação geopolítica mundial, com o antraz já consagrado como agente de guerra biológica para fins terroristas, como nos atentados ocorridos após 11 de setembro de 2001, é imperativa a busca por novos fármacos, bem como novos alvos moleculares, para o desenvolvimento de fármacos contra o *B. anthracis*. Uma boa opção dentre os alvos moleculares disponíveis é a enzima nucleosídeo hidrolase.

2.4 A nucleosídeo hidrolase (NH)

As nucleosídeo hidrolases fazem parte de uma superfamília de metaloproteínas estruturalmente relacionadas, com uma topologia original de folhas β , que são responsáveis pela hidrólise de nucleosídeos como fonte de bases nitrogenadas para a síntese de ácidos nucleicos em bactérias, fungos e protozoários. Todas as NHs estudadas até o momento são homodímeros ou homotetrâmeros e apresentam grande similaridade das sequências de aminoácidos do sítio ativo, fato que indica que elas são intimamente relacionadas em estrutura e mecanismo catalítico. Consequentemente, é bem provável que inibidores de uma NH sejam ativos contra NHs de muitas outras espécies (França et al., 2008b).

Observa-se que as NHs de parasitas têm sido extensamente estudadas como potenciais alvos para intervenção quimioterapêutica (Parkin & Schramm, 1995; Gopaul et al., 1996; Degano et al., 1998; Shi et al., 1999; Cui et al., 2001; Santana et al., 2002; Versées & Steyaert, 2003), devido à divergência no metabolismo de purina entre o parasita e o hospedeiro. Considerando que um dos fatores metabólicos que distinguem os parasitas protozoários dos mamíferos é a falta da biossíntese “de novo” de purinas, esses parasitas dependem exclusivamente da purina do hospedeiro. Em função disso, os parasitas são incapazes de realizar a biossíntese de purinas e transformá-las em nucleosídeos

purina ou bases nitrogenadas para suprir a sua demanda de crescimento. Sendo assim, o parasita depende da via de recuperação de purinas para sobreviver.

Essas enzimas já foram caracterizadas em bactéria (Ogawa et al., 2001; Petersen & Moller, 2001), levedura (Kurtz et al., 2002), protozoário (Cui et al., 2001; Pellé et al., 2001) e insetos (Ribeiro & Valenzuela, 2003). Os genes responsáveis pelas características de identidade da NH estão presentes em plantas, anfíbios e peixes, mas, surpreendentemente, nenhuma atividade de NH, nem genes que a codificam, tem sido detectada em mamíferos. A via metabólica das NHs está bem estabelecida somente para os parasitas protozoários, tais como tripanossoma, leishmania e giárdia. Nesses organismos, as NHs são as enzimas responsáveis pela via de recuperação que tem como objetivo obter purinas do seu meio ambiente (Hammond et al., 1984). Essas enzimas catalisam a hidrólise de nucleosídeos, permitindo a reciclagem de bases purinas e ribose.

Funcionalmente, as NHs são hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações N-ribosídicas de nucleosídeos purina e/ou pirimidina, como mostrado na equação: nucleosídeo + H₂O → ribose + purina ou pirimidina.

As NHs estudadas até hoje são homodímeros, como, por exemplo, a *Tv*-IAGNH (Versées et al., 2001) ou homotetrâmeros, como, por exemplo, *Lm*NH, *Cf*-IUNH e *Ld*NH (Degano et al., 1998; Shi et al., 1999; Cui et al., 2001) e apresentam grandes similaridades nas sequências de aminoácidos do sítio ativo, o que indica que elas são intimamente relacionadas em estrutura e mecanismo catalítico. Cada monômero é funcional e contém um sítio ativo estreito e profundo. Duas alças flexíveis características ocorrem nas proximidades do sítio ativo e o íon Ca²⁺ está fortemente ligado a ele (Degano et al., 1998; Versées et al., 2001). Esse metal octacoordenado é quelado por meio de uma rede conservada de interações envolvendo os oxigênios da cadeia lateral dos aminoácidos Asp10, Asp15, Asp242, oxigênio carbonílico da cadeia principal com Thr126 (numeração para *Cf*-IUNH) e três moléculas de água. Sobre a

ligação do substrato, a fração ribose está fixada dentro do sítio ativo. No complexo enzima-substrato, duas moléculas de água ligadas ao íon cálcio são substituídas pelos grupos 2' e 3'-hidroxila do açúcar. A única molécula de água restante quelada ao Ca^{2+} continua interagindo com o aspartato (Asp10). Nas várias estruturas, essa molécula de água está localizada 3,2-3,3 Å da parte de trás da ligação C1'. A especificidade rigorosa das NHs pela fração ribose é estabelecida por meio de uma rede elaborada de interações conservadas, envolvendo as hidroxilas -2', 3' e 5' do açúcar e resíduos conservados Asp14, Asn160, Glu166, Asn168 e Asp242 (numeração para *Cf*-IUNH) e íon Ca^{2+} (Versées et al., 2003).

As nucleosídeos hidrolases não específicas (NNHs) catalisam a hidrólise de nucleosídeos purina e pirimidina e também hidrolisam o p-nitrofenil- β -D-ribofuranosídeo-O-ligado ainda mais eficientemente. Em contraste, as nucleosídeos hidrolases específicas (SNHs) preferem nucleosídeos purina e são pobres catalisadores para pirimidina e p-nitrofenil β -D-ribofuranosídeo (Parkin et al., 1991; Estupinam & Schramm, 1994; Parkin, 1996). Essa diferença na preferência pelo substrato pode ser racionalizada em termos de mecanismos enzimáticos da hidrólise do N-ribosídeo, que inclui (1) assistência ao grupo de saída, (2) estabilização do íon ribooxocarbênio e (3) ativação de água (Schramm, 1997). O substituinte p-nitrofenil é um bom grupo de saída, não necessita de ativação e tem um valor de pKa que é alto o suficiente para permitir a protonação por um ácido enzimático. As enzimas não específicas hidrolisam o p-nitrofenil β -D-ribofuranosídeo porque elas usam a estabilização do íon ribooxocarbênio como a maior contribuição para a catálise. Já as NH específicas para purina atuam mais sobre a protonação do grupo de saída que sobre a ativação do açúcar, sendo catalisadores menos eficientes para a hidrólise do p-nitrofenil β -D-ribofuranosídeo. Assim, ácidos que protonem o grupo de saída da

purina são importantes para estabilizar o estado de transição das SNHs (Mazzella et al., 1996; Parkin, 1996).

A inosina-uridina nucleosídeo hidrolase da *C. fasciculata* (*Cf*-IUNH) pode ser utilizada como modelo para as NNHs. A estrutura obtida por cristalografia dessa enzima complexada com o p-aminofenil-(1S)-iminoribitol (pAPIR) (Degano et al., 1998) revela fatores importantes que corroboram a importância da ativação do grupo ribosil nas NNHs: (1) o ancoramento da hidroxila-5' em uma orientação ótima para a formação do íon carbênio, (2) a quelatação direta de ambas as hidroxilas -2' e 3' com o Ca^{2+} ligado à enzima em uma geometria favorável à estabilização do íon oxocarbênio e (3) a ligação hidrogênio imino a grupos enzimáticos que podem estabilizar eletrostaticamente o estado de transição do íon oxobarbênio.

A única interação proposta para o grupo de saída, a protonação do N7 pela His-241 (no substrato purina, inosina), não pode ser verificada na estrutura do cristal com o p-aminofenil-(1S)-iminoribitol (pAPIR) (Gopaul et al., 1996; Degano et al., 1998).

O mecanismo enzimático da hidrólise do substrato inosina catalisada pelas NHs está ilustrado na Figura 1.

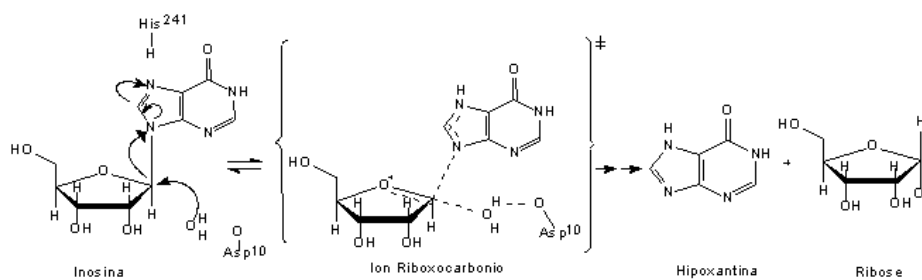


FIGURA 1 Mecanismo enzimático da hidrólise da inosina catalisada pelas NHs.

O modelo para SNHs pode ser a inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase de *T. brucei brucei* (*Tbb-IAGNH*) (Parkin, 1996; Schramm, 1997). Contudo, ainda não há informações estruturais sobre esta enzima. Versées et al. (2003) propuseram que resíduos de triptofano na entrada do sítio ativo (pocket) das SNHs estão envolvidos em interações paralelas com a nucleobase (“parallel stacking interaction”). Portanto, essas interações, também conhecidas como empilhamento π , são, pelo menos em parte, responsáveis pela especificidade da IAG-NHs (Versées et al., 2003).

O fato de as nucleosídeos hidrolases parasitárias serem consideradas como potenciais alvos para quimioterapia de parasitas e infecções causadas por bactérias (Boutellier et al., 1994; Parkin et al., 1995; Degano et al., 1998; Gopaul et al., 1996; Shi et al., 1999; Cui et al., 2001; Santana et al., 2002; Versées et al., 2003; França et al., 2008b; Goeminne et al., 2008a, 2008b), sendo essenciais para a via de recuperação de purinas, as tornam um importante alvo para o planejamento de novos fármacos contra o *Bacillus anthracis*. Nesse processo, a técnica computacional modelagem molecular é uma importante ferramenta por meio da qual é possível investigar detalhadamente, no âmbito da molécula, as interações entre um alvo e diversos compostos protótipos.

2.5 Modelagem molecular

A disponibilidade dos programas computacionais de modelagem molecular e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e o planejamento de compostos. Essas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse (Carvalho et al., 2003; Caetano, 2007; Caetano et al., 2009).

Um estudo das relações estrutura-atividade de um composto-protótipo e de seus análogos pode ser usado para determinar as partes da estrutura do

protótipo que são responsáveis por sua atividade biológica e também por seus efeitos adversos. Subsequentemente, essa informação é utilizada para desenvolver um novo composto que possui a atividade aumentada, poucos efeitos colaterais indesejáveis e maior facilidade de administração (Thomas, 2003).

Modelagem molecular, segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional sob um dado conjunto de circunstâncias (Santana et al., 2002; Carvalho et al., 2003; Caetano, 2007).

As moléculas, geralmente desenhadas de forma tridimensional, não estão, necessariamente, na conformação mais estável. Durante a geração de uma determinada estrutura ocorrem distorções na molécula, com formação desfavorável de comprimentos e ângulos de ligações e ângulos diédricos. Átomos não-ligados também interagem em uma mesma região do espaço e provocam repulsão estérica e eletrostática. Para corrigir essas distorções, as moléculas são otimizadas pelo processo de minimização de energia, a partir de dois modelos matemáticos: (i) mecânica molecular ou (ii) mecânica quântica. Interações não previsíveis relacionadas à sobreposição de orbital molecular, distribuição de densidade eletrônica ou interferências estéricas podem ser solucionadas pelos métodos computacionais. A minimização de energia e a análise conformacional são utilizadas interativamente para otimizar a geometria de uma molécula (Carvalho et al., 2003).

O processo de mecânica molecular promove a modificação dos ângulos e comprimentos das ligações dos átomos originais e fornece novas conformações com os correspondentes cálculos de energia. O objetivo da mecânica molecular é

predizer a energia associada com determinada conformação de uma molécula (Patrick & Flanagan, 2001; Carvalho et al., 2003).

A escolha do método de minimização de energia depende de fatores relacionados ao tamanho da molécula, à disponibilidade de parâmetros, aos dados armazenados e ao recurso computacional (Carvalho et al., 2003).

2.6 Ancoramento molecular

Para entender o mecanismo de interação de um fármaco é essencial saber o posicionamento tridimensional da sua interação molecular com a proteína alvo. A predição da geometria e da energia de ligação é de grande interesse para o planejamento de novos fármacos (Iwata et al., 2000; Hillisch et al., 2004). Uma das conformações estruturais mais confiáveis é obtida por análise de raios X de cristais do complexo, mas não é fácil obter dados experimentais sobre todos os compostos de interesse. A simulação computacional do ancoramento molecular (“docking”) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre uma proteína e um ligante, nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada (Silveira, 2003). Seja por cristalografia ou pela técnica computacional modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (“comparative protein modeling”), é a ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas (Peitsch, 1997; D’Alfonso & Tramontano, 2001; Santos Filho et al., 2001; França, 2004; França et al., 2008a; Souza et al., 2008).

Os valores da função de desempenho do ancoramento (*docking scoring function*), E_{score} , são definidos pela Equação 1.

$$E_{\text{score}} = E_{\text{inter}} + E_{\text{intra}}$$

Equação 1

em que o termo E_{inter} , que corresponde à energia de interação ligante-proteína, é definido de acordo com a Equação 2.

$$E_{inter} = \sum_{i=ligant} \sum_{j=protein} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad \text{Equação 2}$$

O termo de E_{PLP} , na Equação 2, é um potencial “piecewise linear” que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (*van der Waals*) entre átomos e um outro potencial para a ligação hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados. É um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância ($D(r) = 4r$). O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática em quilocalorias por mol (Thomsen & Christensen, 2006; Caetano, 2007; Josa et al., 2008; Caetano et al., 2009; Ogungbe & Setzer, 2009; Khan, et al., 2009; Pina, & Roque, 2009; Ramalho et al., 2009). E_{intra} , que corresponde à energia interna do ligante, é definido de acordo com a Equação 3.

$$E_{intra} = \sum_{i=ligant} \sum_{j=ligant} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{flexiblebands} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad \text{Equação 3}$$

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante, excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à torção da energia, em que θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é utilizada se diversas torsões são determinadas. O último termo, E_{clash} , atribui uma penalidade de 1.000, se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2.0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante. Em resumo, essas funções são utilizadas para sobrepor automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde rígida (proteína).

A técnica de ancoramento molecular encontra uma média de estruturas estáveis do ligante na proteína e calcula essa estabilidade relativa. Para encontrar a estrutura de menor energia, sem qualquer suposição prévia, é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados, eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo. Contudo, o número de combinações envolvidas é muito grande (Mizutani et al., 1994).

Uma maneira interessante de pesquisar a estrutura mais estável do complexo (não necessariamente o mínimo global) foi proposta por Kuntz et al. (1982). A ideia fundamental inicial desse método é representar ambos, a molécula ligante e a superfície macromolecular, por um conjunto de esferas e procurar (método estocástico) o melhor emparelhamento das esferas. A complementaridade da forma molecular é muito importante no método de ancoramento. Posteriormente, um método mais eficiente para o acoplamento molecular de ligantes flexíveis foi desenvolvido por Leach & Kuntz (1992). O método consiste em, primeiro, determinar a posição e a orientação dos fragmentos rígidos do ligante e, então, pesquisar as conformações da região flexível do ligante de modo sistemático. A energia de interação intermolecular é calculada por meio da soma das contribuições de energia entre todos os átomos das duas moléculas, desconsiderando as interações entre os átomos da mesma molécula.

2.7 Mecânica molecular

Muitos dos sistemas com os quais lidamos em modelagem molecular são demasiado grandes para serem abordados pela mecânica quântica ou por métodos semiempíricos. Esses métodos levam em conta os movimentos dos elétrons de um sistema e, mesmo que alguns sejam ignorados (como acontece

nos métodos semiempíricos), um grande número de partículas deve ainda ser considerado e os cálculos acabam consumindo um tempo de processamento que os torna inviáveis para sistemas grandes. Os métodos de campo de forças, também conhecidos como mecânica molecular (MM), ignoram os movimentos dos elétrons e calculam a energia de um sistema como uma função apenas das posições nucleares. Isso torna a MM um método adequado para lidar com sistemas contendo um número grande de átomos. Em alguns casos, campos de forças podem levar a respostas tão acuradas quanto o mais elevado nível de cálculo da mecânica quântica, em um tempo computacional bem menor (Higgins & Taylor, 2001).

A MM, todavia, não pode prever propriedades que dependem da distribuição eletrônica em uma molécula, tais como estados de transição ou distribuições de cargas. É baseada num modelo mais simples das interações dentro de um sistema com contribuições de processos, tais como o estiramento e a contração de ligações, o abrir e o fechar de ângulos e as rotações em torno de ligações simples.

A maioria dos campos de forças da modelagem molecular em uso hoje em dia para sistemas moleculares, GROMOS (Jorgensen & Tirado-Rives, 1988), GROMOS96 (Gunsteren et al., 1996), AMBER (Weiner et al., 1984; Cornell et al., 1995) e MM2/MM3/MM4 (Allinger, 1977; Allinger et al., 1989, 1990a, 1990b, 1996a, 1996b; Nevins et al., 1996a, 1996b, 1996c), pode ser interpretada em termos de um simples conjunto de quatro componentes correspondentes às forças intra e intermoleculares dentro do sistema. Penalidades energéticas estão associadas ao desvio de ângulos e ligações de seus valores de referência ou de equilíbrio. Há uma função que descreve como a energia varia quando as ligações são giradas e, por fim, o campo de forças contém termos que descrevem a interação entre partes não ligadas do sistema. Campos de forças mais sofisticados podem incluir termos adicionais, mas eles, invariavelmente, contêm

esses quatro componentes. Uma característica atrativa dessa representação é que os vários termos podem ser relacionados a variações em coordenadas internas específicas, tais como comprimentos de ligações, rotação de ligações ou movimentos de átomos em relação a outros átomos. Isso torna mais fácil o entendimento de como variações nos parâmetros do campo de forças afetam sua performance e também ajudam no processo de parametrização.

A parametrização é a preparação dos sistemas para os cálculos de dinâmica molecular (geração dos arquivos de entrada, montagem da caixa d'água, inserção de íons, etc.) para serem reconhecidos pelo campo de forças. Uma forma funcional deste campo de forças é mostrada na Equação 4.

$$U(r^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torções}} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

Equação 4

em que $U(r^N)$ é a energia potencial total, que é uma função das posições (r) de N partículas (normalmente átomos). O primeiro termo modela as interações entre pares de átomos ligados, modelados aqui pelo potencial harmônico que dá o aumento na energia quando o seu comprimento r_i desvia do valor de referência $r_{i,0}$. O segundo termo é uma soma sobre todos os ângulos de valência (ângulos A—B—C) na molécula, novamente modelada usando um potencial harmônico. O terceiro termo é o potencial torcional que modela como a energia varia quando as ligações giram. A quarta contribuição é o termo não ligado, calculado entre todos os pares de átomos (i e j) que estão em diferentes moléculas ou na mesma molécula, mas separados por, no mínimo, três ligações (ou seja, tem uma relação 1, n em que $n \geq 4$).

Em um campo de forças simples, o termo não ligado é usualmente modelado utilizando-se um termo de potencial de Coulomb para interações

eletrostáticas e um termo de potencial de Lennard-Jones para as interações de *Van der Waals*, como feito na Equação 4.

2.8 Otimização da estrutura

As forças, numa configuração inicial para uma estrutura molecular tridimensional, derivadas da Equação 4, podem ser demasiadamente grandes, decorrendo grandes acelerações locais, implicando grandes velocidades e consequentes grandes deslocamentos que não satisfazem às condições para DM que, consequentemente, não funcionará. Assim, é necessária a minimização de sua energia, que é importante também para a remoção de qualquer tensão local. A Equação 4 gera uma hipersuperfície que apresenta mínimos locais, dos quais um ou mais podem ser globais (mínimos globais degenerados). Esses mínimos locais podem ser em números elevadíssimos, já que dependem do número de graus de liberdade do sistema. E como este número é altíssimo para um sistema de macromoléculas biológicas, chegar a um mínimo global ao varrer-se completamente uma superfície multidimensional torna-se, hoje, praticamente inexequível. Portanto, o que se faz é procurar um mínimo ao se varrer uma parte da hipersuperfície potencial, de forma a encontrar-se um ponto com a menor energia potencial local.

O objetivo da consecução de um mínimo é ter uma conformação espacial que tenha relaxado as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de *Van der Waals*. Um ponto mínimo (tanto local quanto global) é determinado quando as forças que atuam sobre o sistema são nulas. O mínimo global seria a configuração espacial para o sistema biológico, cuja energia potencial total (Equação 4) seria a menor dentre todas as outras, para qualquer ponto tomado na hipersuperfície.

Apesar de existirem diversos métodos de otimização de geometria ou minimização de energia, serão abordados aqui apenas os dois principais e mais

largamente utilizados, que são o método de máximo declive (*steepest descent*) e o dos gradientes conjugados.

2.8.1 Método do máximo declive

O método do máximo declive (Wiberg & Grice, 1965) é um método de primeira derivada que converge vagarosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo de energia. De modo geral, com esse algoritmo é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou construir estruturas a partir de informações de RMN ou por modelagem comparativa a estruturas conhecidas.

2.8.2 Método dos gradientes conjugados

É um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função energia. Além de utilizar a informação sobre a segunda derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo. Esse método, denominado “gradientes conjugados”, permite, em geral, uma convergência mais rápida que o método do máximo declive que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. O método dos gradientes conjugados utiliza para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior.

Esse método determina um caminho mais direto ao fundo do poço de potencial, evitando o retorno sobre caminhos já percorridos, ao contrário do algoritmo do máximo declive que utiliza informação em um ponto e que, portanto, não pode excluir essa possibilidade. Na prática, para os sistemas macromoleculares, o algoritmo do máximo declive se mostra mais efetivo e rápido nos passos iniciais quando se está muito longe do mínimo. Entretanto, quando se está perto de atingir o mínimo, o método do gradiente conjugado é

muito mais rápido e preciso. Dessa forma, podem-se combinar os dois métodos utilizando inicialmente o máximo declive com um critério de convergência relativamente fraco e o método dos gradientes conjugados para o refinamento final.

2.9 Dinâmica molecular

Dinâmica molecular é uma técnica com a qual se estudam os movimentos em um sistema de partículas por simulação. Ela pode ser empregada tanto em sistemas de elétrons, átomos ou moléculas, como em sistemas macromoleculares (Mark & Glenn, 2000; França, 2004; Gonçalves, 2009). Para macromoléculas e biomembranas, as simulações são realizadas em caixas d'água em condições periódicas de contorno, levando-se em consideração a participação explícita dos átomos do solvente e eliminando-se os efeitos de fronteira (Silva, 2003; França, 2004; Gonçalves, 2009). Seus elementos essenciais são o conhecimento do potencial de interação entre as partículas e das equações de movimento clássicas que governam a dinâmica dessas partículas. O potencial pode variar do simples, como o gravitacional, para interações entre estrelas, ao complexo, composto por vários termos, como o que descreve as interações entre átomos e moléculas. Para muitos sistemas, entre os quais os biomoleculares, as equações da dinâmica clássica são adequadas (Karplus & Petsko, 1990; Istvan et al., 2001; França, 2004; Gonçalves, 2009).

O estado microscópico de um sistema pode ser especificado em termos das posições e momentos das suas partículas. Assim, na mecânica clássica, pode-se escrever o Hamiltoniano “H” de um sistema molecular clássico como a soma das energias cinética C e potencial V , em função das séries de coordenadas generalizadas \vec{q}_i e de momentos generalizados \vec{p}_i de todos os N átomos do sistema (Mark & Glenn, 2000):

$$H(\{\vec{q}_i, \vec{p}_i\}) = C(\{\vec{p}_i\}) + V(\{\vec{q}_i\}) \quad \text{Equação 5}$$

em que

$$\vec{q}_i = q_1, q_2, \dots, q_{\text{Nat}} \text{ e } \vec{p}_i = p_1, p_2, \dots, p_{\text{Nat}}$$

A energia potencial $V(\{\vec{q}_i\})$ contém os termos de interação inter e intramoleculares, de curto e longo alcance e a energia cinética é determinada pela Equação 6:

$$C(\{\vec{p}_i\}) = \sum_{i=1}^{\text{Nat}} \frac{\vec{p}_i^2}{2m_i} \quad \text{Equação 6}$$

em que

m_i é a massa do átomo i .

A partir do H , é possível construir as equações de movimento que governam a evolução temporal do sistema e suas propriedades dinâmicas. Como a energia potencial independe das velocidades e do tempo, H é igual à energia total do sistema e as equações do movimento hamiltoniano:

$$\dot{q}_i = \frac{\partial H}{\partial p_i} \quad \text{Equação 7}$$

$$\dot{p}_i = -\frac{\partial H}{\partial q_i} \quad \text{Equação 8}$$

conduzem às equações do movimento de Newton:

$$\dot{r}_i = \frac{p_i}{m_i} = v_i \quad \text{Equação 9}$$

$$\dot{p}_i = m_i \ddot{r}_i = -\frac{\partial V(\{r_i\})}{\partial r_i} = F_i \quad \text{Equação 10}$$

respectivamente, em que r_i (ou v_i) e r_i são a velocidade e a aceleração do átomo i , enquanto F_i é a força sobre o átomo i (Goldstein, 1980; Allen & Tildesley, 1987; Pascutti, 2002; França, 2004; Gonçalves, 2009).

A DM consiste, portanto, na resolução numérica das Equações 9 e 10 e na integração das mesmas passo a passo no tempo, de maneira eficiente e acurada. Como resultado, obtêm-se as energias e as trajetórias para todas as partículas (ou átomos) e para o sistema como um todo, a partir das quais várias propriedades podem ser calculadas. O tempo deixa de ser contínuo, sendo discretizado nos sistemas moleculares em passos menores (geralmente, 20 vezes menores) que o período das vibrações dos átomos de hidrogênio, o movimento molecular mais rápido. Em sistemas com hidrogênio, usualmente, aplica-se um passo de tempo de $5,0 \times 10^{-16}$ segundos. Nesse procedimento, é essencial que a energia potencial seja uma função contínua das posições das partículas e que as posições variem suavemente no tempo. As forças F_i sobre cada átomo, que são obtidas a partir da derivada espacial da função energia potencial como mostrado na Equação 10, podem, dessa maneira, ser consideradas constantes no intervalo entre dois passos. A estabilidade da dinâmica é assim favorecida, as partículas seguem suas trajetórias clássicas mais acuradamente e a energia total do sistema tende a conservar-se.

Depois de mudanças iniciais, chega-se, usualmente, a um estado de equilíbrio dinâmico e, por uma média da trajetória de equilíbrio, muitas propriedades macroscópicas podem ser extraídas (Spoel et al., 2002; Gonçalves, 2009) e diversas análises, como número médio de ligações hidrogênio ao longo do tempo, distância entre dois grupos funcionais, energia total do sistema, mudanças estrutural do solvente em condições críticas de pressão e área acessível ao solvente (Gonçalves et al., 2009; Silva et al., 2009; Gonçalves, 2009), podem ser feitas.

Uma limitação para a simulação da dinâmica molecular reside, portanto, no fato de que, para cada nanossegundo de simulação, são necessários dois milhões de passos, com o passo de tempo acima. A simulação de 1 nanossegundo (ns) da dinâmica de uma macromolécula com 200 átomos pode levar horas de tempo de UCP em um computador, utilizando-se um algoritmo eficiente. Uma descrição e análise da eficiência de algoritmos para simulação de dinâmica molecular podem ser encontradas em Berendsen & Gunsteren (1986) e Allen & Tildesley (1987). Estes últimos incluem rotinas em linguagem FORTRAN, para alguns métodos de simulação.

As simulações de DM geram uma quantidade enorme de dados cuja análise cuidadosa é fundamental para o sucesso do método. Os dados mais importantes gerados em arquivos são as posições e as velocidades da cada átomo do sistema ao longo do tempo. A partir deles, todo o resto pode ser depreendido. Contudo, é prático, e muito relevante também, o registro das mais diversas energias presentes, tanto gerais quanto de interação entre átomos e/ou grupos do sistema, além da temperatura, pressão, forças e outras propriedades físicas macroscópicas.

3 OBJETIVOS

A compreensão das interações específicas entre ligantes e os seus receptores auxilia no conhecimento das razões moleculares da atividade dos ligantes. No intuito de estudar novos alvos moleculares contra agentes de guerra biológica, este trabalho foi realizado com os objetivos de:

1) estudar, por simulações de dinâmica molecular e por cálculos da energia de ancoramento molecular (docking), as interações de potenciais inibidores com o sítio ativo da enzima *BaNH*;

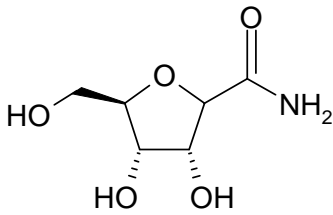
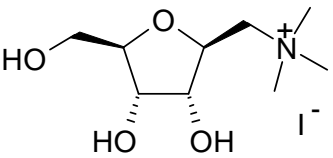
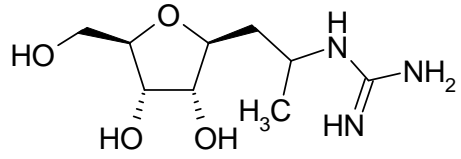
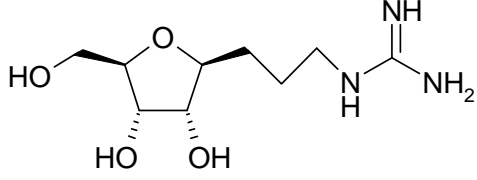
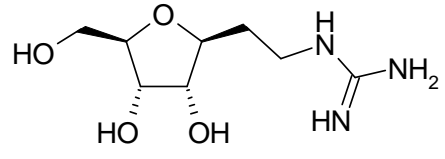
2) confrontar os resultados da dinâmica molecular com os resultados dos cálculos de energia de ancoramento molecular e selecionar os inibidores mais promissores que servirão de *lead compounds* para o planejamento de potenciais inibidores para a enzima *BaNH*.

4 METODOLOGIA

4.1 Inibidores de NH estudados

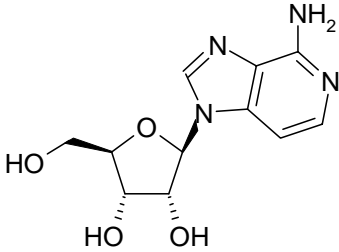
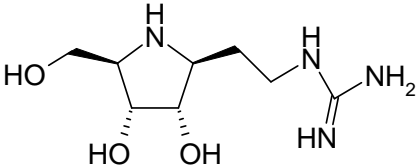
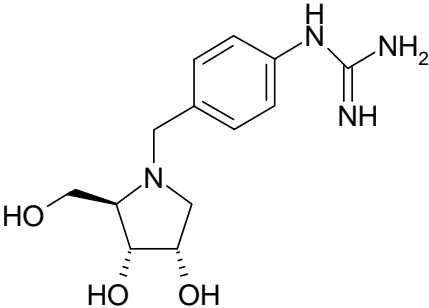
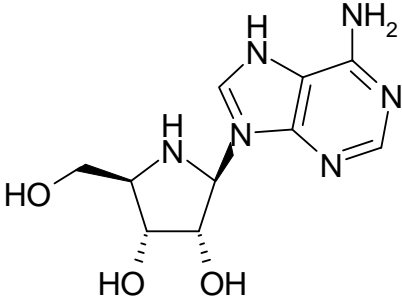
Na Tabela 1 são apresentadas as estruturas dos potenciais inibidores de NH escolhidos para os estudos do presente trabalho e seus respectivos valores de constantes de inibição (K_i). Estes compostos foram selecionados a partir de uma série de inibidores desenvolvidos por Goeminne et al. (2008a, 2008b) e por Boutellier et al. (1994), tendo que a constante de inibição do substrato sido determinada para a NH de *Trypanosoma vivax* expressa em *E.coli*.

TABELA 1 Estruturas dos inibidores de NH estudados no presente trabalho, com os respectivos valores de K_i .

Composto	Estrutura	k_i (μM)
1*		$4,50 \times 10^3$
2*		$2,28 \times 10^3$
3*		$6,85 \times 10^2$
4*		$6,77 \times 10^2$
5*		$3,09 \times 10^2$

...continua...

TABELA 1, Cont.

6**	 <p>Chemical structure of compound 6** is a ribose derivative with a 2-aminoimidazole ring system attached to the C2 position. The ribose has hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	$2,00 \times 10^{-1}$
7*	 <p>Chemical structure of compound 7* is a ribose derivative with a guanidino group attached to the C2 position via a propyl chain. The ribose has hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	$1,80 \times 10^1$
8*	 <p>Chemical structure of compound 8* is a ribose derivative with a guanidino group attached to the C2 position via a benzyl chain. The ribose has hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	$7,00 \times 10^0$
9**	 <p>Chemical structure of compound 9** is a ribose derivative with a 2-aminoimidazole ring system attached to the C2 position. The ribose has hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	$6,20 \times 10^{-3}$

...continua...

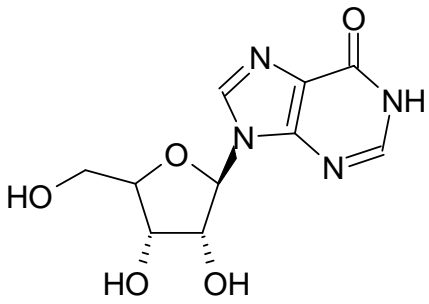
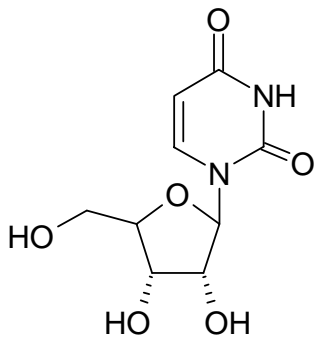
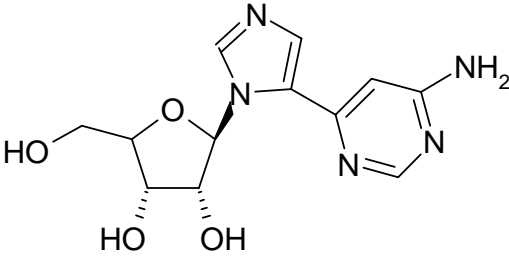
TABELA 1, Cont.

10***		$10,00 \times 10^0$
11***		$2,10 \times 10^{-1}$
12***		$1,00 \times 10^{-2}$

* Goeminne et al., 2008b, ** Goeminne et al., 2008a e *** Boutellier et al., 1994.

Além dos inibidores da Tabela 1 foram estudadas também a inosina, uridina e a adenosina, que são substratos naturais das NHs, como referência para a avaliação dos resultados obtidos com os inibidores da Tabela 1. As estruturas dessas moléculas, bem como os seus respectivos valores de afinidade com a NH de *T. vivax* (K_M) obtidos por Versées et al. (2002), são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 Estruturas dos substratos naturais das NHs estudados no presente trabalho, com os respectivos valores de K_M .

Composto	Estrutura	K_M (μM)
Inosina		5,37
uridina		586
adenosina		8,00

4.2 Ancoramento dos inibidores

Para a realização do presente trabalho, as estruturas dos inibidores da Tabela 1 e os substratos da Tabela 2 foram construídos por meio do programa PC Spartan Pro (Hehre et al., 1999) e as suas cargas parciais atômicas calculadas utilizando o método semiempírico PM3. Esse procedimento é necessário para obter a conformação inicial dos compostos, importante para os estudos por ancoramento molecular.

Utilizou-se, para os cálculos das energias de ancoramento, o programa *Molegro Virtual Docker (MDV)* (Thomsen & Christensen, 2006), em que cada ligante foi ancorado no sítio ativo da enzima *BaNH*. Nesta etapa, a identificação dos modos de interação do ligante é interativa, avaliando um número de candidatos (conformação e orientação do ligante) e estimando as energias de suas interações com a proteína. As melhores soluções são retornadas para uma análise adicional (Caetano, 2007; Caetano et al., 2009).

Para melhores resultados, foi considerada a flexibilidade dos resíduos próximos a 11Å do ligante durante o ancoramento. Foi selecionada a melhor conformação de cada composto, usando seu maior grau de similaridade espacial com a ribose obtida do PDB, juntamente com a enzima *BaNH*, que foi representada pela estrutura com a energia de interação mais estável entre a posição do composto e a respectiva proteína.

4.3 Procedimento utilizado para o ancoramento molecular

As coordenadas da estrutura cristalográfica da enzima IU-*BaNH* (FIG. 2), incluindo o cofator Ca^{2+} e a ribose, foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB - código: 2C40) (<http://www.rcsb.org/pdb>). A resolução do cristal é de 2,2 Å e o sistema de expressão foi a *E. Coli*.

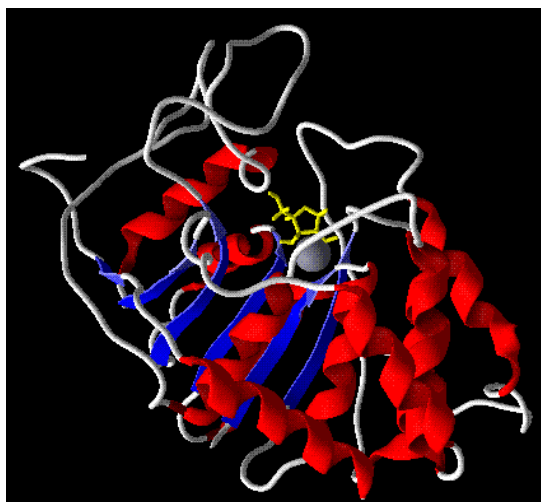


FIGURA 2 Estrutura da *BaNH* extraída do PDB (código 2C40). A ribose é representada em amarelo, o cofator Ca^{2+} é a esfera cinza, as α -hélices estão em vermelho e as folhas β , em azul.

4.4 Dinâmica molecular

Para a realização dos estudos por dinâmica molecular, primeiramente foi necessária a parametrização dos arquivos .pdb dos ligantes, para que estes pudessem ser reconhecidos pelo campo de forças GROMOS 96 do programa GROMACS 4.0 (Spoel et al., 2001), que foi utilizado para a otimização e a dinâmica molecular. A parametrização (APÊNDICE A) foi feita no site <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html> (Aalten et al., 1996), segundo o procedimento descrito no Apêndice A. As moléculas parametrizadas tiveram as distribuições de cargas de seus átomos calculadas pelo método chelpg por meio do programa Gaussian 98 (Frisch et al., 2001), aplicando o algoritmo HF na base 6-31G (d, p). Após parametrização e correção das cargas dos inibidores, os complexos enzima/ Ca^{2+} /ligantes estavam prontos para as etapas de otimização e dinâmica molecular.

Para os complexos enzima/ Ca^{2+} /ligantes, descritos no item 4.1, foram simuladas, utilizando-se o pacote GROMACS 4.0, caixas cúbicas de, aproximadamente, $364,885 \text{ nm}^3$, contendo em torno de 10.600 moléculas de água. Esses sistemas foram minimizados utilizando-se o campo de força GROMOS 96, implementado no pacote computacional GROMACS 4.0 (Van der Spoel et al., 2001).

O programa encontra-se disponível no site: <http://www.gromacs.org> (Spoel et al., 2002).

Os algoritmos de minimização empregados foram: 1) o do máximo declive com restrição de posição dos ligantes [steepest descent position restrained (stpr)] com critério de convergência de 100 kcal/mol.Å ; 2) steepest descent sem restrição de posição (st) até 5 kcal/mol.Å ; conjugate gradients (cg) até 2 kcal/mol.Å e, por fim, quasi Newton rapsom (l-bgps) até 1 kcal/mol.Å . Os complexos minimizados foram, então, submetidos à DM em duas etapas: Inicialmente, 500 ps de dinâmica a 300 K com restrição de posições para todo o sistema, exceto as moléculas de água, com o objetivo de garantir o equilíbrio das moléculas do solvente em torno dos resíduos da proteína. Posteriormente, 6000 ps a 300 K sem qualquer restrição, aplicando 2 fs de tempo de integração e um raio de corte de 10 Å para interações de longa distância. No total, 300 conformações foram obtidas durante essa simulação. Nesta etapa, as listas de pares (pairlists) foram atualizadas a cada 500 passos, a todos os resíduos Lis e Arg foram atribuídas cargas positivas e aos resíduos Glu e Asp foram atribuídas cargas negativas.

Os procedimentos para a geração dos arquivos de entrada e a execução da otimização e dinâmica de proteínas utilizando o pacote GROMACS 4.0 (Spoel et al., 2001) estão descritos em detalhes no apêndice B.

Após a dinâmica molecular, foram gerados e analisados, para cada sistema, os gráficos de energia total, de desvio padrão temporal e espacial e

ligações hidrogênio formadas e mantidas ao longo das dinâmicas. Também foram extraídos quadros a intervalos definidos ao longo das dinâmicas, para analisar e comparar o comportamento dinâmico de cada ligante em cada sítio ativo.

4.5 Análise de estruturas e geração de figuras e gráficos

Para analisar as estruturas geradas após os cálculos de otimização e dinâmica molecular, foram utilizados os programas VMD (Caddigan et al., 2004) e SwissPDBviewer (Guex et al., 1997). Os gráficos de variação energia total, da variação do DRMQ e das ligações hidrogênio formadas ao longo da dinâmica foram gerados com o programa xmgrace (Turner, 1991). Os gráficos em tubos que ilustram o comportamento das enzimas após dinâmica foram gerados no programa Molmol (Koradi et al., 1996) e as figuras com os quadros da dinâmica molecular foram gerados no programa PYMOL (Warren, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em duas partes. Na primeira parte são discutidos os resultados obtidos nos estudos por ancoramento molecular para entender as interações entre os ligantes e o sítio ativo da *BaNH*; na segunda parte são discutidos os resultados das simulações por dinâmica molecular que são, posteriormente, confrontados com os resultados obtidos nos estudos por ancoramento molecular da primeira parte do trabalho.

5.1 Estudos por ancoramento molecular

Os estudos por ancoramento entre a *BaNH* e os ligantes das Tabelas 1 e 2 permitiram conhecer as ligações hidrogênio relevantes que ocorrem entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, bem como obter as conformações adotadas por esses ligantes, compará-las às conformações dos substratos naturais (Tabela 2) e, assim, obter subsídios para a proposição de estruturas de possíveis protótipos de inibidores para a *BaNH*.

Os compostos da Tabela 1 foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo compreende os compostos de 1 a 6 e corresponde àqueles compostos que possuem um anel ribose em suas estruturas. O segundo grupo é constituído pelos compostos de 7 a 12. Nesses compostos, o oxigênio do anel ribose foi substituído pelo átomo de nitrogênio.

Um algoritmo de predição da cavidade com base em uma caixa 3D foi usado para gerar o sítio de ligação da *BaNH* por meio do programa MDV (Thomsen & Christensen, 2006). O volume calculado da cavidade foi de 119.296 Å e está representado na Figura 3, juntamente com a ribose e o cofator Ca^{2+} do cristal.

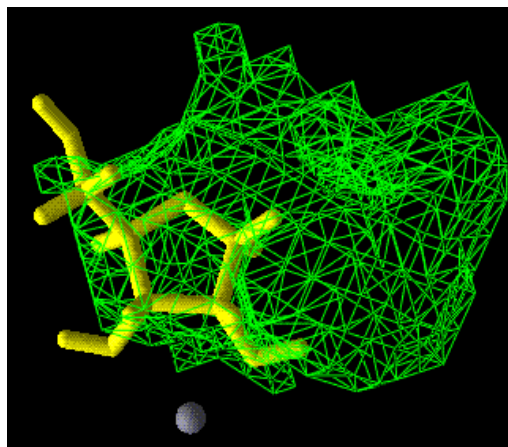


FIGURA 3 Volume da cavidade da *BaNH* com a ribose e o cofator Ca^{2+} .

Os inibidores foram ancorados no sítio ativo da *BaNH* e comparados com a ribose proveniente da estrutura cristalográfica depositada no PDB. As energias de interação e de ligação hidrogênio ligante-proteína foram calculadas para um melhor entendimento de quais são as variações entre os modos de ligação dos inibidores no sítio ativo da enzima e a avaliação de quais fatores seriam responsáveis pela atividade. Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os aminoácidos que participam destas ligações e as respectivas distâncias, os valores de energia e as constantes de inibição experimentais obtidas por Goeminne et al. (2008a, 2008b) e Boutellier et al. (1994) respectivamente.

TABELA 3 Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a enzima *BaNH*, valores de energia intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol) e os valores de K_i (μM) (Goeminne et al., 2008a, 2008b).

Composto	Resíduos	Dist. (Å)	Energia (kcal/mol)	E. Intermol. (kcal/mol)	E. ligação hidrog.# (kcal/mol)	K_i (μM)
1*	Asp247	3,42	-0,10	-71,18	-13,00	4,50 x 10³
		3,19	-2,03			
	Asn160	3,43	-0,86			
	Glu171	2,68	-2,50			
	Asn173	2,78	-2,50			
	Thr125	3,07	-2,50			
	Asp38	3,09	-2,50			
2*	Glu171	2,76	-2,50	-76,77	-13,91	2,28 x 10³
	Asn173	2,92	-2,50			
	Thr125	3,29	-1,52			
	Asp247	3,28	-0,10			
		3,12	-2,11			
		2,96	-2,50			

...continua...

TABELA 3, Cont.

	Asp14	3,23	-1,83			
	Asp9	2,40	-0,85			
	Asn160	3,54	-0,28			
		3,23	-1,87			
	Glu171	2,41	-0,90			
	Asn173	2,98	-0,94			
3*		3,01	-0,84	-85,89	-10,79	6,85
	Asp247	2,65	-2,50			x 10²
	Asp14	3,42	-0,87			
	Asp13	3,31	-1,44			
	Trp77	3,57	-0,01			
	Asn160	3,34	-1,28			
	Asn173	2,82	-1,65			
	Asp247	2,95	-2,50			
4*	Asp14	3,50	-0,49	-91,57	-10,78	6,77
	Asp38	3,08	-2,50			x 10²
	Trp-77	3,13	-2,37			
	Asn173	3,08	-0,68			
		3,31	-1,46			
		3,06	-2,50			
5*	Thr125	3,45	-0,75	-93,77	-13,03	3,09
	Asp247	3,18	-1,68			x 10²
		3,21	-0,97			
	Asp13	2,78	-2,50			
		3,09	-2,50			
	Asn160	3,37	-1,15			
	Glu171	3,11	-2,46			
	Asn173	2,97	-2,50			
6**	Thr125	3,25	-1,73	-114,42	-15,18	2,00
	Asp247	3,35	-2,50			x 10⁻¹
	Asp38	2,95	-2,50			
	Val12	2,95	-2,50			
	His80	2,75	-2,50			
	Asn160	3,36	-0,81			
		3,50	-0,48			
7*	Asn173	2,60	-2,50	-99,40	-13,78	1,80
	Thr125	3,05	-2,50			x 10¹

...continua...

TABELA 3, Cont.

	Asp247	3,40	-0,45			
		3,30	-1,43			
	Asp38	3,05	-2,50			
		3,10	-2,50			
	Glu-71	2,65	-2,50			
	Asn173	2,19	0,97			
		3,38	-1,11			
		2,43	-1,12			
8*	Asp247	3,19	-2,04	-108,63	-10,80	7,00
	Thr125	3,01	-2,50			x 10⁰
	Asp9	3,06	-2,50			
	Glu171	2,66	-2,50			
	Asn173	3,50	-0,37			
		2,79	-2,50			
		2,91	-2,50			
	Thr125	3,06	-2,50			
	Asp247	3,11	-2,41			
		3,24	-1,78			
9**	Asp14	3,37	-1,16	-110,51	-16,97	6,20
	Asp38	3,47	-0,62			x 10⁻³
	Val12	3,50	-0,25			
	His80	3,52	-0,38			

Energia de ligação hidrogênio total entre ligante e proteína.

* Goeminne et al., 2008b, ** Goeminne et al., 2008a.

TABELA 4 Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a enzima *BaNH*, valores de energia intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol), e os valores de K_i (μM), obtidos por Boutellier et al. (1994).

Composto	Resíduos	Dist. (Å)	Energia (kcal/mol)	E. Intermol. (kcal/mol)	E. ligação hidrog.* (kcal/mol)	K_i (μM)
10	Asn160	3,43	-0,82	-67,05	-15,85	10,00 x 10⁰
	Glu171	2,81	-2,50			
	Asn173	2,79	-2,50			
	Thr125	2,79	-2,50			
	Asp247	3,20	-0,07			
		2,98	-2,50			
	Asp9	3,54	-0,29			
	Asp38	3,17	-2,16			
	2,64	-2,50				
11	Asn160	3,37	-1,16	-103,85	-17,38	2,10 x 10⁻¹
	Glu171	2,81	-2,50			
	Asn173	2,64	-2,50			
	Thr125	2,62	-2,50			
	Asp247	3,46	-0,14			
		3,21	-1,97			
		2,86	-2,50			
	Asp14	3,28	-1,61			
Asp38	2,60	-2,50				
12	Asn160	3,43	-0,85	-121,48	-20,40	1,00 x 10⁻²
	Asn173	2,84	-2,50			
	Thr125	2,90	-2,50			
	Asp38	2,60	-1,67			
	Asp247	3,07	-2,50			
	Asp13	3,12	-2,38			
	Val12	3,47	-0,63			
	Tyr243	3,50	-0,40			
	His80	3,01	-2,29			
		3,16	-2,17			
		3,11	-2,45			
	2,31	-0,08				

* Energia de ligação hidrogênio total entre ligante e proteína.

Os resultados teóricos obtidos do ancoramento molecular foram avaliados e comparados com base nos resultados experimentais descritos por Goeminne et al. (2008a, 2008b) e Boutellier et al. (1994), para os dois grupos de inibidores estudados. Como é possível observar nas Figuras 4, 5 e 6, obteve-se uma correlação linear para ambos os grupos. Os inibidores 7 a 9 foram propostos por Goeminne e colaboradores e os de 10 a 12 por Boutellier e colaboradores. Apesar de pertencerem ao mesmo grupo (o oxigênio do anel ribose foi substituído pelo átomo de nitrogênio), os resultados obtidos foram avaliados separadamente, tendo como ponto de partida a diferença dos testes experimentais, dos substituintes, assim como a carga positiva no nitrogênio do anel ribose para os compostos 10 a 12.

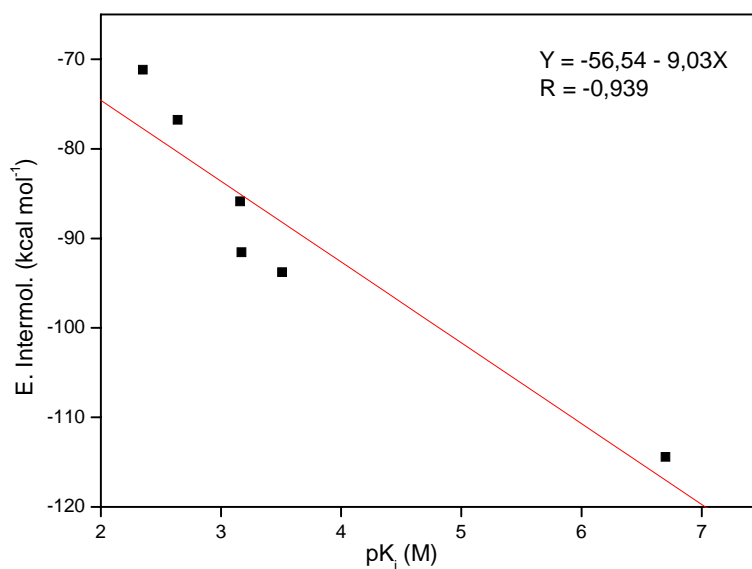


FIGURA 4 Correlação entre os valores de constante de inibição e energia intermolecular obtida com o ancoramento molecular para os inibidores do grupo 1.

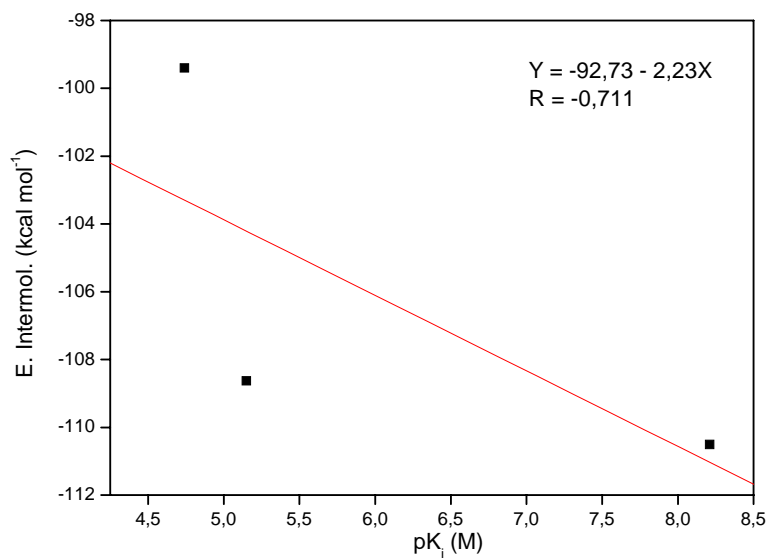


FIGURA 5 Correlação entre os valores de constante de inibição e energia intermolecular obtida com o ancoramento molecular para os inibidores do grupo 2, descritos por Goeminne et al. (2008a, 2008b).

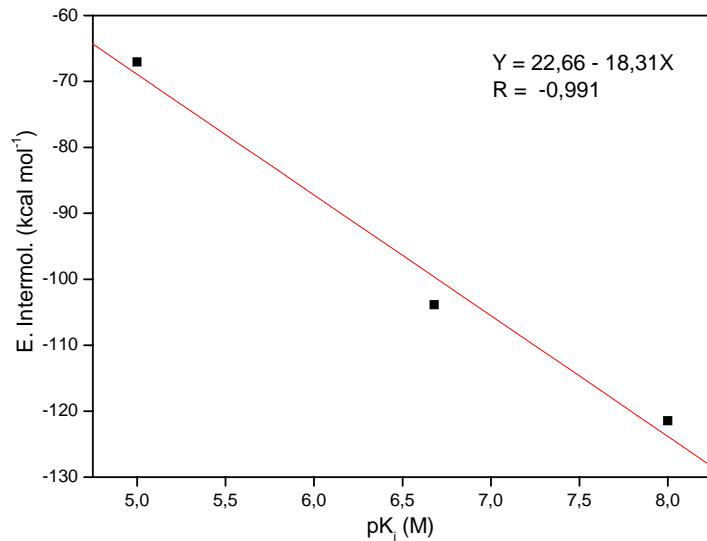


FIGURA 6 Correlação entre os valores constante de inibição e energia intermolecular obtida com o ancoramento molecular para os inibidores do grupo 2, descritos por Boutellier et al. (1994).

Como mencionado anteriormente, também foram realizados estudos por ancoramento molecular entre a *BaNH* e os substratos naturais inosina, uridina e adenosina (Tabela 5), com o objetivo de conhecer as importantes ligações hidrogênio que ocorrem entre os substratos naturais e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, compará-las com as interações realizadas pelos ligantes estudados (Tabelas 3 e 4) e, assim, eleger estruturas de possíveis protótipos de inibidores para a *BaNH*.

TABELA 5 Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia, em kcal/mol) entre os substratos naturais das NHs e a enzima *BaNH*, os valores de energia intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol) e os valores de K_M (μM) (Versées, et al., 2002).

Composto	Resíduos	Dist. (Å)	Energia (kcal/mol)	E. Intermol. (kcal/mol)	E. ligação hidrog.* (kcal/mol)	K_M (μM)
inosina	Asn160	3,16	-2,21	-110,57	-13,33	5,37
	Glu171	3,80	-2,50			
	Asn173	2,79	-2,50			
	Thr125	3,23	-1,83			
	Asp38	3,22	-1,91			
	Asp247	3,50	-0,09			
	His80	3,29	-1,53			
uridina	Asn160	3,43	-0,86	-91,32	-9,15	586
	Asn173	3,14	-2,32			
		3,27	-0,29			
	Asp38	2,73	-2,50			
	Tyr243	3,10	-2,50			
	His80	3,30	-0,68			

...continua...

TABELA 5, Cont.

	Asn173	2,78	-2,50			
	Thr125	3,23	-1,86			
adenosina	Asp247	3,58	-0,01			
		3,34	-1,31	-106,97	-10,13	8
	Asp38	2,91	-2,50			
	His80	3,21	-1,95			

* Energia de ligação hidrogênio total entre ligante e proteína.

Como pode ser observado na Tabela 5 e no gráfico da Figura 7, os resultados teóricos obtidos para o ancoramento da enzima *BaNH* com os substratos naturais corroboram resultados experimentais de K_M , propostos por Versées et al. (2002). O menor valor de K_M correspondente à inosina também foi o menor valor de energia intermolecular, ou seja, tem maior afinidade pela enzima *BaNH*; assim como o maior valor de K_M correspondente à uridina apresentou o maior valor de energia intermolecular, sugerindo que esta possui menor afinidade pela enzima *BaNH*.

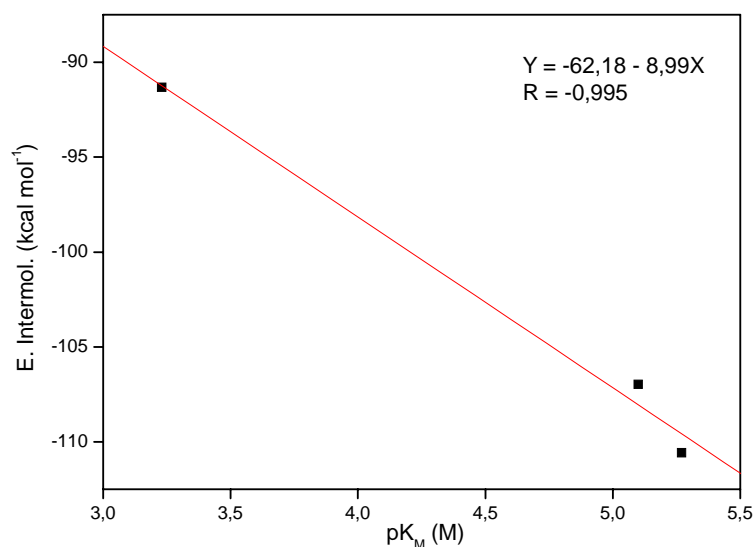


FIGURA 7 Correlação entre os valores de constante de afinidade e energia intermolecular obtida com o ancoramento molecular, para os substratos inosina, uridina e adenosina.

A *BaNH* interage com os substratos por meio de ligação hidrogênio com os resíduos dos aminoácidos Asn160, Glu171, Asn173, Asp247, Thr125, Asp38, His80, Tyr243 e Asp13, indicando que as principais interações são realizadas com aminoácidos hidrofílicos. Na Figura 8 está ilustrada a superfície eletrostática gerada em torno do sítio ativo da *BaNH*. O sítio ativo é predominantemente negativo, fato que favorece a entrada e a permanência de ligantes que contêm grupos positivos.

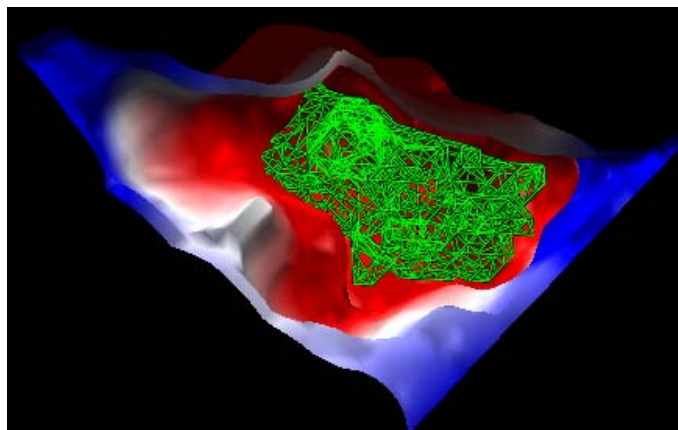


FIGURA 8 Superfície eletrostática gerada em torno do sítio ativo da enzima *BaNH*. Em vermelho, são representadas as regiões hidrofílicas; em azul, as regiões hidrofóbicas e, em verde, a cavidade.

Na Tabela 5 estão ilustradas as ligações hidrogênio entre cada substrato e o sítio ativo da enzima, assim como os valores de energia intermolecular e de ligação hidrogênio total. Na Figura 9 estão ilustradas a inosina (A) e a uridina (B), com suas respectivas interações com os resíduos do sítio ativo.

A inosina (FIG. 9A) interage com a enzima por meio de ligações do tipo ligação hidrogênio com os mesmos resíduos que interagem com a uridina (FIG. 9B), com exceção da Tyr243, porém, com distâncias e valores de energia diferentes (Tabela 5). Verifica-se que, exceto o Asp38, todos os outros resíduos interagem mais fortemente com a enzima, possuindo valores de distância menores e, conseqüentemente, um menor valor de energia. Adicionalmente, ligações com os resíduos Glu171, Thr125 e Asp247 são observadas, justificando os melhores resultados de ancoramento para a inosina, em relação à uridina.

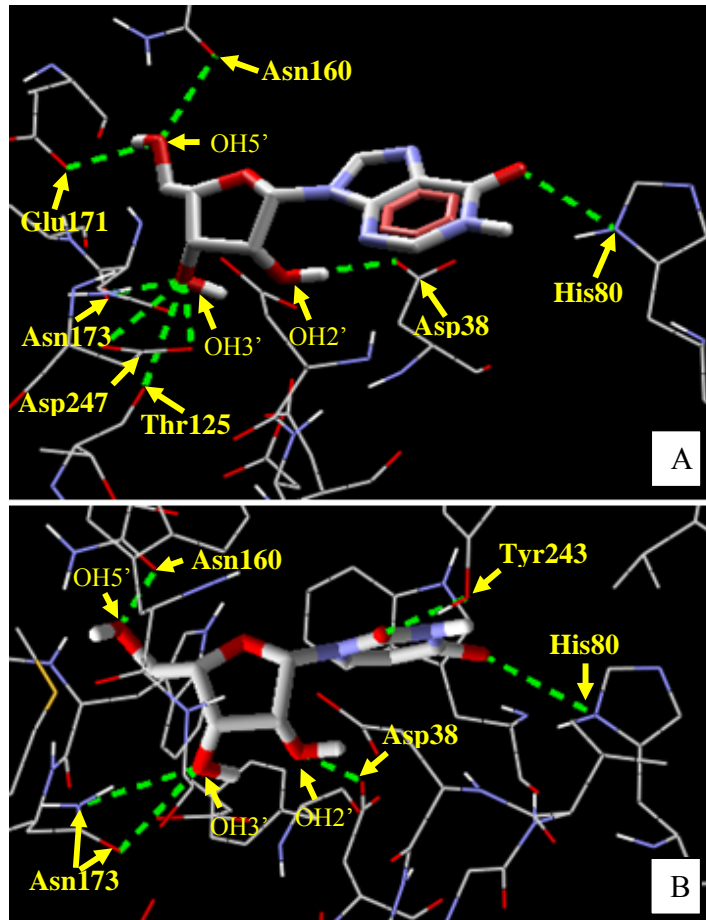


FIGURA 9 Ligações hidrogênio entre a inosina (A) e a uridina (B) e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

A uridina interage com a enzima por meio de seis ligações hidrogênio, duas a menos que a inosina (Figura 9). Isto, provavelmente, se deve à conformação adotada no ancoramento (uma pior sobreposição), fazendo com que as hidroxilas 3' e 5' do anel ribose se afastem dos resíduos hidrofílicos do sítio ativo e aproximem-se da carbonila do resíduo Tyr243, permitindo a interação e a consequente ligação hidrogênio (Figura 9B). Na Figura 10 podem-

se observar as diferenças de conformações nos ancoramentos da uridina (A) e da inosina (B).

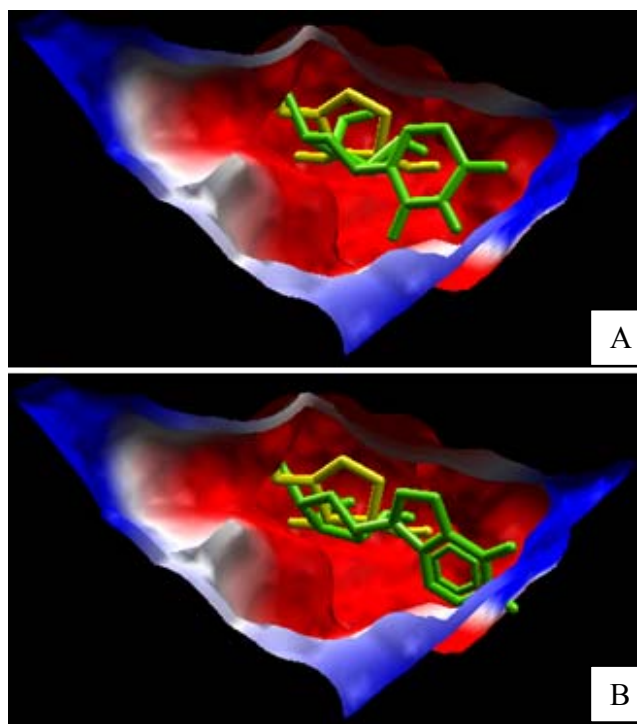


FIGURA 10 Sobreposições da uridina (A) e da inosina (B) com a ribose, após o ancoramento. A ribose é representada em amarelo, a inosina e a uridina em verde, as regiões hidrofílicas em vermelho e as hidrofóbicas em azul.

Como se pode ser observar nas Figuras 9 B e 10 A, a uridina apresentou uma conformação tal que se afastou dos resíduos do sítio ativo, ou seja, uma pior sobreposição dentro do sítio de ligação. Já a inosina (Figuras 5 A e 10 B) apresentou uma boa sobreposição, perfazendo oito interações com os resíduos de aminoácido, explorando mais o sítio de ligação.

A adenosina (Figura 11) interage com a *Ba*NH por meio de seis ligações hidrogênio, com os resíduos Asp38, Asn173 e His80, assim como a uridina. Verifica-se que o Asp38 possui a mesma energia de interação, porém, Asn173 e His80 interagem mais fortemente, ou seja, a interação na adenosina é mais estável do que em relação à interação na uridina (Tabela 5). A hidroxila 5' não interage com o resíduo Asn160 como ocorre na uridina, porém, a hidroxila 3' realiza uma interação com os resíduos Thr125 e duas com o Asp247, interações ausentes na uridina, justificando, assim, os melhores resultados de ancoramento, energia intermolecular de -106,97 kcal/mol e energia de ligação hidrogênio total de -10,13 kcal/mol, em relação à uridina, que apresentou valores de energias em -91,32 kcal/mol e -9,15 kcal/mol, respectivamente.

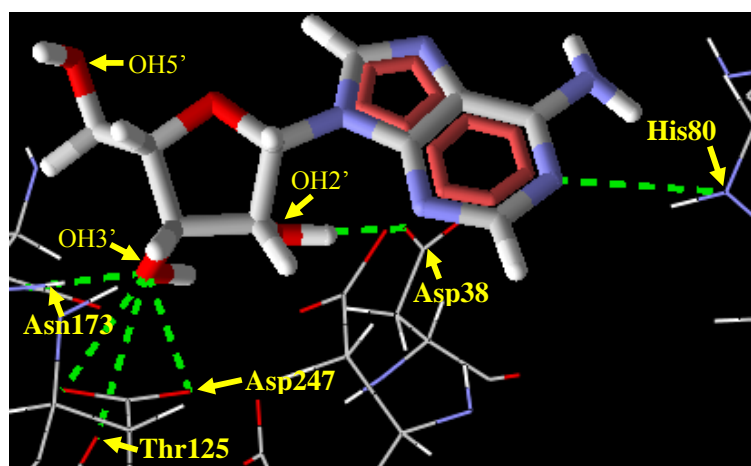


FIGURA 11 Ligações hidrogênio entre a adenosina e os aminoácidos do sítio ativo da *Ba*NH.

Foi realizada a sobreposição da *Ba*NH com a IAG-NH de *T. vivax*, (*Tv*NH) (Versées et al., 2006) (código no PDB 2FF2), utilizando o programa *SpdbViewer* 3.7 (Guex, 1997), tendo como objetivo a comparação entre os

resíduos dos sítios ativos de ambas as enzimas e a determinação do grau de identidade entre os resíduos dos sítios ativos. As coordenadas das enzimas sobrepostas foram copiadas para um único arquivo .pdb para avaliação, por meio do programa *MDV* (Thomsen & Christensen, 2006), dos resíduos dentro de uma distância de 11Å dos substratos em ambas as enzimas, que foram definidos como resíduos pertencentes aos sítios ativos. Como resultado dessa análise, foi observada alta similaridade entre os resíduos dos dois sítios ativos (Tabela 6). De um total de 37 resíduos, 81% são idênticos e 16% similares. Dessa forma, levando-se em conta a grande similaridade entre os resíduos dos sítios ativos, é possível utilizar inibidores de *TvNH* como pontos de partida em estudos de modelagem molecular para a proposição de inibidores seletivos de *BaNH*, uma vez que não se tem conhecimento de inibidores de *BaNH* reportados na literatura até o momento.

TABELA 6 Aminoácidos pertencentes aos sítios ativos da *BaNH* e da *TvNH*. Os aminoácidos iguais são representados em preto, os semelhantes em vermelho e os diferentes em roxo.

<i>BaNH</i>	<i>TvNH</i>	<i>BaNH</i>	<i>TvNH</i>	<i>BaNH</i>	<i>TvNH</i>
Thr250	Thr264	Asn173	Asn186	Trp77	Trp83
Val248	Ala262	Trp172	Trp185	Pro74	Pro80
Asp247	Asp261	Glu174	Glu184	Phe73	Phe79
Trp246	Trp260	Val161	Val174	Cys39	Cys41
Leu245	Ala259	Asn160	Asn173	Asp38	Asp40

...continua...

TABELA 6, Cont.

<i>BaNH</i>	<i>TvNH</i>	<i>BaNH</i>	<i>TvNH</i>	<i>BaNH</i>	<i>TvNH</i>
Tyr244	Tyr258	Gly153	Gly166	Ala37	Ala39
Tyr243	Tyr257	Gly152	Gly165	Asp14	Asp15
Leu196	Leu210	Met151	Met164	Asp13	Asp14
Thr195	Ser209	Trp150	Cys245	Val12	Leu13
Ile194	Phe208	Pro127	Pro139	Gly11	Asn12
Trp176	Trp189	Gly126	Gly138	Gly10	Gly11
Ser174	Ile187	Thr125	Thr137	Asp9	Asp10
				His80	His247

Em relação aos inibidores, como se observado nas Tabelas 3 e 4 e nas Figuras 4, 5 e 6, os resultados teóricos obtidos pelos ancoramentos na *BaNH* apresentam boa correlação com os resultados experimentais. O menor valor de K_i para cada classe de compostos também foi o menor valor de energia intermolecular, ou seja, o composto é mais estável possuindo maior interação com a proteína, sendo, portanto, candidato a um inibidor mais eficiente. Da mesma forma, o maior valor de K_i apresentou o maior valor de energia intermolecular, sugerindo que esse ligante apresenta menor interação com a enzima, sendo menos estável e, portanto, candidato a um inibidor menos eficiente da *BaNH*.

O composto 1 interage com a *BaNH* por meio de sete ligações hidrogênio, com os mesmos resíduos que a inosina, porém, com um a menos

(Tabelas 3 e 5). Essa interação é formada entre a carbonila da inosina e o aminoácido His80. As sete interações que o composto 1 realiza são com as hidroxilas 2', 3' e 5' do anel ribose. Esse ligante não apresentou boa conformação em relação ao ancoramento, ou seja, não adotou uma posição adequada no interior do sítio ativo (FIG. 12). Esse resultado sugere que o substituinte amida não fez nenhuma interação do tipo ligação hidrogênio com os resíduos próximos do sítio ativo e, conseqüentemente, não foi um bom substituinte, sendo, dentre os inibidores propostos por Goeminne e colaboradores (Goeminne et al., 2008a, 2008b), o que apresentou o pior valor de energia intermolecular (-71,18 kcal/mol) e energia de ligação hidrogênio total de -13,00 kcal/mol. Este resultado está de acordo com os dados experimentais, já que este composto também apresentou o maior valor de constante de inibição.

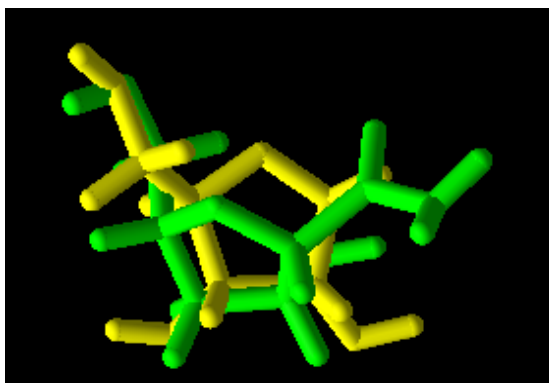


FIGURA 12 Sobreposição do composto 1 (verde) com a ribose (amarelo), após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

O composto 2 interage com a enzima através de oito ligações hidrogênio, uma a mais que o composto 1, fazendo interações com os mesmos resíduos e com valores de energia iguais, exceto para o Thr125 (Tabela 3). Não interage com os resíduos Asn160 e Asp38, porém, adicionalmente, perfaz ligações com

os resíduos Asp14 e Asp9, além de fazer uma interação a mais com o Asp247, justificando, assim, os melhores resultados em relação ao composto 1. O grupo amônio é responsável pela interação com o resíduo Asp9, sendo, provavelmente, fundamental para a estabilização do composto no sítio ativo. As interações desse inibidor com os resíduos do sítio ativo da *BaNH* estão ilustradas na Figura 13.

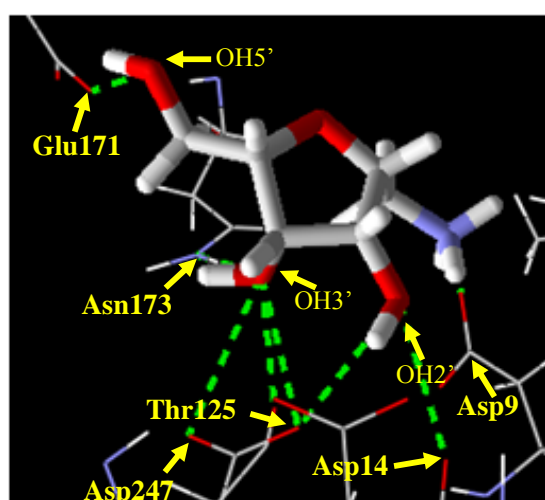


FIGURA 13 Ligações hidrogênio entre o composto 2 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

Pode-se observar que o composto 2 apresenta boa conformação no sítio ativo, ou seja, melhor posicionamento (sobreposição e orientação do anel ribose) no interior do sítio ativo, adotando uma conformação similar à da ribose (FIG. 14). O melhor ancoramento em relação ao composto 1 também justifica o melhor resultado obtido para este composto.

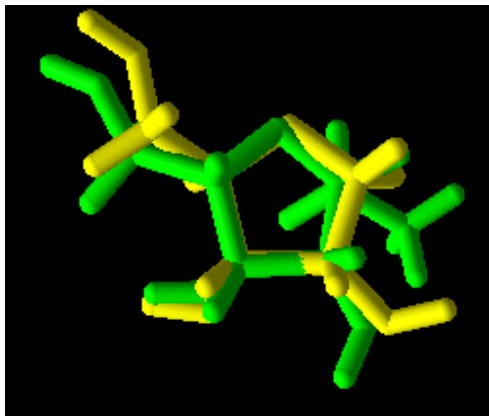


FIGURA 14 Sobreposição do composto 2 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

O composto 3 interage com a enzima por meio de nove ligações hidrogênio, uma a mais que o composto 2 (Tabela 3); a hidroxila 5' realiza duas interações com os resíduos Asn160, uma com o oxigênio e a outra com o nitrogênio, além de interagir com o resíduo Glu171. A hidroxila 2' também interage com um resíduo a mais, o Asp14, e, adicionalmente, o grupo guanidina do substituinte interage com o resíduo Trp77 (FIG. 15).

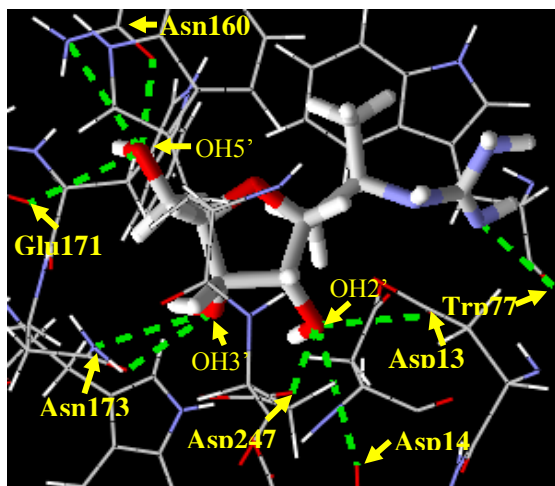


FIGURA 15 Ligações hidrogênio entre o composto 3 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

A conformação adotada pelo composto 3, após o ancoramento no sítio ativo, está ilustrada na Figura 16, na qual se pode verificar que esse composto também apresentou boa sobreposição no sítio de ligação.



FIGURA 16 Sobreposição do composto 3 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

O composto 4 interage com a *BaNH* por meio de seis ligações hidrogênio, três a menos que com o composto 3 (Tabela 3). Não realiza as interações com os resíduos Glu171 e Asp13 das hidroxilas 5' e 2', respectivamente, presentes no composto 3, porém, o grupo guanidina do substituinte interage com o resíduo Asp38, além da interação com o resíduo Trp77 ser mais estável, possuindo um raio menor e, conseqüentemente, menor energia. A interação com o resíduo Asn173 na hidroxila 3' também é mais estável (Tabela 3). As interações desse inibidor com os resíduos do sítio ativo da *BaNH* estão ilustradas na Figura 17.

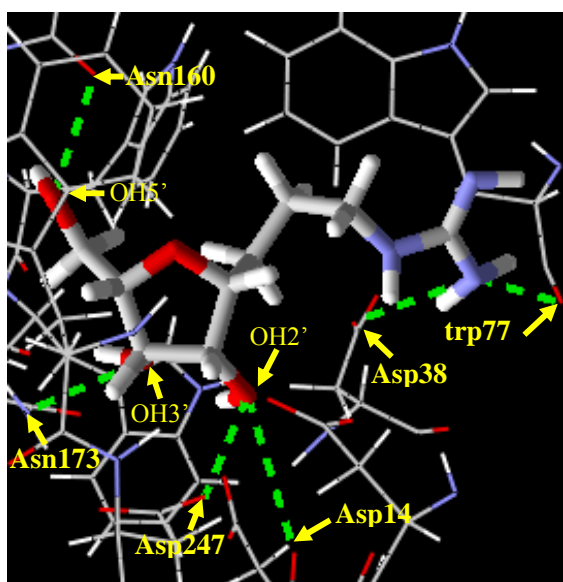


FIGURA 17 Ligações hidrogênio entre o composto 4 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

O composto 4 apresenta uma conformação após o ancoramento similar à do inibidor 3 (Figura 16) no sítio ativo, muito provavelmente devido à semelhança entre as suas estruturas (Figura 18).

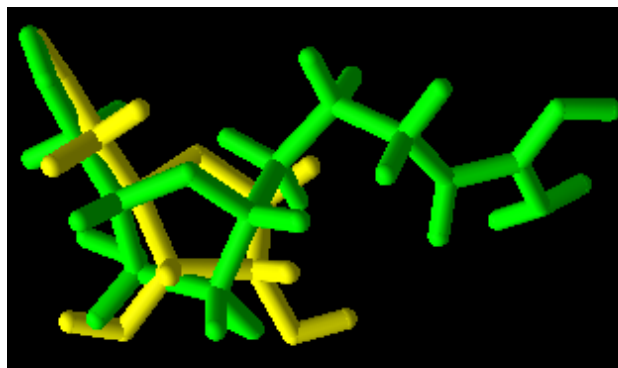


FIGURA 18 Sobreposição do composto 4 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

No entanto, pode-se observar que, possuindo um grupo metila na cadeia principal, o composto é capaz de explorar mais o sítio ativo (Figura 19) e, conseqüentemente, aumentar o potencial inibitório. Assim, pode-se atribuir o melhor resultado obtido no estudo por ancoramento do composto 4, em relação ao 3, às ligações com os resíduos de aminoácidos e à orientação do substituinte no sítio ativo.

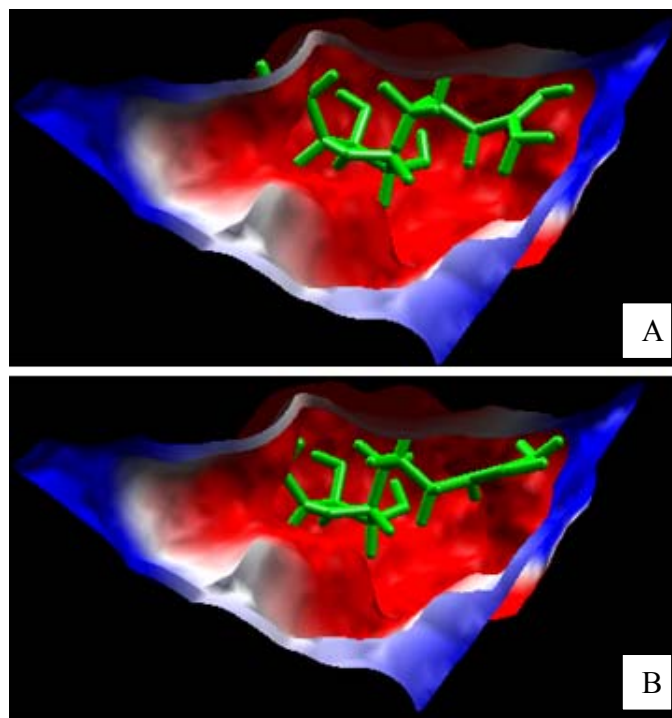


FIGURA 19 Orientação dos ligantes 3 (A) e 4 (B), após o ancoramento no sítio ativo da *BaNH*. Em vermelho, regiões hidrofílicas e, em azul, regiões hidrofóbicas.

Como se observado na Figura 19B, o composto 4 adquiriu uma conformação capaz de ocupar mais o sítio ativo. Isso se deve ao aumento da cadeia principal com a inserção do grupo metila, fazendo com que o NH_2 do grupo guanidina se aproximasse do resíduo Asp38, permitindo a interação e a consequente ligação hidrogênio bastante estável (FIG. 17).

O composto 5 interage com a enzima por meio de oito ligações hidrogênio, duas a mais que o composto 4 (Tabela 3). A hidroxila 5' realiza interação com os dois grupamentos amina do aminoácido Asn173, enquanto o composto 4 realiza apenas uma com o resíduo Asn160. A hidroxila 3', assim

como no composto 4, realiza interação com o resíduo Asn173, porém, essa ligação é mais estável. Adicionalmente, esse composto interage com os resíduos Thr125 e Asp247. Já a hidroxila 2', apesar de não interagir com o resíduo Asp14, interage fortemente com o Asp13 (Figura 20).

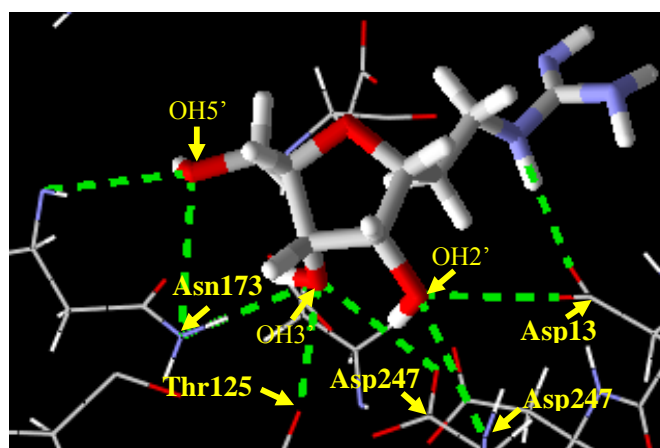


FIGURA 20 Ligações hidrogênio entre o composto 5 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

A energia de ligação hidrogênio total do composto 5 é superior às dos compostos 3 e 4 (Tabela 3). Isso se deve ao fato de algumas ligações hidrogênio serem mais intensas, já que esses compostos são semelhantes estruturalmente e apresentam conformações similares após o ancoramento no sítio ativo da enzima.

A 3-deaza-adenosina (composto 6) interage com a enzima por meio de oito ligações do tipo ligação hidrogênio com os mesmos resíduos que interagem com a inosina (Tabelas 3 e 5), porém, com distâncias e valores de energia diferentes, sendo as interações com os resíduos Asp247, Asp38 e His80 mais estáveis. Ou seja, interage mais fortemente com a enzima, possuindo valores de

distância menores e, conseqüentemente, menor valor de energia. Adicionalmente uma ligação com os resíduos Val12 foi observada, justificando os melhores resultados de ancoramento para o composto 6 (energia intermolecular de -114,42 kcal/mol e energia de ligação hidrogênio total de -15,18 kcal/mol) em relação à inosina (energia intermolecular de -110,57 kcal/mol e energia de ligação hidrogênio total de -13,33 kcal/mol).

Foi também observado que a 3-deaza-adenosina mostrou-se mais eficiente, realizando todas as interações que a adenosina, de forma mais intensa, ou seja, mais estável (Tabelas 3 e 5). Além disso, a 3-deaza-adenosina interage com os resíduos Glu171, Asn160 e Val12, ausentes na adenosina. As interações da 3-deaza-adenosina com os resíduos do sítio ativo da *BaNH* estão ilustradas na Figura 21.

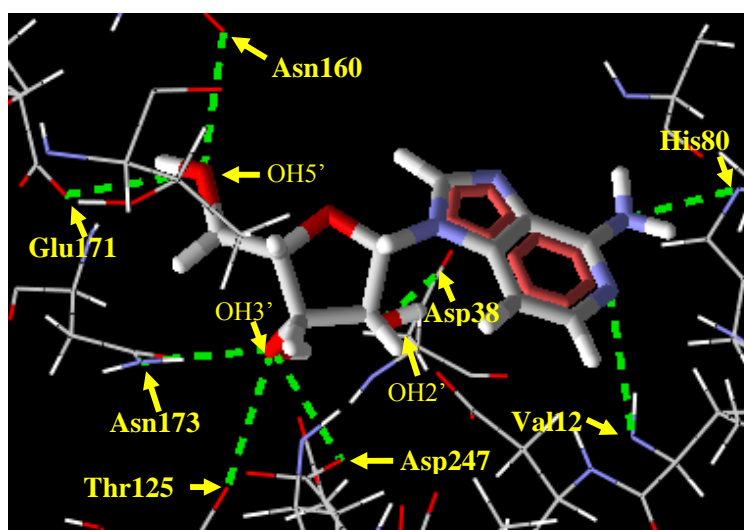


FIGURA 21 Ligações hidrogênio entre o composto 6 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

Além de a 3-deaza-adenosina realizar diversas interações estáveis com os aminoácidos próximos ao sítio ativo, verificou-se que este composto também apresenta boa orientação no sítio de ligação, ocupando toda a cavidade (Figura 22).

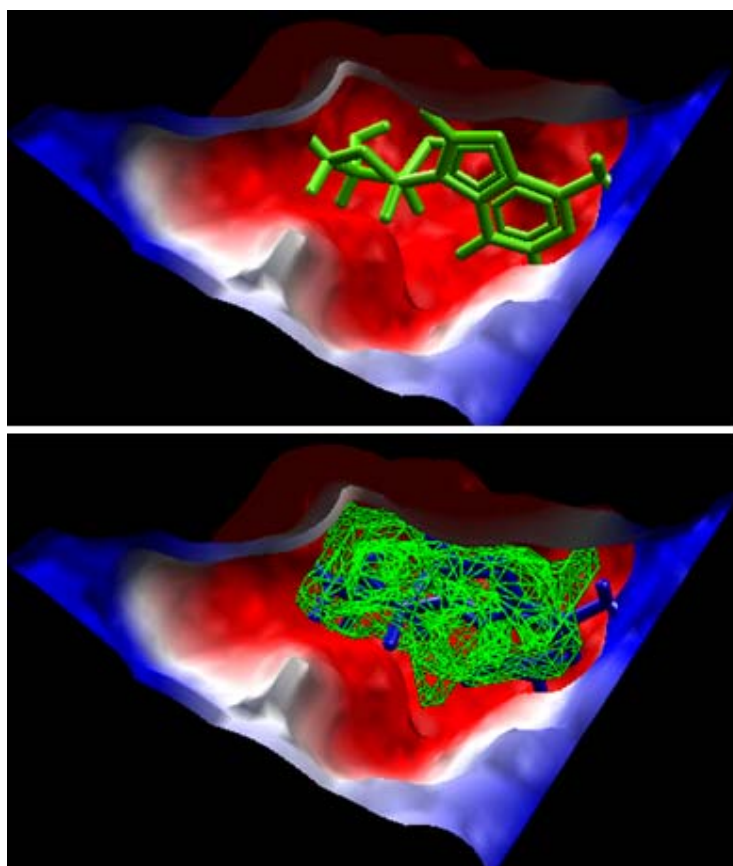


FIGURA 22 Orientação do composto 6 após o ancoramento no sítio ativo da *BaNH*. Em vermelho, regiões hidrofílicas; em azul, regiões hidrofóbicas e, em verde, a cavidade.

Na Figura 23 está ilustrado o posicionamento adotado pela 3-deaza-adenosina (sobreposição e orientação dos anéis), no interior do sítio ativo com relação à ribose.

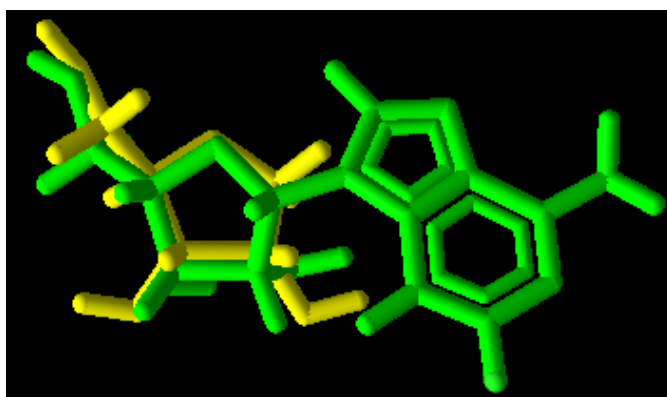


FIGURA 23 Sobreposição do composto 6 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

Os resultados dos estudos por ancoramento sugerem que, dentre os seis compostos que compõem o grupo 1 (inibidores que possuem a ribose em sua estrutura), o inibidor 6 mostrou-se o mais promissor, apresentando maior estabilidade no sítio ativo da *BaNH*. Com base nesses resultados, sugere-se que esse composto pode ser um promissor inibidor da *BaNH*. Esse resultado também corrobora resultados experimentais reportados por Goeminne e colaboradores, que apontam este composto como o de menor valor de constante de inibição, dentre os compostos do grupo 1.

Os compostos 7 a 12 pertencem à classe de inibidores em que o oxigênio do anel ribose foi substituído pelo átomo de nitrogênio.

Os resultados para o composto 7 mostram que ele interage com a *BaNH* por meio de oito ligações hidrogênio, assim como a inosina (Tabelas 3 e 5).

Essas interações ocorrem entre as hidroxilas 2', 3' e 5' do anel de cinco membros e os resíduos Asn160, Asn173, Thr125 e Asp38. O NH₂ do grupo guanidina também faz interação com o resíduo Asp38 (Figura 24).

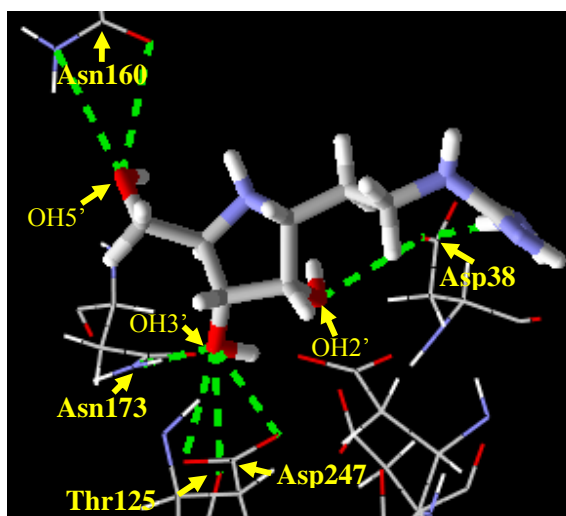


FIGURA 24 Ligações hidrogênio entre o composto 7 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

Verificou-se que, da mesma forma que o composto 5, o composto 7 (que tem substituintes idênticos) forma 8 ligações hidrogênio com o sítio ativo da *BaNH*, porém, com alguns resíduos diferentes. A hidroxila 5' do composto 7 interage com o resíduo Asn160 em vez de interagir com o Asn173, assim como a hidroxila 2' interage com o resíduo Asp38 em vez do Asp13 ou Asp247. E o grupo guanidina do composto 7 interage com o Asp38, enquanto, no composto 5, a interação é com o Asp13 (Figuras. 24 e 20).

Observa-se que, devido à substituição do oxigênio do anel ribose pelo nitrogênio (composto 7), o composto adquiriu uma conformação diferente no

sítio ativo da *BaNH*, o que pode ser um fator importante para explicar o maior poder inibitório observado experimentalmente, em relação ao composto 5.

Na Figura 25 está ilustrado o posicionamento adotado pelo composto 7 (sobreposição e orientação do anel), no interior do sítio ativo da *BaNH* em relação à ribose.

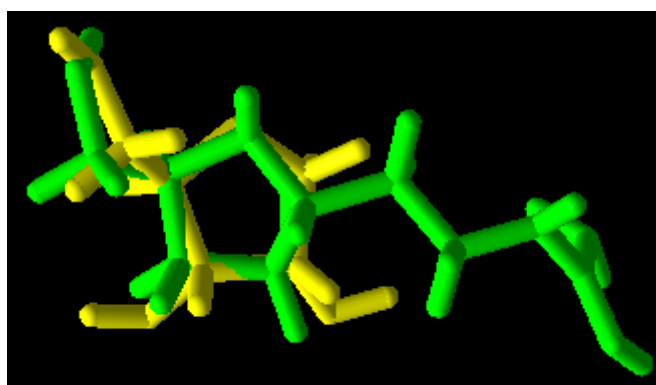


FIGURA 25 Sobreposição do composto 7 (verde) com a ribose (amarelo), após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

O composto 8 interage com a *BaNH* por meio de sete ligações hidrogênio, uma a menos que o composto 7. Contudo, ambos fazem ligações hidrogênio com os mesmos resíduos de aminoácidos, mas com diferentes valores de energia e distâncias de ligação. As ligações no composto 8 são mais estáveis, interagem mais fortemente com a enzima e têm valores de distância menores e, conseqüentemente, um menor valor de energia (Tabela 3). O composto 7 faz duas interações ausentes no composto 8, entre a hidroxila 5' e o resíduo Asn160, porém, essas interações não são muito intensas. Já o composto 8 interage fortemente com a Glu171 e a hidroxila 5', além de fazer duas ligações

entre o resíduo Asn173 e a hidroxila 2' e uma com o Asp9, enquanto o composto 7 liga-se apenas ao Asp38 (Figura 26).

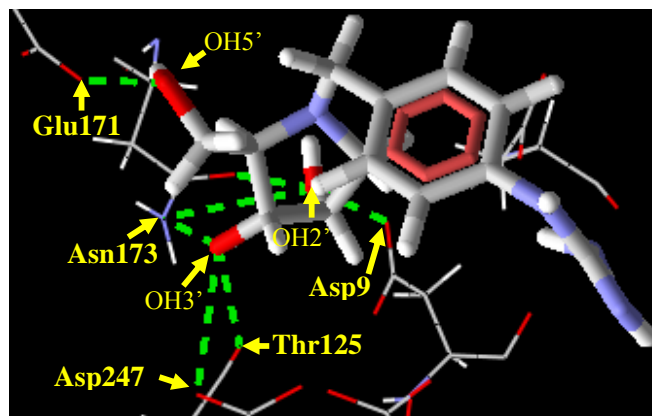


FIGURA 26 Ligações hidrogênio entre o composto 8 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

Apesar de o composto 8 fazer uma ligação hidrogênio a menos que o composto 7, ele apresenta menores valores de energia intermolecular (-108,63 kcal/mol) e de energia de ligação hidrogênio total (-10,80 kcal/mol), em relação ao composto 7, que apresentou valores de energias -91,32 kcal/mol e -9,15 kcal/mol, respectivamente. Essa maior estabilidade, provavelmente, se deve ao fato de as interações com os resíduos serem mais efetivas e também ao posicionamento adotado pelo composto 8 no sítio ativo da *BaNH* (Figura 27).

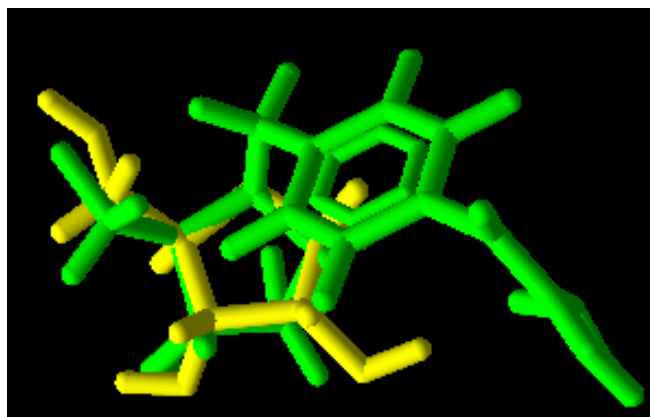


FIGURA 27 Sobreposição do composto 8 (verde) com a ribose (amarelo), após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

O imucilim A (composto 9) faz 11 ligações hidrogênio com a *BaNH*, quatro a mais que o composto 8. Interage com os mesmos resíduos, com exceção do Asp9 (Tabela 3). Verifica-se que os resíduos Glu171 e Thr125 possuem as mesmas energias de interação, contudo, os resíduos Asn173 e Asp247 interagem mais fortemente com a enzima, possuindo menores valores de energia em relação ao composto 8, sendo, assim, ligações mais estáveis.

No composto 9, a hidroxila 2' do anel ribose não interage com o Asp9 e a Asn173 (ligações presentes no composto 8), porém, interage com os resíduos Asp38, Asp247 e Asp14. Além disso, interações com os resíduos His80 e Val12 (ausentes no composto 8) são observadas, justificando os melhores resultados de ancoramento para o composto 9 (energia intermolecular de -110,51 kcal/mol e energia de ligação hidrogênio total de -16,97 kcal/mol) em relação ao composto 8 (energia intermolecular de -108,63 kcal/mol e energia de ligação hidrogênio total de -10,80 kcal/mol). As interações do composto 9 com os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH* estão ilustradas na Figura 28.

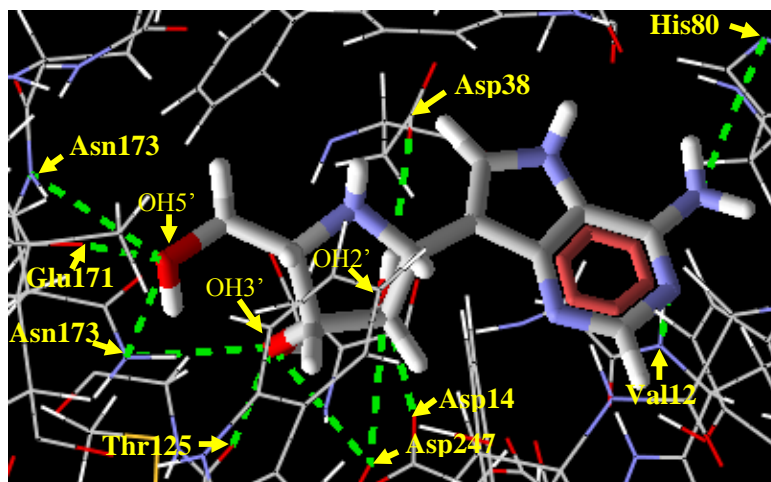


FIGURA 28 Ligações hidrogênio entre o composto 9 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

As interações com os resíduos His80 e Val12, provavelmente, se devem à conformação adotada pelo composto 9 após o ancoramento no sítio ativo da *BaNH*, fazendo com que o substituinte se aproxime dos respectivos resíduos, permitindo, portanto, a interação e o consequente estabelecimento das ligações hidrogênio.

A conformação adotada pelo composto 9 (sobreposição e orientação do anel), no interior do sítio ativo da *BaNH* em relação à ribose, está ilustrada na Figura 29.

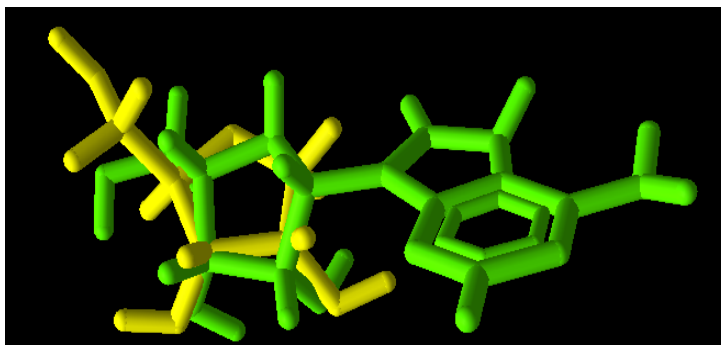


FIGURA 29 Sobreposição do composto 9 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

Os compostos 7, 8 e 9 pertencem à classe de inibidores, propostos por Goeminne e colaboradores, em que o oxigênio do anel ribose foi substituído pelo átomo de nitrogênio. Por meio do estudo por ancoramento foi possível observar que, assim como a 3-deaza-adenosina (composto 6), o imucilim A (composto 9) mostrou-se também promissor, apresentando maior estabilidade no sítio ativo da *Ba*NH em relação aos compostos 7 e 8. Este resultado sugere, portanto, que este composto também é um promissor inibidor da *Ba*NH em relação aos demais. Isso se deve ao melhor resultado de energia intermolecular obtido com o ancoramento (-110,51 kcal/mol) em relação aos valores obtidos para os compostos 7 e 8, além do resultado semelhante para a inosina (-110,57 kcal/mol) e melhores resultados em relação à uridina (-91,32 Kcal/mol) e adenosina (-106,97 kcal/mol). Os resultados teóricos obtidos para o ancoramento do inibidor 9 também corroboram resultados experimentais reportados por Goeminne et al. (2008a, 2008b), sendo, dentre os compostos deste grupo, o que apresenta o menor valor de constante de inibição (Tabela 3).

Os compostos 10 a 12 também pertencem à classe de inibidores em que o oxigênio do anel ribose foi substituído pelo átomo de nitrogênio, porém, são inibidores propostos por Boutellier et al. (1994).

O composto 10 (riboamidrazona) interage com a *BaNH* por meio de nove ligações hidrogênio, com os mesmos resíduos que a inosina, porém, um a menos (Tabelas 4 e 5). Essa interação é formada entre a carbonila da inosina e o aminoácido His80. As nove interações que o composto 10 realiza são com as hidroxilas 2', 3' e 5' do anel ribose. Contudo, o Asp38, além de interagir com a hidroxila 2', interage fortemente com o primeiro nitrogênio do substituinte. As interações do composto 9 com os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH* estão ilustradas na Figura 30.

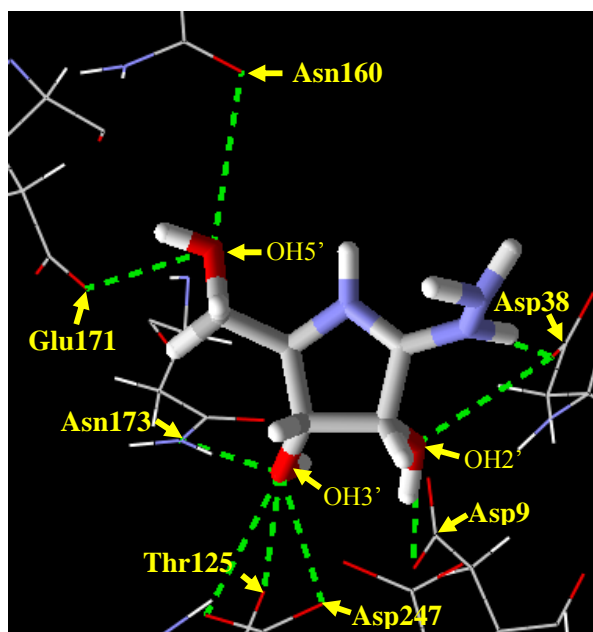


FIGURA30 Ligações hidrogênio entre o composto 10 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

A riboamidrazona, de acordo com os resultados obtidos por ancoramento, foi o inibidor que apresentou o pior valor de energia intermolecular (-67,05 kcal/mol). Este resultado está de acordo com os dados

experimentais propostos por Boutellier e colaboradores, já que foi o composto que apresentou o maior valor de constante de inibição (Tabela 4).

Apesar de a riboamidrazona não apresentar um bom resultado de energia intermolecular, pode-se observar que ela adotou boa conformação (sobreposição e orientação do anel ribose) no interior do sítio ativo da *BaNH* (Figura 31).

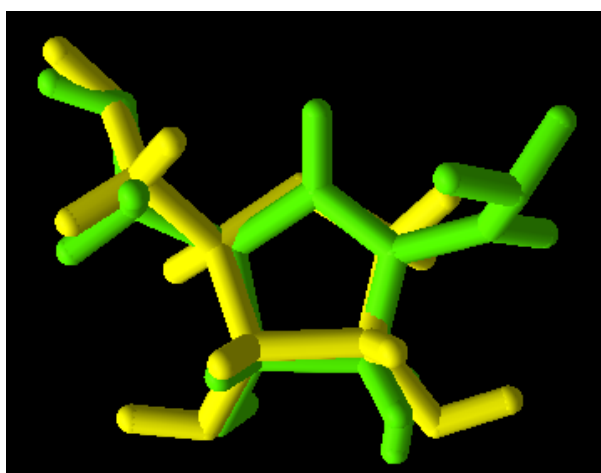


FIGURA 31 Sobreposição do composto 10 (verde) com a ribose (amarelo) após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

No entanto, pode-se observar que, possuindo um pequeno substituinte, o composto, apesar de adquirir uma boa conformação no sítio ativo, não é capaz de explorar toda a cavidade (FIG. 32). Assim, provavelmente, o pior resultado obtido no estudo por ancoramento se deve ao pequeno tamanho (ou volume) do substituinte do inibidor.

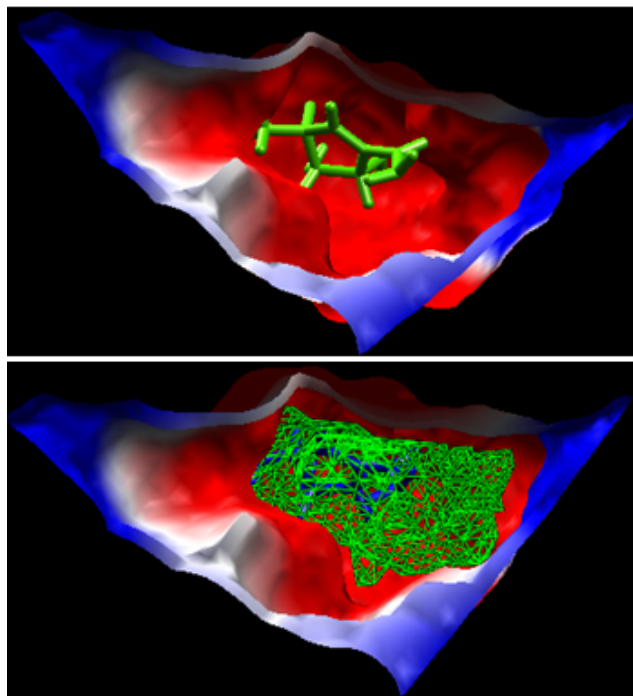


FIGURA 32 Orientação do composto 10 após o ancoramento no sítio ativo da *BaNH*. Em vermelho, regiões hidrofílicas; em azul, regiões hidrofóbicas e, em verde, a cavidade.

O composto 11 (fenil-riboamidrazona), assim como o composto 10, interage com a *BaNH* através de nove ligações hidrogênio, perfazendo ligações com os mesmos resíduos, com exceção do Asp9 (Tabela 4).

Verifica-se que os resíduos Glu171, Asn173, Thr125 e Asp38 têm as mesmas energias de interação. Contudo, os resíduos Asn160 e Asp247 interagem mais fortemente com a enzima, possuindo menores valores de energia em relação ao composto 10, sendo, assim, ligações mais estáveis.

No composto 10, a hidroxila 2' do anel ribose faz duas interações ausentes no composto 11 com os resíduos Asp38 e Asp9, porém, essas ligações

não são muito intensas. Já o composto 11 interage fortemente com o Asp247 e o Asp14. As interações do composto 11 com os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH* estão ilustradas na Figura 33.

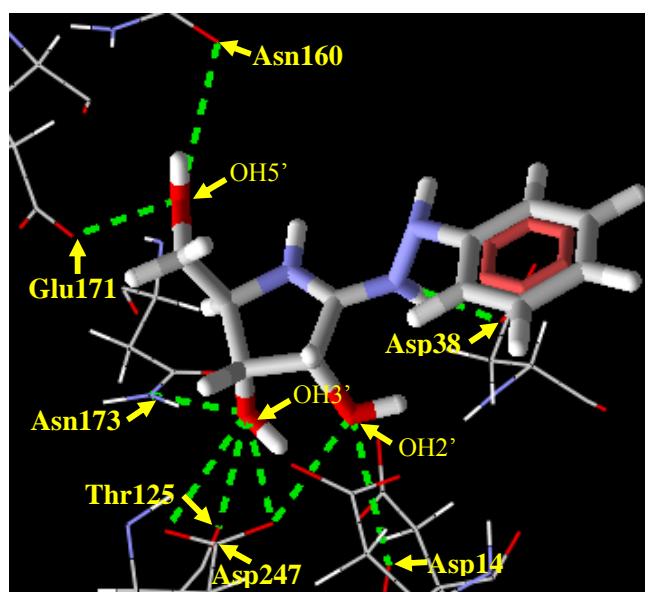


FIGURA 33 Ligações hidrogênio entre o composto 11 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

Na Figura 34 está ilustrada a conformação adotada pela fenil-riboamidrazona após o ancoramento no sítio ativo da *BaNH*. Pode-se verificar que, assim como a riboamidrazona, este composto também apresentou boa conformação (sobreposição e orientação do anel ribose) no interior do sítio.

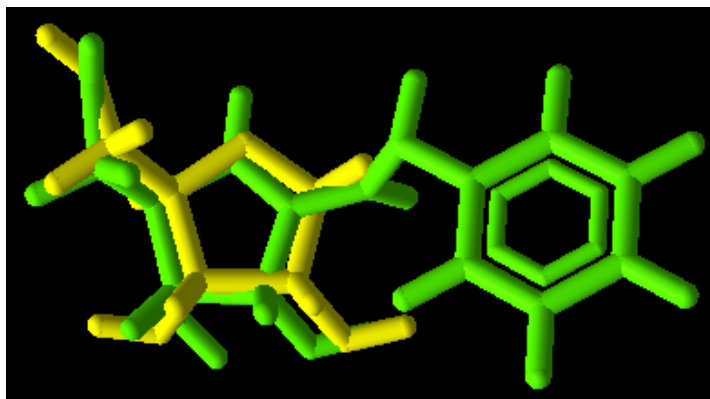


FIGURA 34 Sobreposição do composto 11 (verde) com a ribose (amarelo), após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

No entanto, pode-se observar que, substituindo um hidrogênio do NH_2 pelo grupo fenil, o composto é capaz de explorar mais a cavidade (FIG. 35) e, provavelmente, aumentar o potencial inibitório. Assim, pode-se atribuir o melhor resultado, energia intermolecular de $-103,85$ kcal/mol e energia de ligação hidrogênio total de $-17,38$ kcal/mol, em relação à riboamidrazona, que apresentou valores de energias em $-67,05$ kcal/mol e $-15,85$ kcal/mol respectivamente, ao aumento do substituinte e ao posicionamento adotado pela fenil-riboamidrazona no sítio ativo da *BaNH*.

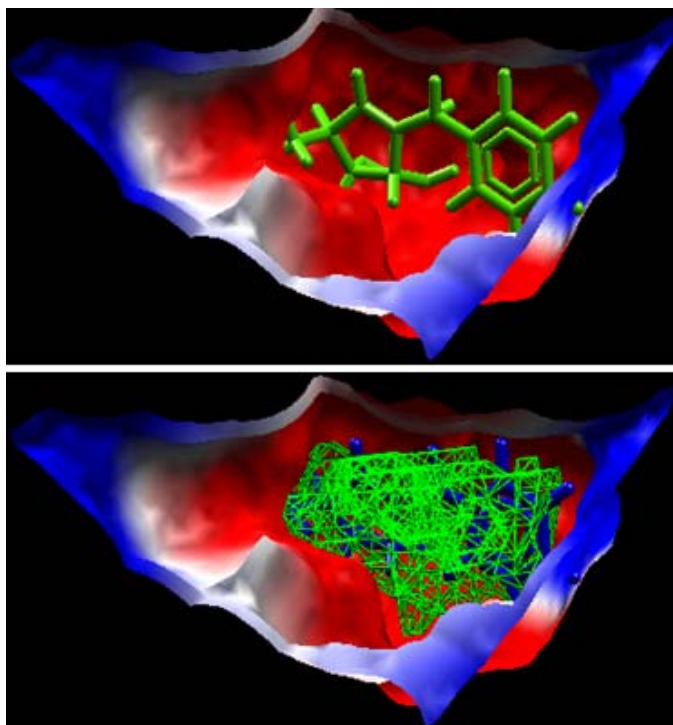


FIGURA 35 Orientação do composto 11 após o ancoramento no sítio ativo da *BaNH*. Em vermelho, regiões hidrofílicas; em azul, regiões hidrofóbicas e, em verde, a cavidade.

A para-nitro-fenil-riboamidrazona (composto 12) realiza 12 ligações de hidrogênio com a *BaNH*, três a mais que a fenil-riboamidrazona. As hidroxilas 2', 3' e 5' do anel de ribose, da mesma forma que para a fenil-riboamidrazona, interagem com os resíduos Asn160, Asn173, Thr125 e Asp247 (Tabela 4). Porém, a hidroxila 2' interage com o resíduo Asp13, enquanto que, para a fenil-riboamidrazona, a interação é com o Asp14 (FIGs. 33 e 36).

A hidroxila 5' da para-nitro-fenil-riboamidrazona não interage com o resíduo Glu171, contudo, o grupo nitro perfaz duas interações com os resíduos Val12 e His80, além de interagir com o Tyr243, ligações ausentes na fenil-riboamidrazona (Tabela 4).

As interações do para-nitro-fenil-riboamidrazona com os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH* estão ilustradas na Figura 36.

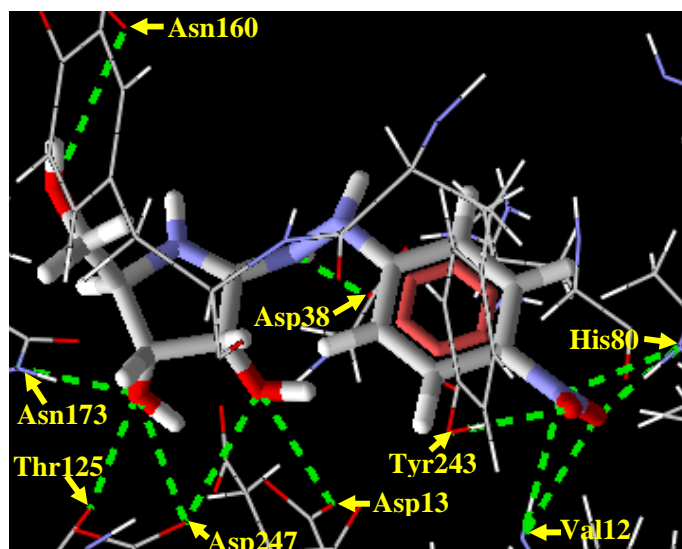


FIGURA 36 Ligações hidrogênio entre o composto 12 e os aminoácidos do sítio ativo da *BaNH*.

A para-nitro-fenil-riboamidrazona apresentou uma conformação (sobreposição e orientação do anel ribose) semelhante à da fenil-riboamidrazona no interior do sítio da *BaNH* (Figura 37).

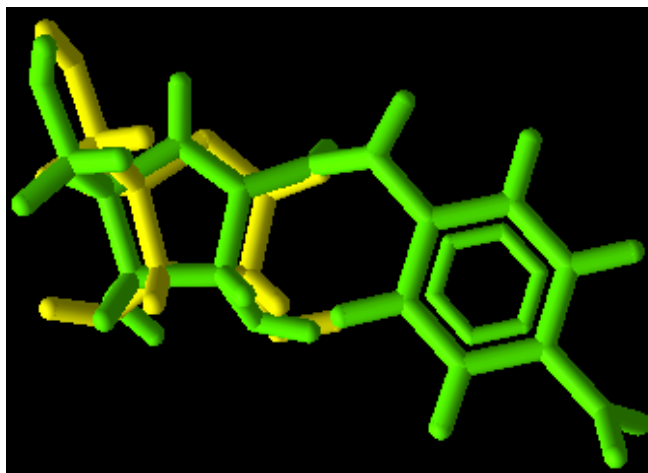


FIGURA 37 Sobreposição do composto 12 (verde) com a ribose (amarelo), após o ancoramento. Para melhor visualização, omitiu-se a proteína.

Contudo, o grupo nitro fez com que o substituinte se aproximasse dos resíduos Val12, His80 e Tyr243, permitindo, portanto, a interação e a consequente formação de ligações hidrogênio. Essas interações podem ser um fator importante para explicar o maior poder inibitório observado experimentalmente por Boutellier et al. (1994) para esse composto. É válido ressaltar que este resultado também foi obtido para o ancoramento, sendo a para-nitro-fenil-riboamidrazona, dentre todos os compostos estudados, o inibidor que apresentou mais interações do tipo ligações hidrogênio e, portanto, a menor energia de ligação hidrogênio total (-20,40 kcal/mol), assim como a menor energia intermolecular (-121,48 kcal/mol).

Verificou-se que a para-nitro-fenil-riboamidrazona foi o composto, dentre os 12 estudados, que adotou a melhor orientação no sítio de ligação da *BaNH*, ocupando toda a cavidade (Figura 38) e, provavelmente, realizando interações com os principais resíduos responsáveis pelo poder inibitório.

Este composto apresentou maior estabilidade no sítio ativo, realizando todas as interações presentes nos substratos naturais inosina, uridina e adenosina, além de apresentar melhor resultado de energia intermolecular e menor valor de constante de inibição (Tabelas 4 e 5). Esses resultados sugerem que a para-nitro-fenil-riboamidrazona seria o mais promissor inibidor da *BaNH*, dentre os 12 compostos, devido aos melhores resultados obtidos com o ancoramento em relação aos substratos naturais e aos demais compostos estudados.

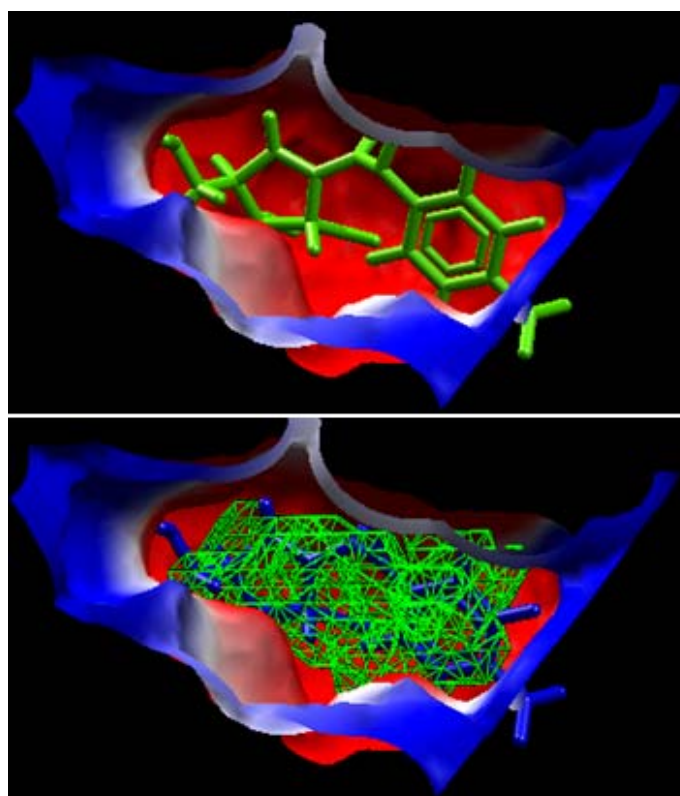


FIGURA 38 Orientação do composto 12 após o ancoramento no sítio ativo da *BaNH*. Em vermelho, regiões hidrofílicas; em azul, regiões hidrofóbicas e, em verde, a cavidade.

Com os resultados do ancoramento, verificou-se que interações entre os substituintes e os resíduos Val12, His80 são essenciais para aumentar o poder inibitório, já que os compostos eleitos no presente estudo como os mais promissores a serem prováveis inibidores de *BaNH*, a 3-deaza-adenosina o imucilim A e a para-nitro-fenil-riboamidrazona, realizam interações com estes sresíduos, além das demais interações observadas para os outros compostos.

5.2 Estudos por dinâmica molecular

Na dinâmica molecular, é possível estudar sistemas biomoleculares em simulações computacionais da ordem de nanossegundos, possibilitando observar o comportamento dinâmico do sítio ativo de uma enzima, observar quais as interações relevantes para a atividade dessa enzima e projetar estruturas de potenciais inibidores com base nestas observações (Patrick, 2002).

Após o estudo por ancoramento molecular, os compostos estudados como potenciais inibidores da *BaNH* e os substratos naturais inosina e uridina foram submetidos a simulações por dinâmica molecular, utilizando o campo de forças GROMOS 96 (Spoel et al., 2001). O objetivo dessas simulações foi observar o comportamento dinâmico desses compostos no sítio ativo da *BaNH* numa busca por informações adicionais para subsidiar a proposição de estruturas de potenciais inibidores para essa enzima.

Após a realização das etapas de otimização dos sistemas e dinâmica molecular de 6 ns, conforme descrito na seção de metodologia, foram gerados e analisados, para cada sistema, os gráficos de energia total, desvio padrão temporal e espacial e ligações hidrogênio formadas e mantidas ao longo das dinâmicas. Também foram extraídos quadros a intervalos definidos ao longo das dinâmicas, para analisar e comparar o comportamento dinâmico de cada ligante em cada sítio ativo com os principais resíduos que realizam interações

relevantes, de acordo com os resultados obtidos com o estudo por ancoramento molecular.

Os resultados das análises de energia e desvio padrão temporal e espacial para cada sistema estão descritos nos itens 5.2.1, 5.2.2.

5.2.1 Análise dos gráficos de variação da energia total

Os gráficos para a variação da energia total ao longo das dinâmicas mostraram que, para os 12 sistemas enzima/inibidor e os 2 sistemas enzima/substrato, a energia total tende à estabilidade a partir dos 2.000 ps. Isso pode ser observado pela média dos valores de energia representada pela linha vermelha no gráfico da Figura 39, que é praticamente uma reta logo após os 1.000 ps de simulação por DM, com uma variação de energia de aproximadamente $-0,04 \text{ kJ mol}^{-1}$, indicando que o valor médio da energia permanece constante e sugerindo, assim, estabilização estrutural dos sistemas *BaNH*/inibidores. Na Figura 39 está ilustrado o gráfico de energia para o composto 1. Os gráficos de todos os demais compostos apresentaram o mesmo perfil e são apresentados no Anexo C.

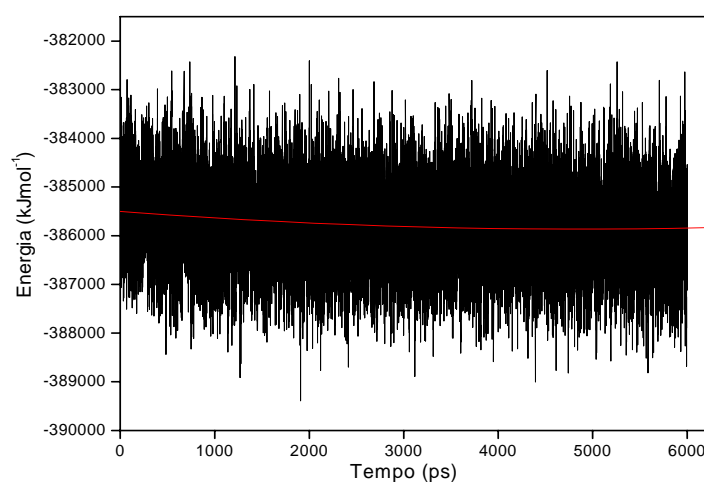


FIGURA 39 Variação da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 1.

5.2.2 Análise dos gráficos de desvio padrão

Também denominado desvio da raiz média quadrática (DRMQ), em inglês *root mean square deviation* (Spiegel, 1994), é o cálculo feito para comparação entre estruturas e, no caso dos resultados de DM, pode ser estendido à comparação entre as diversas conformações espaciais assumidas pelo sistema ao longo do tempo em relação à estrutura média deste conjunto, e para o DRMQ temporal, em relação à estrutura inicial do conjunto, excluindo-se o solvente. Esse parâmetro pode dar uma ideia do quanto a estrutura tridimensional flutuou ao longo do tempo, bem como permitir a observação de flutuações locais, como, por exemplo, quais os resíduos com maior mobilidade durante uma dinâmica, para o caso de proteínas.

Uma das formas de se obter valores quantitativos referentes à estabilidade do sistema é calculando-se o DRMQ para o esqueleto da estrutura da proteína em relação à estrutura média do conjunto (Spiegel, 1994).

Foram feitos cálculos de DRMQ temporal sobre todos os átomos dos complexos para 300 quadros, sendo sempre o posterior em relação ao anterior, um a cada 20 ps, perfazendo, assim, um total de 6,0 ns. Considerando-se que os complexos poderiam flutuar na caixa, cada quadro foi ajustado pelo método dos mínimos quadrados ao seu quadro precedente para efeito de cálculo de desvio padrão.

Pela Figura 40 pode-se observar a estabilização para a simulação *BaNH*/inibidor 12 em torno dos 200 ps iniciais. Esse comportamento foi comum a todas as 12 simulações para os sistemas *BaNH*/inibidores e os 2 sistemas *BaNH*/substrato, com desvios nunca ultrapassando 0,35 nm (3,5 Å), para a proteína e 0,31 nm (3,1 Å) para o inibidor. Esse resultado sugere que há uma boa interação entre a enzima e os inibidores, ou seja, os inibidores acomodam bem no sítio ativo, para os 6 ns simulados, mostrando estabilização do sistema e

corroborando os resultados obtidos por meio do cálculo de energia total, descrito anteriormente.

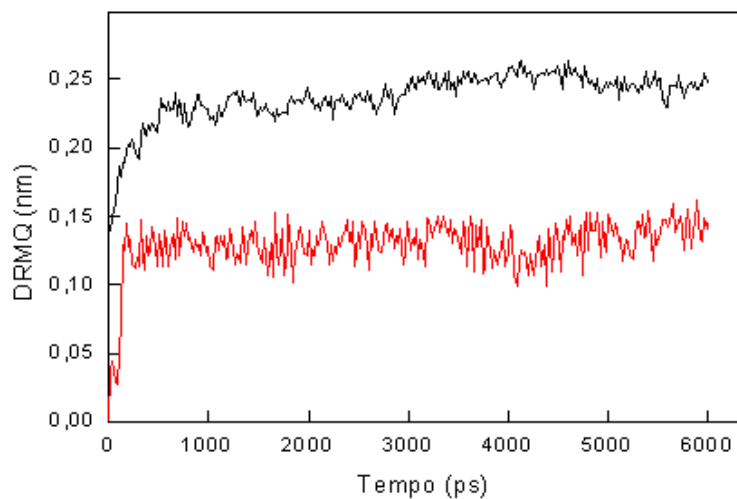


FIGURA 40 Variação DRMQ temporal para a simulação *BaNH*/inibidor 12. A curva da enzima é representada em preto e a do inibidor, em vermelho.

Na Tabela 7 é exibido o resultado geral para as médias e desvios padrões dos DRMQ temporais, bem como os desvios máximos. Nela estão avaliados os desvios para as *BaNH* e para os ligantes de forma independente. Para cada sistema, as médias de desvio para os ligantes sempre ficaram abaixo das médias das *BaNH* que, por sua vez, ficaram todas sempre abaixo de 0,19 nm (1,9 Å), indicando, assim, a estabilidade dinâmica das simulações.

TABELA 7 Médias dos DRMQ temporais e desvios médios tomados ao longo de cada sistema simulado.

Sistema		Média (nm/Å)	Desvio padrão	Máximo (nm/Å)
Sistema inosina	Proteína	0,299 (2,99)	0,0373	0,385 (3,85)
	Ligante	0,110 (1,10)	0,0182	0,147 (1,47)
Sistema uridina	Proteína	0,253 (2,53)	0,0167	0,286 (2,86)
	Ligante	0,131 (1,31)	0,0278	0,162 (1,62)
Sistema 1	Proteína	0,113 (1,13)	0,0071	0,149 (1,49)
	Ligante	0,031 (0,31)	0,0171	0,094 (0,94)
Sistema 2	Proteína	0,270 (2,70)	0,0256	0,315 (3,15)
	Ligante	0,055 (0,55)	0,0111	0,087 (0,87)
Sistema 3	Proteína	0,249 (2,49)	0,0213	0,286 (2,86)
	Ligante	0,103 (1,03)	0,0334	0,193 (1,93)
Sistema 4	Proteína	0,273 (2,73)	0,0281	0,327 (3,27)
	Ligante	0,199 (1,99)	0,0409	0,319 (3,19)
Sistema 5	Proteína	0,280 (2,80)	0,0322	0,331 (3,31)
	Ligante	0,159 (1,59)	0,0351	0,234 (2,34)
Sistema 6	Proteína	0,245 (2,45)	0,0188	0,269 (2,69)
	Ligante	0,080 (0,80)	0,0294	0,138 (1,38)
Sistema 7	Proteína	0,109 (1,09)	0,0064	0,154 (1,54)
	Ligante	0,051 (0,51)	0,0211	0,122 (1,22)
Sistema 8	Proteína	0,287 (2,87)	0,0344	0,357 (3,57)
	Ligante	0,102 (1,02)	0,0193	0,148 (1,48)
Sistema 9	Proteína	0,257 (2,57)	0,0207	0,287 (2,87)
	Ligante	0,070 (0,70)	0,0203	0,109 (1,09)
Sistema 10	Proteína	0,272 (2,72)	0,0292	0,312 (3,12)
	Ligante	0,022 (0,22)	0,0045	0,042 (0,42)
Sistema 11	Proteína	0,263 (2,63)	0,0297	0,310 (3,10)
	Ligante	0,052 (0,52)	0,0092	0,078 (0,78)
Sistema 12	Proteína	0,237 (2,37)	0,0173	0,263 (2,63)
	Ligante	0,130 (1,30)	0,0095	0,162 (1,62)

Com a análise do DMRQ temporal, pode-se ter noção da variação estrutural ao longo do tempo, porém, como se trata de uma medida do quadro no tempo posterior em relação à média, é necessária, ainda, uma medida que torne possível a observação da variação de cada resíduo do sistema, de forma que se possa observar, por exemplo, se houve maior ou menor variação da periferia da enzima, em relação ao sítio ativo. Com isso, é de grande importância o cálculo do DMRQ espacial.

Na Figura 41 são apresentados gráficos representando o DRMQ espacial calculado sobre cada resíduo. Os gráficos de DRMQ total (esqueleto peptídico mais cadeia lateral) estão em preto, somente do esqueleto peptídico (N, C α , C) em vermelho e somente das cadeias laterais em verde.

Para cada DMRQ espacial 2D (Figura 41), em conjunto, tem-se o DMRQ espacial 3D (FIG.42), a fim de ter-se uma visão qualitativa e quantitativa de todas as regiões ao longo das dinâmicas.

Para todos os sistemas dos gráficos, em conjunto com suas respectivas ilustrações de DRMQ espacial, pode-se ter uma visão das regiões que mais sofreram flutuações ao longo da dinâmica como aquelas que apresentam os maiores valores de DRMQ e os maiores espessamentos dos tubos, como as regiões de *loops*. Por outro lado, é comum que o DRMQ para os resíduos da região do sítio ativo e das alfa hélices e folhas beta sejam mais baixos, revelando as regiões mais estáveis, como ilustrado na Figura 42.

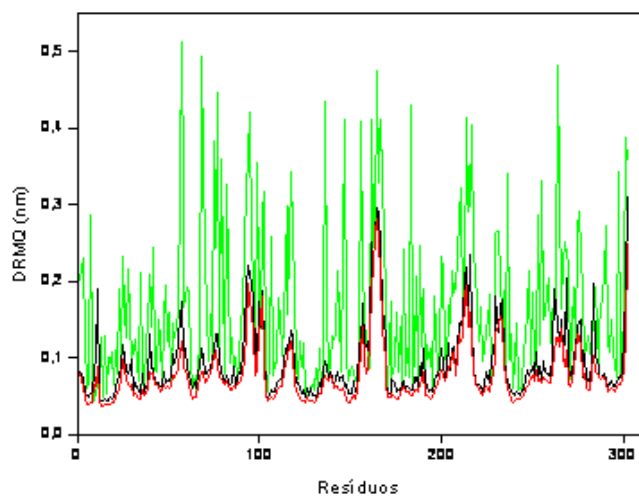


FIGURA 41 Variação DRMQ espacial para a simulação *BaNH*/inibidor 12. Em preto, a variação da *BaNH*; em vermelho, a cadeia principal e, em verde, a cadeia lateral.

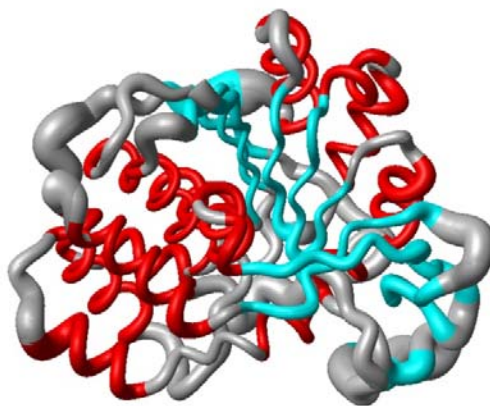


FIGURA42 Ilustração qualitativa do DRMQ espacial para o sistema *BaNH*/inibidor 12. Quanto maior a espessura do tubo, maior o DRMQ. O ligante foi omitido na figura.

5.2.3 Análise do comportamento dinâmico dos inibidores

Como ressaltado anteriormente, foram extraídos 300 quadros de cada dinâmica, gerados a cada 20 ps, perfazendo, assim, um total de 6,0 ns. Para viabilizar a visualização do comportamento dinâmico de cada inibidor dentro dos sítios ativos, foram selecionados, para cada sistema, os resíduos diretamente envolvidos com as principais interações com cada inibidor, de acordo com os resultados obtidos nos estudos por ancoramento molecular discutidos na sessão 5.1, bem como também eventuais resíduos que não tenham sido observados naqueles estudos. Também foram avaliados os dois sistemas *BaNH*/substrato.

Estes resultados, juntamente com os dados de energia por ancoramento molecular e de ligações hidrogênio totais formadas ao longo das simulações por DM, para cada sistema, serviram de base para estabelecer as principais características nos doze compostos estudados como potenciais inibidores e, assim, selecionar os mais promissores para o planejamento de potenciais inibidores para a enzima *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o substrato inosina no sítio ativo da *BaNH* (Figura 43) mostrou que a inosina está entre os resíduos Trp238, His80, Leu234 e Asn160, permanecendo durante toda a dinâmica dentro do sítio ativo. Foi possível, assim, confirmar a boa interação com a enzima, ou seja, a inosina se acomoda bem nas cavidades do sítio ativo da *BaNH*, para o tempo simulado, mostrando estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMQs, descrito anteriormente.

Como se observado na Figura 43 e nos gráficos de distância do apêndice C, a His80 se mantém em torno de 10 Å, enquanto a Asn160 se aproxima da inosina, corroborando resultado encontrado no estudo por ancoramento molecular. Por outro lado, verifica-se a presença da Leu234 e do Trp238 (Apêndice C). Esses resíduos, apesar de não realizarem interações hidrogênio

com a inosina (de acordo com o ancoramento molecular), podem ter contribuído para a permanência da inosina dentro do sítio da *BaNH*.

O estudo por ancoramento mostrou interações hidrogênio com sete resíduos de aminoácidos, resultado também sugerido pela DM por meio da análise do número de ligações hidrogênio formadas. Como é mostrado na Figura 44, houve a formação de até seis ligações hidrogênio entre a inosina e a *BaNH* ao longo da dinâmica.

Para a uridina, é observado que ela está entre os resíduos His80, Tyr 243 Trp238 e Trp235 e, assim como a inosina, se acomoda bem nas cavidades do sítio ativo da *BaNH*, para os 6000 ps simulados, sugerindo a estabilização do sistema e corroborando resultados de energia total e DRMQs. Contudo, verifica-se que a uridina adotou uma conformação diferente da inosina dentro do sítio da *BaNH*, confirmando o resultado proposto pelo ancoramento molecular, que sugeriu uma sobreposição diferente, devido à aproximação da carbonila da uridina com o resíduo Tyr243. Na Figura 45 está ilustrada a proximidade dos resíduos Tyr243 e His80 com as carbonilas da uridina, sugerindo novamente a interação com os respectivos resíduos. O Apêndice C ilustra, por meio do gráfico de distância, que ambos os resíduos se aproximam da uridina, com uma distância inicial de 10 Å e, aos 6000 ps, de, aproximadamente, 7 Å para a His80 e 6 Å para a Tyr243.

Como mostrado na Figura 46, houve a formação de até seis ligações hidrogênio entre a uridina e a *BaNH*, aproximadamente de 4.500 a 6,000 ps. Contudo, verifica-se a estabilidade de 4 a 3 ligações desde 100 a 4.500 ps, sugerindo mais um motivo para a estabilização da uridina dentro do sítio ativo da *BaNH*.

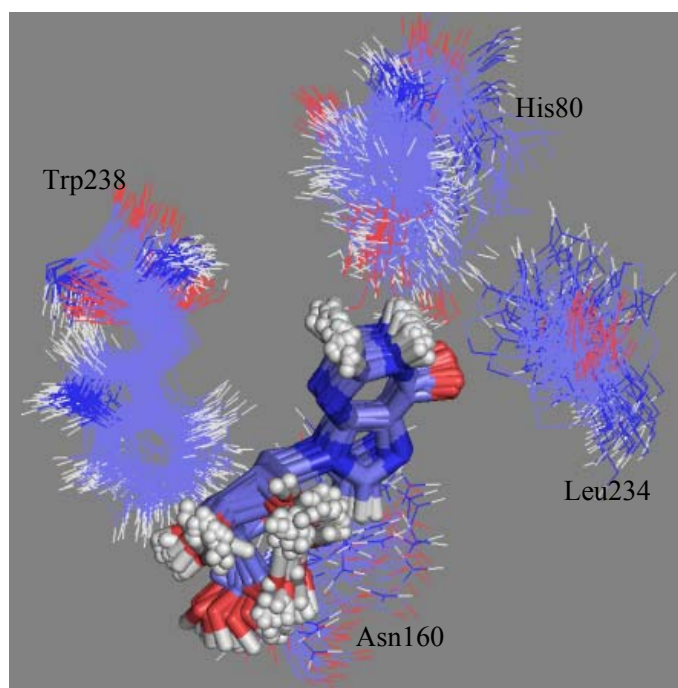


FIGURA 43 Quadros da dinâmica molecular da inosina no sítio ativo da *BaNH*.

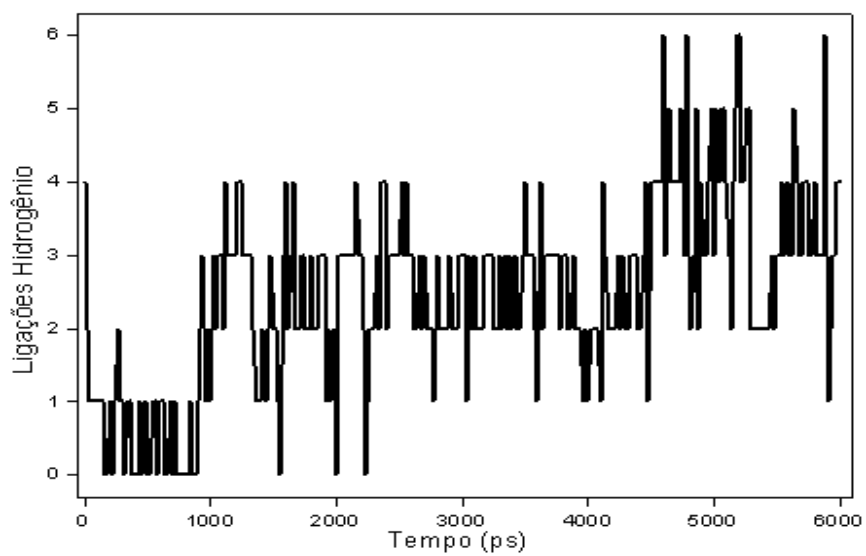


FIGURA 44 Número de ligações hidrogênio formadas entre a inosina e a *BaNH*.

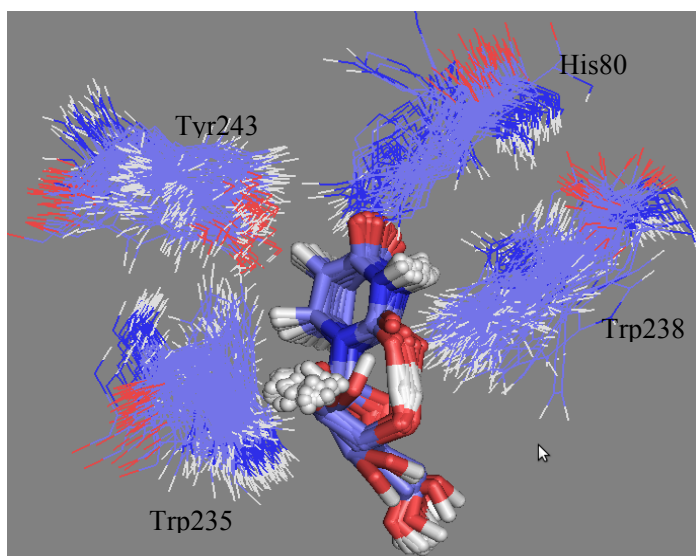


FIGURA 45 Quadros da dinâmica molecular da uridina no sítio ativo da *BaNH*.

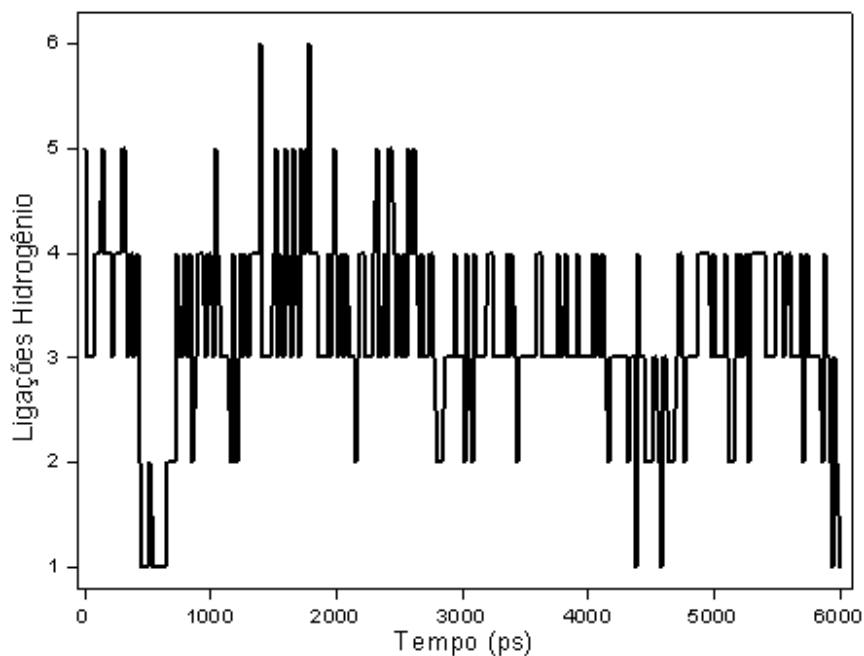


FIGURA 46 Número de ligações de hidrogênio formadas entre a uridina e a *BaNH*.

O substituinte do composto 1 não realizou nenhuma interação de hidrogênio com os aminoácidos do sítio ativo, segundo o estudo por ancoramento, porém, a sucessão dos quadros de DM mostrou que os resíduos Asp38 e Phe73 estão próximos do NH_2 do substituinte e, talvez, possam realizar interações (Figura 47), os gráficos de distância (Apêndice C) ilustram que esses resíduos se aproximam do composto, durante o tempo simulado.

Como está ilustrado na Figura 48, o composto 1 chegou a formar 7 ligações de hidrogênio nos primeiros picossegundos de simulação, resultado também obtido com o estudo por ancoramento. Contudo, essas ligações são instáveis, permanecendo apenas de 2 a 4 ligações até os 6.000 ps. Essa instabilidade é verificada pelos resultados de ancoramento, que mostraram que as interações entre o inibidor e os resíduos Asp247 e Asn160 são fracas (Tabela

3), sendo passíveis de se romper no decorrer da simulação por dinâmica molecular.

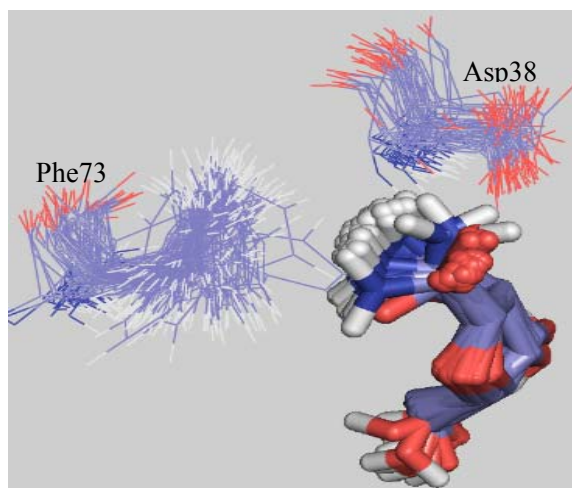


FIGURA 47 Quadros da dinâmica molecular do composto 1 no sítio ativo da *BaNH*

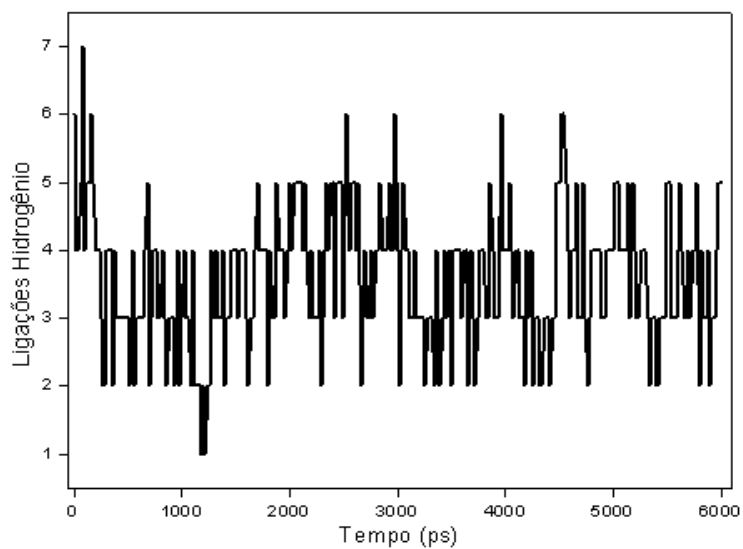


FIGURA 48 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 1 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o composto 2 no sítio ativo da *BaNH* (Figura 49) mostrou que essa molécula permanece bem ancorada no sítio, oscilando pouco em torno de sua posição inicial, mostrando estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMQs.

Verifica-se que o Asp9 se aproxima do grupo amônio do composto (Apêndice C), como sugerido pelo estudo por ancoramento molecular, confirmando, assim, a fundamental importância desse resíduo para a estabilização do composto no sítio ativo da *BaNH*, sendo, provavelmente, responsável pelo melhor poder inibitório em relação ao inibidor 1, resultado obtido experimentalmente por Goeminne et al. (2008a), bem como pelos cálculos teóricos realizados no presente trabalho.

O estudo por ancoramento molecular mostrou a formação de oito ligações hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo, resultado também obtido pela DM. Na Figura 50 é mostrada a formação de até oito ligações hidrogênio em torno dos 4.500 ps. Contudo, verifica-se a estabilidade de 4 a 6 ligações, desde o início do tempo até os 6.000 ps simulados. A formação de mais ligações bem como a maior estabilidade durante toda a dinâmica também confirmam o maior poder inibitório desse composto em relação ao primeiro.

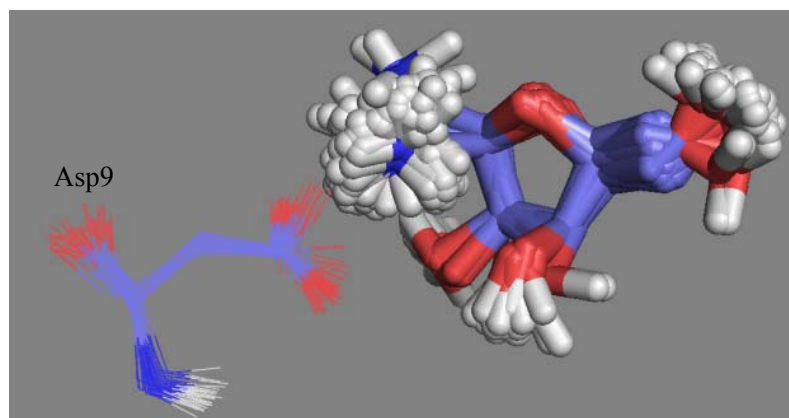


FIGURA 49 Quadros da dinâmica molecular do composto 2 no sítio ativo da *BaNH*.

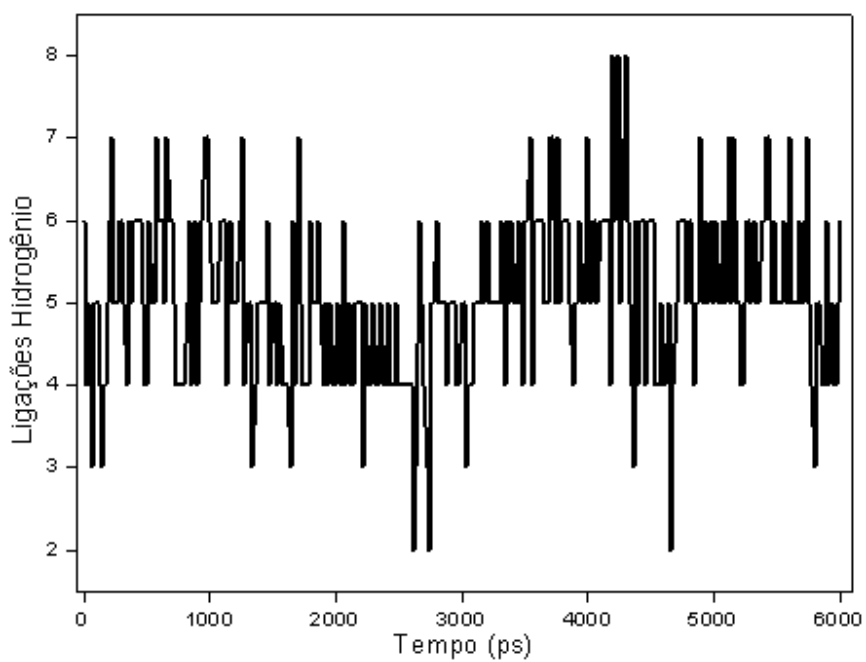


FIGURA 50 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 2 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o composto 3 no sítio ativo da *BaNH* (FIG. 51) mostrou que essa molécula está entre os resíduos Trp238, Asp13, Trp77 e Trp235, permanecendo ancorada dentro do sítio ativo, sugerindo, assim, a boa interação com a enzima. Ou seja, o composto 2 se acomoda bem nas cavidades do sítio ativo da *BaNH*, para o tempo simulado, mantendo a estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMQs, ancoramento molecular e dado experimental de constante de inibição, já que o composto 3 mostrou-se como mais potente inibidor em relação ao composto 2.

Como se observado na Figura 51 e nos gráficos de distância do Apêndice C, o Asp13 se mantém em torno de 8,5 Å, enquanto o Trp77 se aproxima do composto 3, permanecendo em, aproximadamente, 5,5 Å, provavelmente realizando ligações hidrogênio, corroborando o resultado encontrado no estudo por ancoramento molecular. Contudo, verificou-se que o Trp235 possui uma distância de aproximadamente 7,5 Å, e o Trp238 em torno de 4 Å a 5 Å (Apêndice C), apesar de não realizarem interações (de acordo com o ancoramento molecular), podem ter contribuído para a permanência do composto 3 dentro do sítio da *BaNH*, como mencionado anteriormente.

O número médio de ligações hidrogênio formadas entre o composto 3 e a *BaNH* ao longo dos 6.000 ps simulados pode ser visto na Figura 52. Verifica-se que houve a formação de até quatro ligações hidrogênio, sendo que, até 3.000 ps, aproximadamente, com permanência de duas ligações e, no tempo restante, permanência de uma ligação, sugerindo, novamente, a estabilização do composto 3 dentro do sítio ativo da enzima.

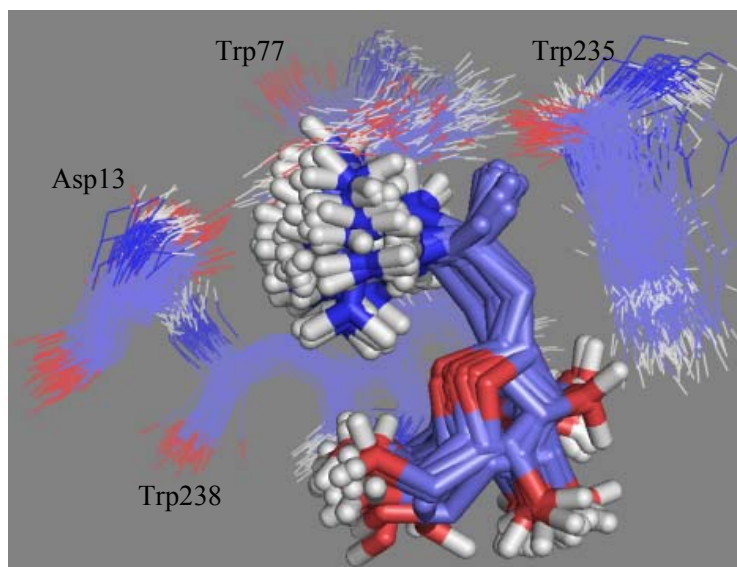


FIGURA 51 Quadros da dinâmica molecular do composto 3 no sítio ativo da *BaNH*.

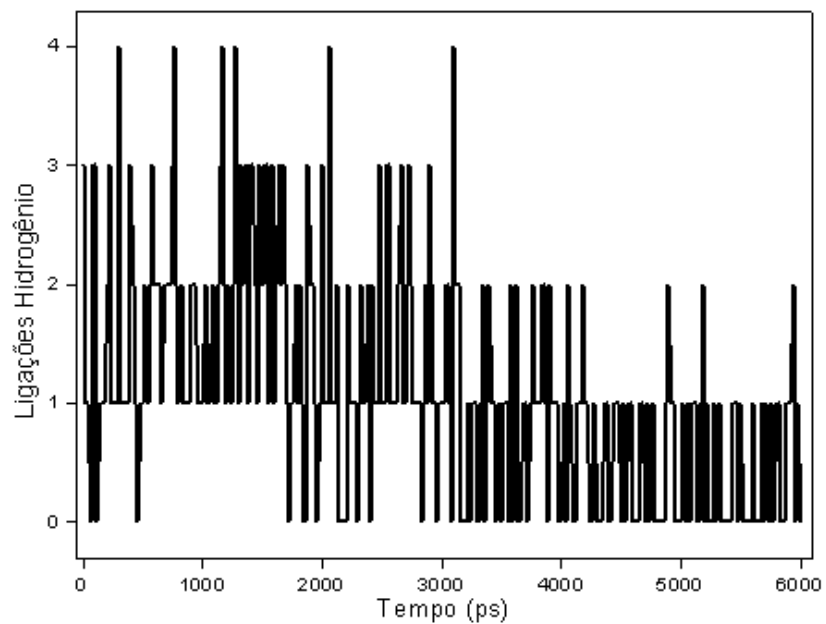


FIGURA 52 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 3 e a *BaNH*.

Na Figura 53 está ilustrada a sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o composto 4 no sítio ativo da *BaNH*. Verifica-se que o grupo guanidina do substituinte se aproxima do resíduo Asp38 (Apêndice C) e, provavelmente, realiza ligação hidrogênio, corroborando resultado obtido por ancoramento molecular.

O composto 4 chegou a formar oito ligações hidrogênio (Figura 54), duas a mais do que as observadas no estudo por ancoramento. Todavia, verifica-se a estabilidade de uma a quatro ligações, desde os primeiros ps até os 6.000 ps de simulação.

De acordo com os resultados obtidos por ancoramento molecular e confirmados por meio da dinâmica, o resíduo Asp38, provavelmente, é responsável pela estabilização do composto 4 no sítio ativo da *BaNH*. A maior estabilidade das ligações durante a dinâmica também confirma o maior poder inibitório deste composto em relação ao composto 3. Este resultado foi verificado também, experimentalmente, por Goeminne et al. (2008a).

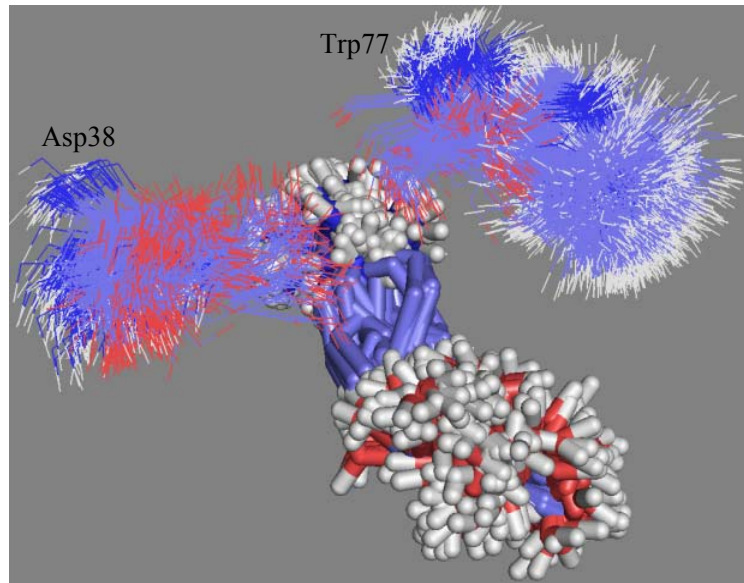


FIGURA 53 Quadros da dinâmica molecular do composto 4 no sítio ativo da *BaNH*.

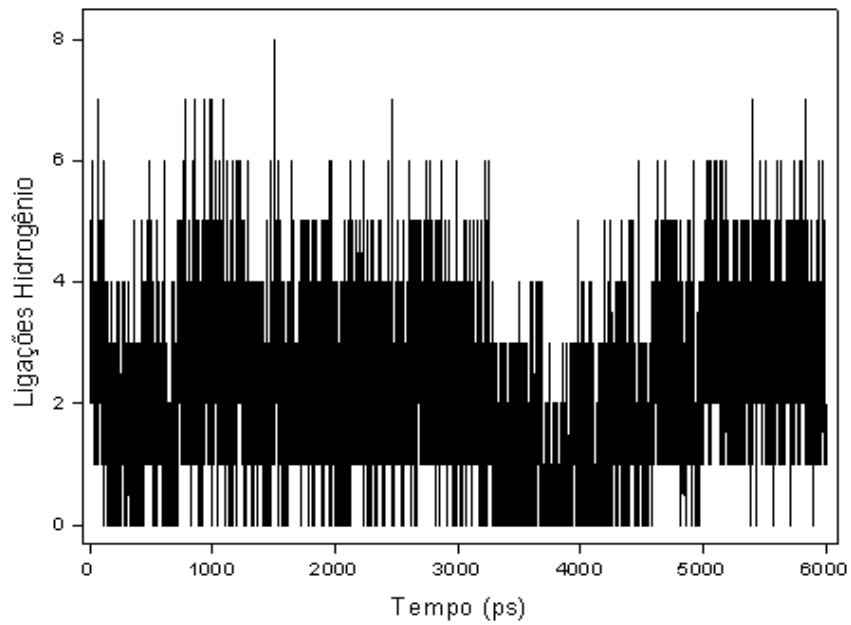


FIGURA 54 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 4 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o composto 5 no sítio ativo da *BaNH* (FIG. 55) mostrou que essa molécula permanece bem ancorada no sítio, oscilando muito pouco em torno de sua posição inicial, mostrando estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMJs. Verifica-se que o Asp13 está próximo do grupo guanidina do composto, com uma distância de, aproximadamente, 6,5 Å, durante os 6.000 ps simulados (Apêndice C), resultado sugerido também pelos estudos por ancoramento molecular, confirmando, assim, a fundamental importância deste resíduo para a estabilização do composto no sítio ativo da *BaNH*.

O estudo por ancoramento molecular mostrou a formação de ligação hidrogênio com quatro resíduos de aminoácidos do sítio ativo, resultado também obtido pela DM. Na Figura 56 é mostrada a formação de até quatro ligações hidrogênio em, aproximadamente, 3.000 ps. Contudo, verifica-se a estabilidade de uma ligação desde o início do tempo até os 6.000 ps simulados.

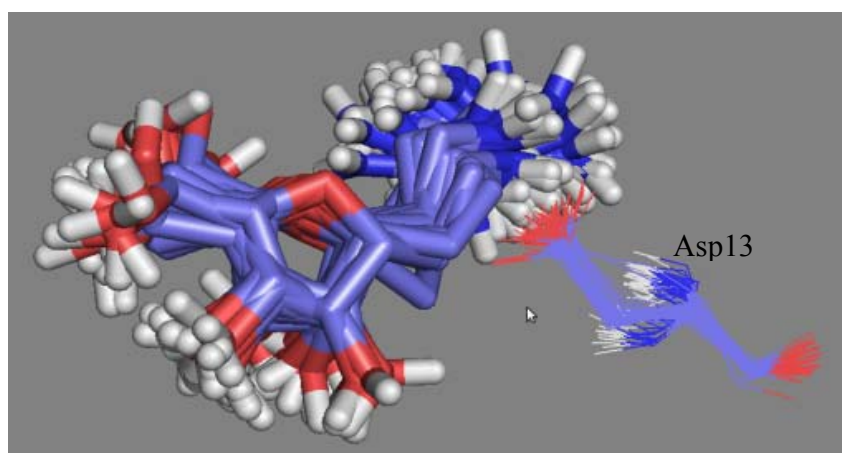


FIGURA 55 Quadros da dinâmica molecular do composto 5 no sítio ativo da *BaNH*.

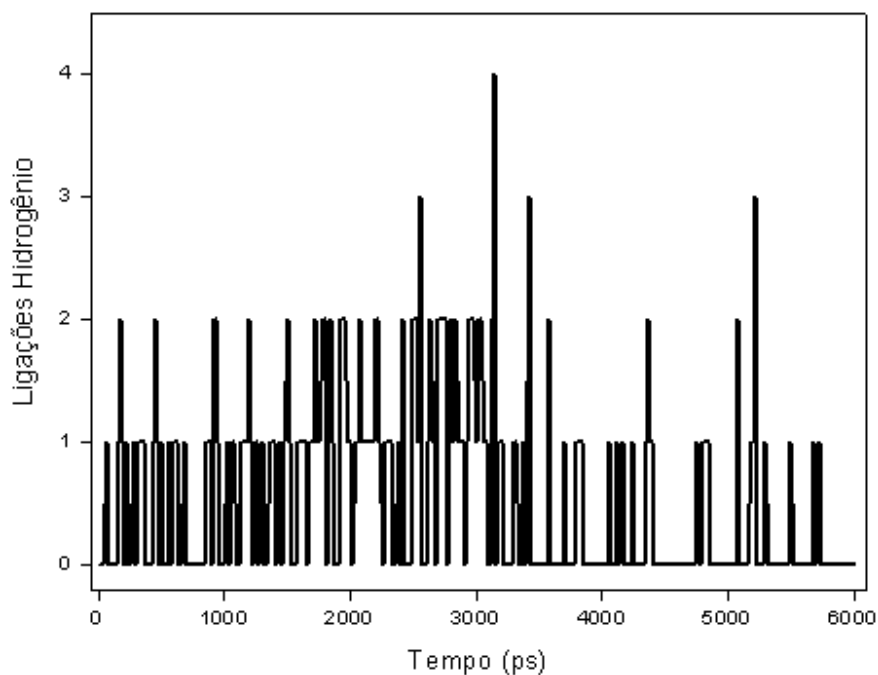


FIGURA 56 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 5 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para a 3-deaza-adenosina (composto 6) no sítio ativo da *BaNH* (FIG. 57) mostrou que este composto está entre os resíduos Trp238, His80, Val12, Trp77 e Phe73, ficando durante os 6.000 ps dentro do sítio ativo, oscilando pouco, provavelmente devido ao fato de estar entre os aminoácidos e, conseqüentemente, realizando interações. Foi possível, assim, confirmar a boa interação com a enzima, ou seja, a 3-deaza-adenosina se acomoda bem na cavidade do sítio ativo da *BaNH*, para o tempo simulado, mostrando estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMJs. Resultado semelhante ao observado no estudo por ancoramento molecular, em que este composto

mostrou-se o mais promissor, apresentando maior estabilidade no sítio ativo da *BaNH*, sendo, entre os seis compostos que compõem o grupo 1 (compostos que possuem como molécula a ribose), sugerido como o mais promissor inibidor. O mesmo resultado também foi encontrado, experimentalmente por Goeminne e colaboradores, sendo o composto deste grupo o que apresenta o menor valor de constante de inibição.

No Apêndice C está ilustrado, por meio do gráfico de distância, que a His80 e a Val12 se aproximam da 3-deaza-adenosina, provavelmente realizando ligações hidrogênio, corroborando resultado encontrado no estudo por ancoramento molecular. Por outro lado, verifica-se a presença e a proximidade dos resíduos Phe73, Trp238 e Trp77 (Apêndice C). Esses resíduos, apesar de não realizarem interações (de acordo com o ancoramento molecular), podem ter contribuído para a permanência da 3-deaza-adenosina dentro do sítio da *BaNH*. Sendo assim, analisando-se os quadros das simulações por DM, verifica-se que a 3-deaza-adenosina, provavelmente, realiza interações causadas pelo efeito hidrofóbico com o Trp238 (FIG. 58 e Apêndice C), contribuindo ainda mais para a estabilização e a permanência deste composto dentro do sítio da *BaNH*, justificando novamente o melhor poder inibitório encontrado para os cálculos teóricos e dados experimentais.

O estudo por ancoramento molecular mostrou interações do tipo ligações hidrogênio com oito resíduos de aminoácidos, resultado semelhante ao sugerido pela DM por meio da análise do número de ligações hidrogênio formadas. Como é mostrado na Figura 59, houve a formação de até sete ligações hidrogênio entre a 3-deaza-adenosina e a *BaNH*, com a permanência de 3 a 5 ligações desde os primeiros picossegundos até final da DM. A maior estabilidade das ligações durante a dinâmica também confirma o maior poder inibitório deste composto em relação aos demais que compõem o grupo.

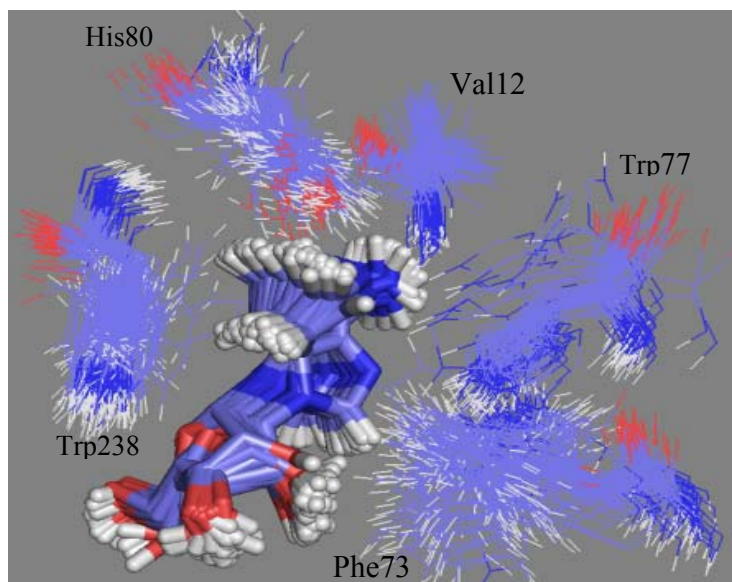


FIGURA 57 Quadros da dinâmica molecular do composto 6 no sítio ativo da *BaNH*.

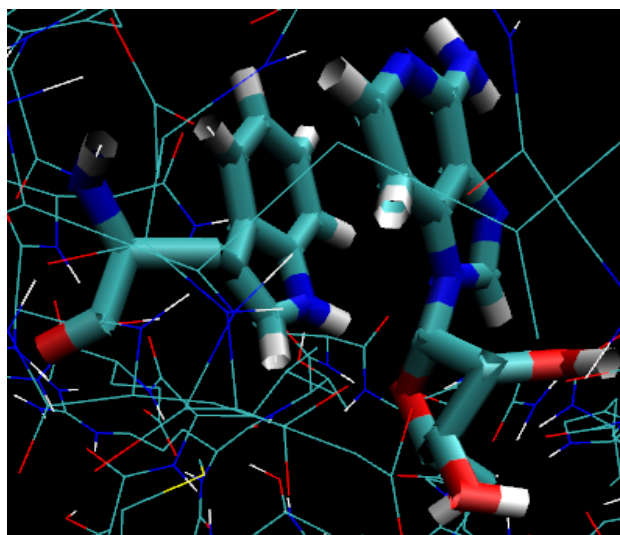


FIGURA 58 Interações causadas pelo efeito hidrofóbico entre o composto 6 e o Trp238 no sítio ativo da *BaNH*.

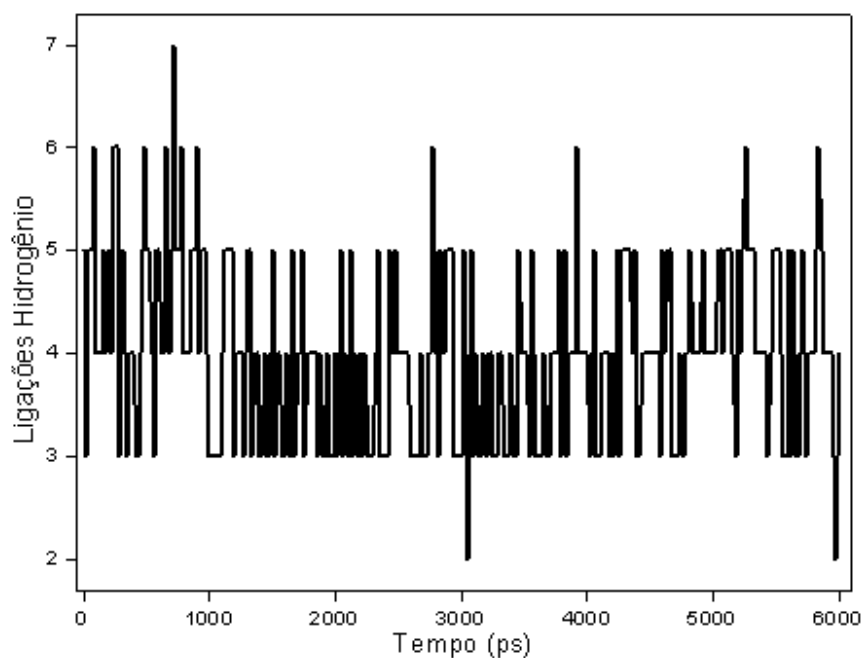


FIGURA 59 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 6 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o composto 7 no sítio ativo da *BaNH* (Figura 60) demonstrou que esta molécula permanece entre os resíduos His80, Gly11, Trp238 e Asp38, ficando, durante os 6.000 ps, estável dentro do sítio ativo, corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMJs. Verifica-se que o Asp38 se aproxima do composto (Apêndice C), como sugerido nos estudos por ancoramento molecular.

Observou-se também que o composto 7 adquiriu uma conformação totalmente diferente do composto 5 (possui o mesmo substituinte que o 7), assim como o verificado com o ancoramento molecular. Sugere-se que a conformação diferente do composto 7 no sítio ativo da *BaNH* em relação ao composto 5 se deve à substituição do oxigênio do anel ribose pelo nitrogênio.

O composto 7 chegou a formar 5 ligações hidrogênio nos primeiros picossegundos (FIG. 61), corroborando estudo por ancoramento molecular que mostrou a formação de ligação hidrogênio com cinco resíduos de aminoácidos do sítio ativo.

Verifica-se, por meio da DM (Figura 61) que o composto 7, além de perfazer ligações mais estáveis do que o composto 5, entre aproximadamente 3.500 e 6.000 ps, teve prevalência de 1 a 3 ligações hidrogênio, desde os primeiros picossegundos, até, aproximadamente, 3.500 ps, enquanto, no composto 5, prevalece apenas uma ligação, durante todos os 6.000 ps simulados (Figura 56). A conformação adquirida pelo composto 7 no sítio ativo permitiu a realização de mais ligações hidrogênio, o que pode ser um fator importante para explicar o maior poder inibitório observado teorica e experimentalmente, em relação ao composto 5.

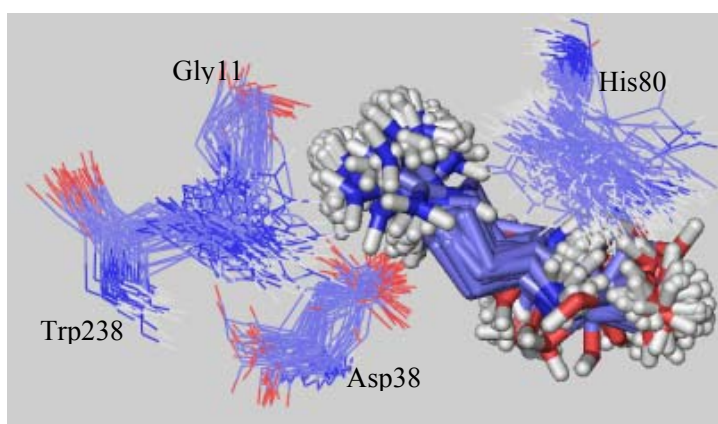


FIGURA 60 Quadros da dinâmica molecular do composto 7 no sítio ativo da *BaNH*.

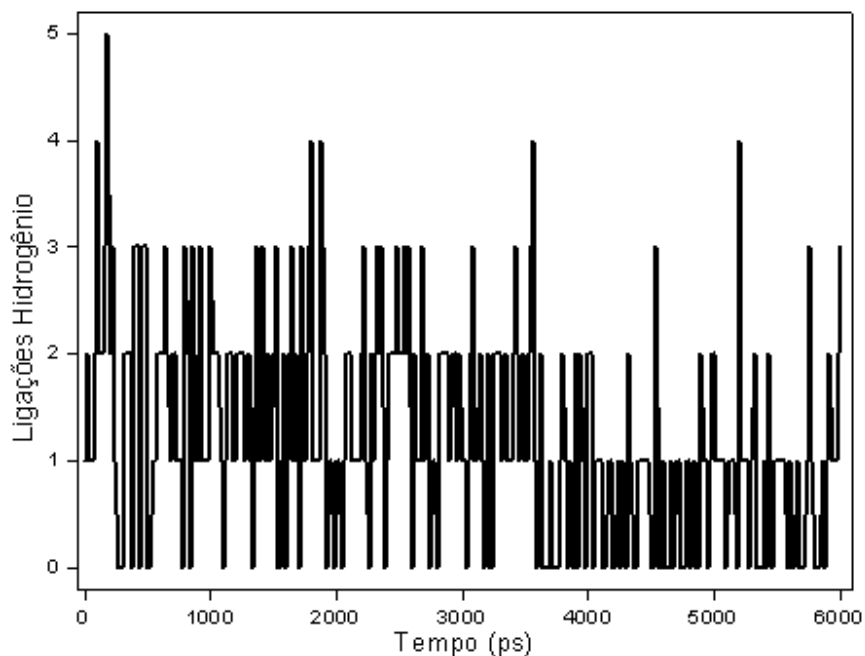


FIGURA 61 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 7 e a *BaNH*.

O estudo por ancoramento molecular mostrou que o substituinte do composto 8 não realiza nenhuma interação do tipo ligação hidrogênio com os resíduos de aminoácidos próximos do sítio ativo, fato este confirmado pela sucessão dos quadros da dinâmica molecular em que não se verificou nenhum resíduo próximo ao grupo guanidina do substituinte. Contudo, foi possível observar que o composto 8, provavelmente, realiza interações causadas pelo efeito hidrofóbico com os resíduos Trp238 e Trp77 (Figuras 62 e 63), por estarem próximos do composto, com uma distância de 5 Å e 4 Å, respectivamente, para todo o tempo simulado (Apêndice C), contribuindo para a sua estabilização. Esses resíduos permitem que a molécula permaneça bem ancorada dentro do sítio da *BaNH*, oscilando pouco em relação à sua posição inicial, durante os

6.000 ps simulados, corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMQs e ancoramento molecular.

A análise do número médio de ligações hidrogênio formadas ao longo da dinâmica, ilustrado na Figura 63, mostra a formação de até quatro ligações hidrogênio entre o composto 8 e a *Ba*NH, verificando a permanência até duas ligações desde os primeiros picossegundos até o final da dinâmica.

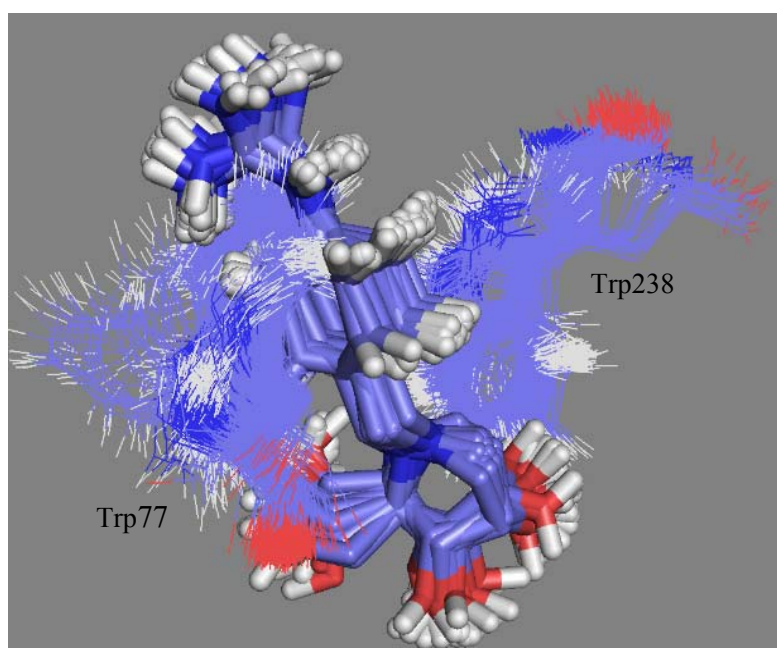


FIGURA 62 Quadros da dinâmica molecular do composto 8 no sítio ativo da *Ba*NH.

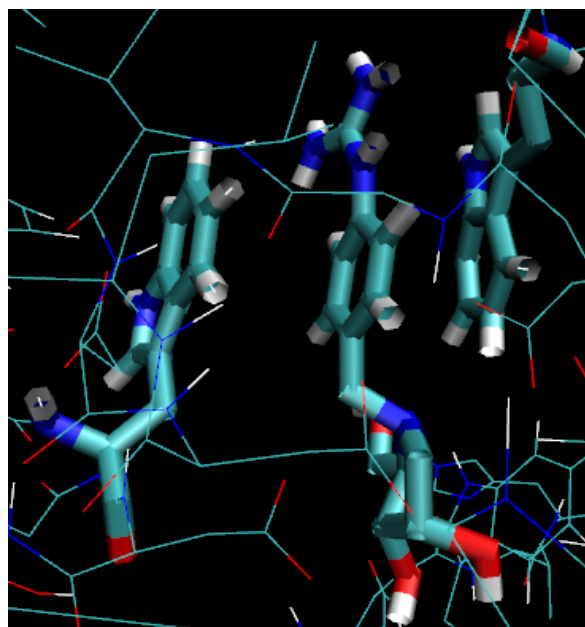


FIGURA 63 Interações causadas pelo efeito hidrofóbico entre o composto 8 e os resíduos Trp238 e Trp77 no sítio ativo da *BaNH*.

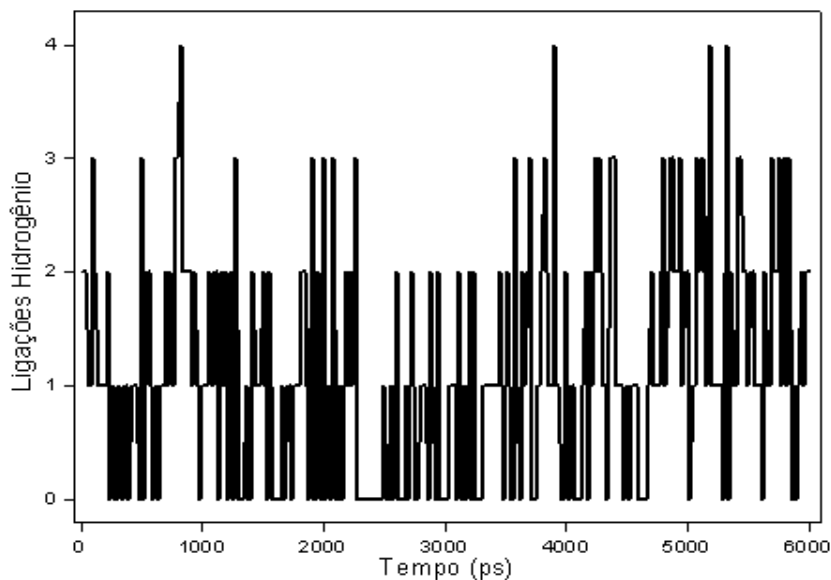


FIGURA 64 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 8 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o imucilim A (composto 9) no sítio ativo da *BaNH* (Figura 65) mostrou que esta molécula está entre os resíduos Trp238, Val12 e His80, ficando, durante os 6.000 ps, dentro do sítio ativo. Foi possível, assim, confirmar a boa interação com a enzima, ou seja, o imucilim A se acomoda bem nas cavidades do sítio ativo da *BaNH*, para o tempo simulado, mostrando estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMJs, descrito anteriormente.

Como se observado na Figura 65 e no Apêndice C, a His80 e a Val12 se aproximam do imucilim A, provavelmente realizando ligações de hidrogênio, corroborando resultado encontrado nos estudos por ancoramento molecular. Foi verificada também a presença do Trp238. Esses resíduos, apesar de não realizarem interações de hidrogênio (de acordo com o ancoramento molecular),

podem estar contribuindo para a permanência do imucilim A dentro do sítio da *BaNH*, devido à proximidade com o composto (Apêndice C).

Pelo estudo por ancoramento molecular verificou-se que o imucilim A realiza onze ligações hidrogênio com a *BaNH*, sendo considerado como o mais promissor inibidor da segunda classe (compostos propostos por Goeminne e colaboradores, em que o oxigênio do anel ribose foi substituído pelo átomo de nitrogênio), apresentando uma maior estabilidade no sítio ativo da *BaNH* em relação aos compostos 7 e 8. Resultado semelhante sugerido pela DM por meio da análise do número de ligações hidrogênio formadas. Como é mostrado na Figura 66, houve a formação de até nove ligações hidrogênio entre o imucilim A e a *BaNH*, com a permanência de 4 a 7 ligações desde os primeiros picossegundos até o 5.500 ps simulados e de 4 a 6 ligações durante os 500 ps restantes.

O maior número médio de ligações hidrogênio formadas ao longo da dinâmica e a estabilidade dessas ligações confirmam o maior poder inibitório, verificado, teórica e experimentalmente, para este composto em relação aos demais que compõe o grupo.

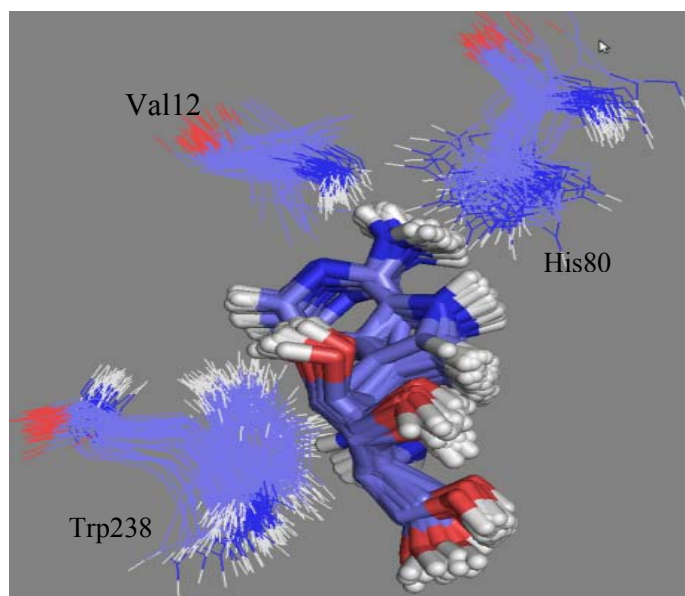


FIGURA 65 Quadros da dinâmica molecular do composto 9 no sítio ativo da *BaNH*.

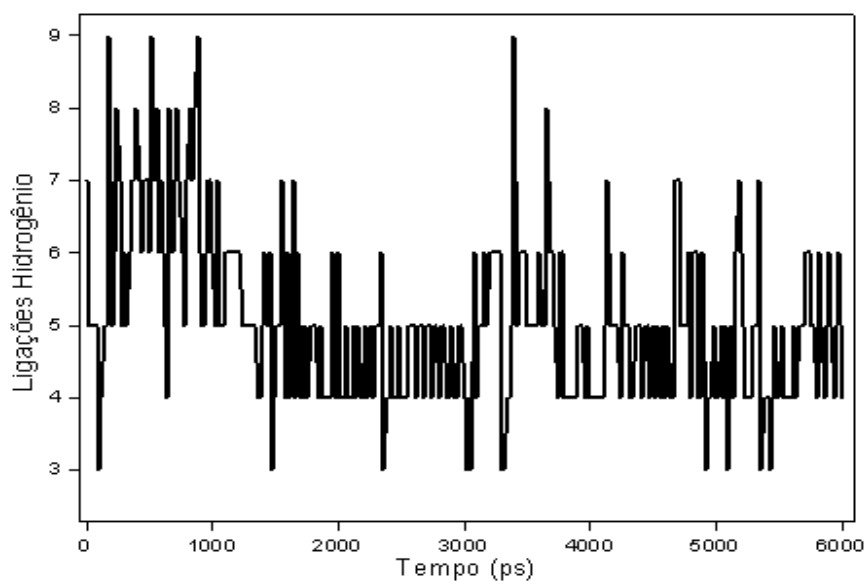


FIGURA 66 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 9 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para a riboamidrazona (composto 10) no sítio ativo da *BaNH* (FIG. 67) mostrou que esta molécula permanece próxima dos resíduos Asn160, Trp238, Trp77, Phe73 e Asp38 (Apêndice C), ficando, durante os 6.000 os, estável dentro do sítio ativo, corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMQs.

Como está ilustrado na Figura 68, a riboamidrazona chegou a formar sete ligações hidrogênio, corroborando estudo por ancoramento molecular que mostrou a formação de ligação hidrogênio com cinco resíduos de aminoácidos do sítio ativo.

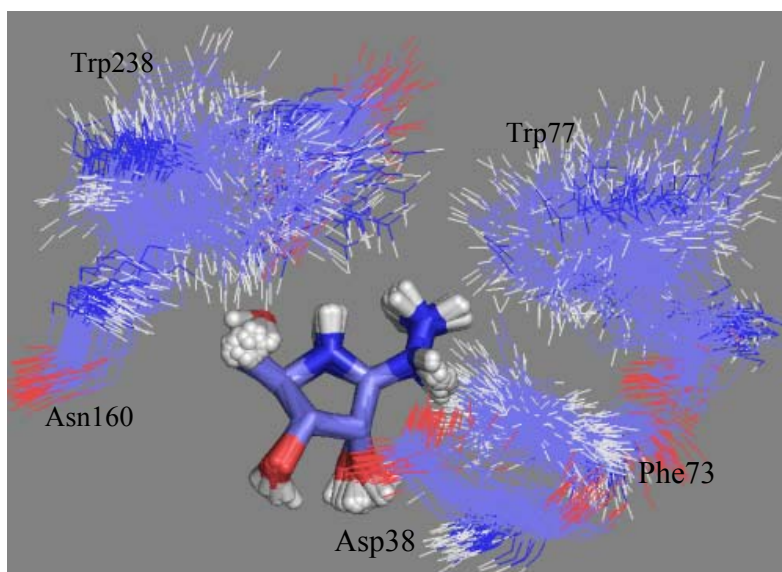


FIGURA 67 Quadros da dinâmica molecular do composto 10 no sítio ativo da *BaNH*.

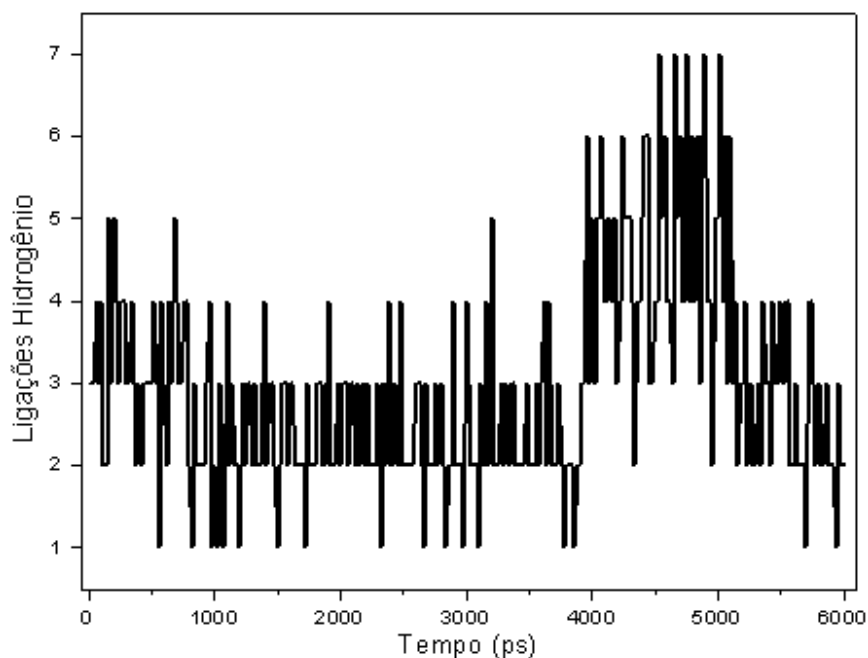


FIGURA 68 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 10 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para a fenil-riboamidrazona (composto 11) no sítio ativo da *BaNH* (Figura 69) mostrou que este composto está entre os resíduos Trp238, Asp38, Phe73e Asn160, ficando, durante os 6.000 ps, dentro do sítio ativo.

Foi possível, assim, confirmar a boa interação com a enzima, ou seja, a fenil-riboamidrazona se acomoda bem nas cavidades do sítio ativo da *BaNH* para o tempo simulado, mostrando estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMQs.

O estudo por ancoramento molecular mostrou que o substituinte da fenil-riboamidrazona não realiza nenhuma interação do tipo ligação hidrogênio com os resíduos de aminoácidos próximos do sítio ativo da *BaNH*. Contudo, foi possível observar, pela simulação de DM, que a fenil-riboamidrazona,

provavelmente, realiza interações causadas pelo efeito hidrofóbico com os resíduos Trp238 e Trp172 (Figura 70), contribuindo para a estabilização do composto no sítio ativo da *Ba*NH. Estes resíduos permitem que a molécula permaneça bem ancorada dentro do sítio da *Ba*NH, oscilando pouco em torno de sua posição inicial, durante os 6.000 ps simulados, corroborando resultados sugeridos por ancoramento molecular, em que se atribuiu o melhor poder inibitório da fenil-riboamidrazona em relação à riboamidrazona, ao posicionamento do substituinte no sítio ativo da *Ba*NH.

Como é mostrado na Figura 71, houve a formação de até cinco ligações hidrogênio nos primeiros picossegundos, entre a fenil-riboamidrazona e a *Ba*NH, com a permanência de 1 a 3 ligações, durante os 6.000 ps simulados.

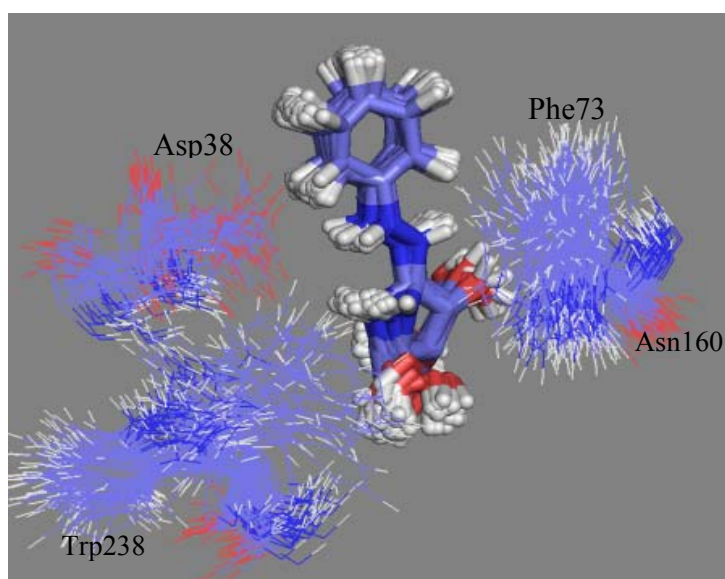


FIGURA 69 Quadros da dinâmica molecular do composto 11 no sítio ativo da *Ba*NH.

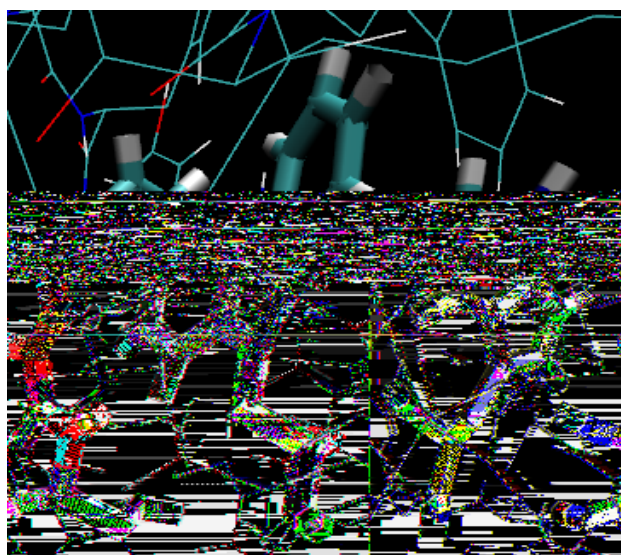


FIGURA 70 Interações causadas pelo efeito hidrofóbico entre o composto 11 e os resíduos Trp238 e Trp172 no sítio ativo da *BaNH*.

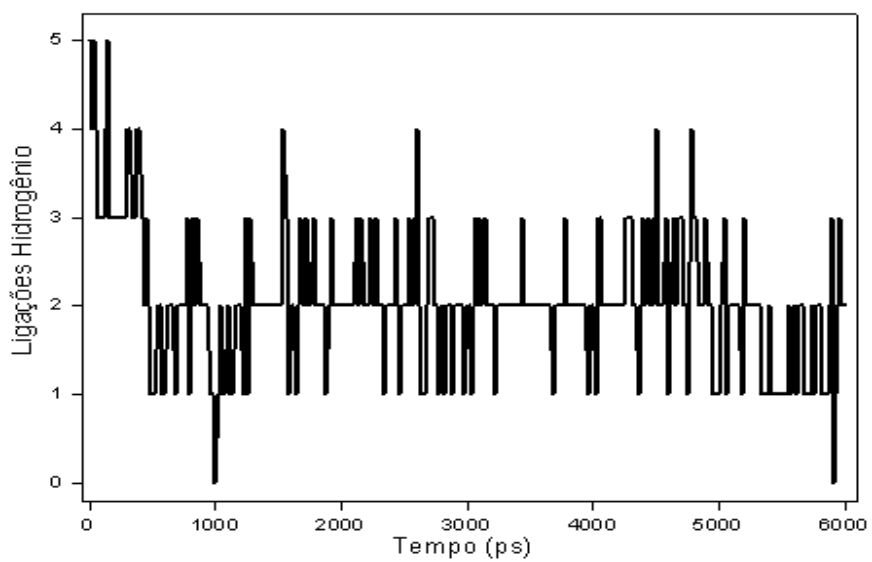


FIGURA 71 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 11 e a *BaNH*.

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para a para-nitro-fenil-riboamidrazona (composto 12) no sítio ativo da *BaNH* (Figura 72 e Apêndice C) mostrou que este composto está próximo dos resíduos Tyr243, Asp38, Trp238, His80 e Val12, ficando, durante os 6.000 ps, dentro do sítio ativo, oscilando pouco, provavelmente devido ao fato de estar entre os aminoácidos e, conseqüentemente, realizando interações do tipo ligação hidrogênio, hidrofóbicas, entre outras. Foi possível, assim, confirmar a boa interação com a enzima, ou seja, para-nitro-fenil-riboamidrazona, se acomoda bem na cavidade do sítio ativo da *BaNH*, para o tempo simulado, mostrando estabilização do sistema e corroborando resultados sugeridos por meio do cálculo da energia total e DRMQs. Esse resultado é semelhante ao observado no estudo por ancoramento molecular, em que este composto mostrou-se o mais promissor dentre os 12 compostos estudados, apresentando maior estabilidade no sítio ativo da *BaNH*. Essa estabilidade pode ser um fator importante para explicar o maior poder inibitório observado experimentalmente por Boutellier et al. (1994).

Como se observa na Figura 72, His80, Tyr243 e Val12 estão próximos da para-nitro-fenil-riboamidrazona (Apêndice C), provavelmente realizando ligações hidrogênio, corroborando o resultado encontrado com o estudo por ancoramento molecular. Por outro lado, verifica-se a presença e a proximidade dos resíduos Asp38 e Trp238 (Apêndice C). Esses resíduos, apesar de não realizarem interações (de acordo com o ancoramento molecular), podem ter contribuído para a permanência deste composto dentro do sítio da *BaNH*. Sendo assim, analisando os quadros das simulações por DM, verifica-se que a para-nitro-fenil-riboamidrazona, provavelmente, realiza interações causadas pelo efeito hidrofóbico com o Trp238, devido à grande proximidade (Figura 73 e Apêndice C), contribuindo ainda mais para a estabilização e a permanência deste

composto dentro do sítio da *BaNH*, justificando, novamente, o melhor poder inibitório encontrado para os cálculos teóricos e dados experimentais.

A análise do número médio de ligações hidrogênio formadas ao longo da dinâmica ilustrada na Figura 74, demonstra a formação de até seis ligações hidrogênio entre a para-nitro-fenil-riboamidrazona e a *BaNH*, com a permanência de 2 a 3, durante os 6.000 ps simulados.

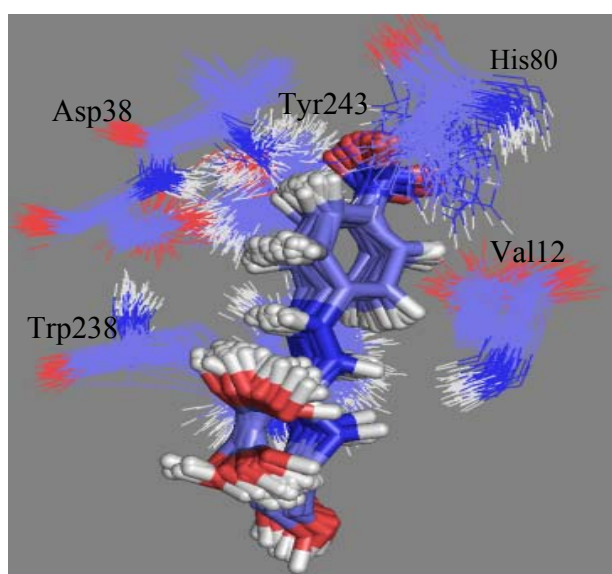


FIGURA 72 Quadros da dinâmica molecular do composto 12 no sítio ativo da *BaNH*.

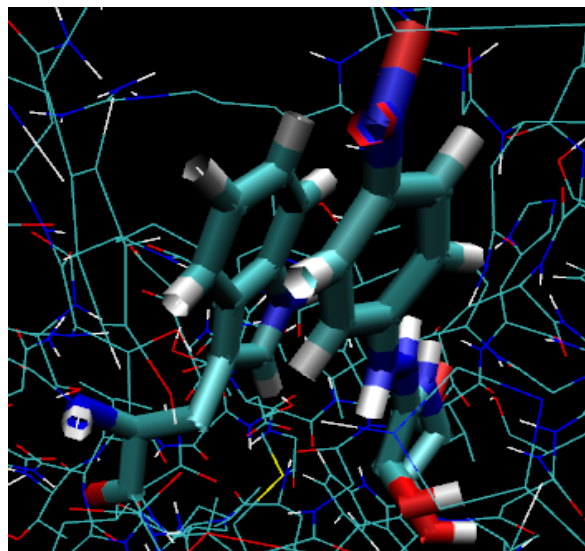


FIGURA 73 Interações causadas pelo efeito hidrofóbico entre o composto 12 e o resíduo Trp238 no sítio ativo da *BaNH*.

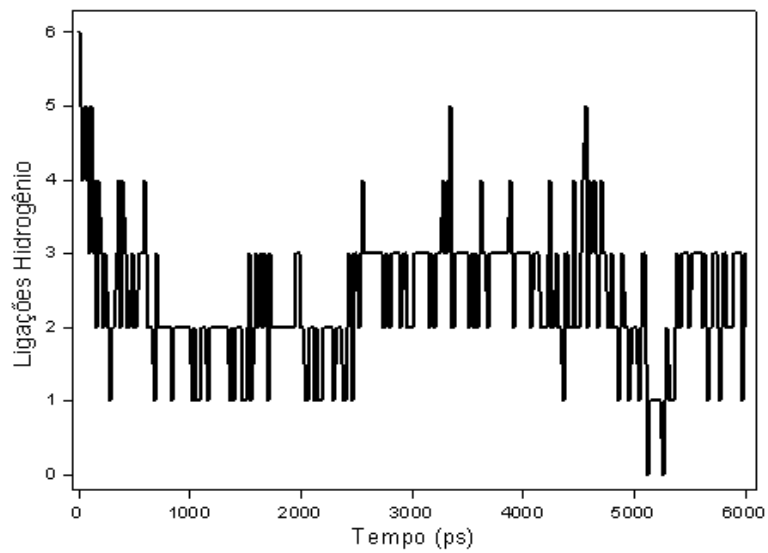


FIGURA 74 Número de ligações hidrogênio formadas entre o composto 12 e a *BaNH*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A análise dos resultados dos cálculos de energia por ancoramento molecular mostraram que há uma correlação linear entre os resultados teóricos e experimentais para os dois grupos de inibidores estudados. A 3-deaza-adenosina (composto 6), o imucilim A (composto 9) e a para-nitro-fenil-riboamidrazona (composto 12), dentre as 12 estruturas estudadas, foram eleitos como os mais promissores a serem prováveis inibidores de *BaNH*, uma vez que apresentaram valores de energias intermolecular menores que os substratos uridina e adenosina e semelhantes aos da inosina (composto 9). Além disso, apresentaram maiores estabilidades no sítio ativo, possuindo menores valores energia de ligação hidrogênio total e de constante de inibição, em relação aos substratos naturais e aos demais compostos estudados.

A análise dos resultados das simulações por dinâmica molecular das propostas de inibidores nos sítios ativos da *BaNH* confirma os resultados obtidos com o ancoramento molecular, mostrando que as propostas de inibidores permanecem bem ancoradas e estáveis dentro do sítio dentro do tempo simulado, em todos os sistemas.

Foi possível observar a proximidade e a permanência dos resíduos que realizaram ligações hidrogênio com cada inibidor, assim como o número médio dessas ligações, corroborando resultados sugeridos com o ancoramento molecular.

Os cálculos de energia de ancoramento molecular, aliados às simulações por dinâmica molecular, sugerem que os compostos 6, 9 e 12 são promissores para o planejamento de potenciais inibidores para a enzima *BaNH*. Portanto, como perspectiva para o trabalho, fica a sugestão de que tais inibidores sejam testados experimentalmente. Em um segundo momento, realizar o planejamento de derivados dos inibidores mais promissores, com a finalidade de estabelecer as

características mais desejáveis, ou seja, os melhores grupos farmacofóricos, de forma a otimizar as interações que cada inibidor pode realizar com os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo, visando novos e mais efetivos inibidores da enzima BaNH. Esses derivados devem possuir, preferencialmente, como substituintes, grupos aromáticos, de forma a explorar as potenciais interações hidrofóbicas com os resíduos Trp77, Trp238 e Trp172. É desejável também que os substituintes possuam um volume maior contendo grupos amina e carbonila, com a finalidade de ocupar toda a cavidade e com potencial para realizar interações com os resíduos Trp77, Asp38, Asp13, His80, Val12 e Tyr243.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTEN, D. M. F. van; BYWATER, R.; FINDLAY, J. B. C.; HENDLICH, M.; HOOFT, R. W. W.; VRIEND, G. "PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. **Journal of Computer Aided Molecular Design**, Dordrecht, v. 10, n. 3, p. 255-262, June 1996.

ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. Oxford: Clarendon, 1987.

ALLINGER, N. L. Conformational analysis MM2, a hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 99, n. 25, p. 8127-8134, Dec. 1977.

ALLINGER, N. L.; CHEN, K.; CHEN, J. A.; KATZENEBENBOGEN, S. R.; ANSTEAD, G. M. Hyperconjugative effects on carbon-carbon bond lengths in molecular mechanics (MM4). **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 17, n. 5/6, p. 747-755, Apr. 1996a.

ALLINGER, N. L.; CHEN, K.; LII, J-H. An improved force field (MM4) for saturated hydrocarbons. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 17, n. 5/6, p. 642-668, Apr. 1996b.

ALLINGER, N. L.; LI, F.; YAN, L. Molecular mechanics: the MM3 force field for alkenes. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 11, n. 7, p. 848-867, Aug. 1990a.

ALLINGER, N. L.; LI, F.; YAN, L.; TAI, J. C. Molecular mechanics (MM3) calculations on conjugated hydrocarbons. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 11, n. 7, p. 868-895, Aug. 1990b.

ALLINGER, N. L.; YUH, Y. H.; LII, J-H. Molecular mechanics: the MM3 force field for hydrocarbons. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 111, p. 8551-9556, 1989.

ANTHRAX. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/antraz.htm>>. Acesso em: 11 out. 2009.

ATLAS, R. A. Bioterrorism before and after September 11. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 27, n. 4, p. 355-379, 2001.

BOUTELLIER, M.; HORENSTEIN, B. A.; SEMENYAKA, A.; SCHRAMM, V. L.; GANEM, B. Amidrazone analogues of D-ribofuranose as transition-state inhibitors of nucleoside hydrolase. **Biochemistry**, Easton, v. 33, n. 13, p. 3994-4000, Apr. 1994.

BRASIL. Ministério da Defesa. Exército Brasileiro. Companhia de Defesa Contra Guerra Química, Biológica e Nuclear. Disponível em: <<http://www.exercito.gov.br/06OMs/CiaDQBN/indice.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

CADDIGAN, E. J.; COHEN, J.; GULLINGSRUD, J. STONE, **VMD user's guide**. Urbana: University of Illinois and Beckman Institute, 2004. Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

CAETANO, M. S. **Estudos computacionais entre análogos do glifosato e as enzimas EPSP sintase nativa e mutante Gly96Ala**. 2007. 53 p. TCC (Graduação em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAETANO, M. S.; RAMALHO, T. C.; CUNHA, E. F. F.; JOSA, D.; SOUSA, T. C. S. Analysis of wild-type and Gly96Ala mutant EPSP synthase structures via in silico docking with inhibitors and molecular dynamics simulation. **Current Bioactive Compounds**, Karachi, v. 5, n. 2, p. 110-118, June 2009.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, maio/jun. 2003.

CORNELL, W. D.; CIEPLACK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ, K.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 117, p. 5179-5197, 1995.

CUI, L.; RAJASEKARIAH, G. R.; MARTIN, S. K. A nonspecific nucleoside hydrolase from leishmania donovani: implications for purine salvage by the parasite. **Gene**, Amsterdam, v. 280, n. 1/2, p. 153-162, Dec. 2001.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 134, n. 2/3, p. 246-256, May 2001.

DEGANO, M.; ALMO, S.C.; SACCHETTINI, J. C.; SCHRAMM, V. L.; Trypanosomal nucleoside hydrolase. A novel mechanism from the structure with a transition-state inhibitor. **Biochemistry**, Easton, v. 37, n. 18, p. 6277-6285, Apr. 1998.

DIXON, T. C.; MESELSON, M.; GUILLEMIN, J.; HANNA, P. C. Anthrax. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 341, n. 11, p. 815-826, Sept. 1999.

THE DUNDEE Prodrgr 2 server. Disponível em:
<<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrgr/index.html>>. Acesso em: 15 junh. 2009.

ESTUPIÑÁN, B.; SCHRAMM, V. L. Guanosine-Inosine-preferring nucleoside N-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 37, p. 23068-23073, Sept. 1994.

FRANÇA, T. C. C. **Modelagem molecular da serina hidroximetiltransferase de *Plasmodium falciparum***: modelos tridimensionais e proposta de potenciais inibidores seletivos. 2004. 232 p. Tese (Doutorado em Ciências em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro.

FRANÇA, T. C. C.; CASTRO, A. T.; RENNÓ, M. N.; VILLAR, J. D. F. A questão da defesa contra agentes de guerra biológica nas Forças Armadas e no Brasil. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 56-67, 2008a.

FRANÇA, T. C. C.; ROCHA, M. R. M.; REBOREDO, B. M.; RENNO, M. N.; TINOCO, L. W.; VILLAR, J. D. F. Design of inhibitors for nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani* using molecular dynamics studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 64-73, 2008b.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, E. S.;
POPLE, J. A. **Gaussian 98, revision A.11**. Pittsburg: Gaussian, 2001.

FRISCHKNECHT, F. The history of biological warfare. **EMBO Reports**,
Oxford, v. 4, p. 47–52, June 2003. Supplement 1. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1326439#illus>>.
Acesso em: 10 jan. 2008.

GEISSLER, E.; MOON, J. E. V. C. **Biological and toxin weapons: research,**
development and use from the middle ages to 1945. Oxford: Stockholm
International Peace Research Institute, 1999. 296 p.

GOEMINNE, A.; MCNAUGHTON, M.; BAL, G.; SURPATEANU, G.;
VEKEN, P. van der; DE PROL, S.; VERSÉES, W.; STEYAERT, J.;
HAEMERS, A.; AUGUSTYNS, K. Synthesis and biochemical evaluation of
guanidino-alkyl-ribitol derivatives as nucleoside hydrolase inhibitors. **European
Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 43, n. 2, p. 315-326, 2008a.

GOEMINNE, A.; BERG, M.; MCNAUGHTON, M.; BAL, G.; SURPATEANU,
G.; VEKEN, P. van der; DE PROL, S.; VERSÉES, W.; STEYAERT, J.;
HAEMERS, A.; AUGUSTYNS, K. N-Arylmethyl substituted iminoribitol
derivatives as inhibitors of a purine specific nucleoside hydrolase. **Bioorganic &
Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 16, n. 14, p. 6752–6763, July 2008b.

GOLDSTEIN, H. **Classical mechanics**. 2. ed. London: Addison-Wesley, 1980.

GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana
inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos
quanto-mecânicos**. 2009. 232 p. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade
Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GONÇALVES, A. S.; CAFFARENA, E. R.; PASCUTTI, P. G. Dissociation of
molecular aggregates under high hydrostatic pressure: the influence of water
structure on benzene cluster solubility. **Journal of the Brazilian Chemical
Society**, São Paulo, v. 20, n. 7, p. 1227-1234, maio 2009.

GOPAL, D. N.; MEYER, S. L.; DEGAN, M.; SACCHETTINI, J. C.;
SCHRAMM, V. L. Inosine-uridine nucleoside hydrolase from crithidia
fasciculata: genetic characterization, crystallization, and identification of histidine
241 as a catalytic site residue. **Biochemistry**, Easton, v. 35, n. 19, p. 5963-5970,
May 1996.

GROMACS. Disponível em: <<http://www.gromacs.org>>. Acesso em: 20 ago. 2009.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, Dec. 1997.

GUNSTEREN, W. F. van; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HÜNENBERGER, P. H.; KRÜGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I. G. **Biomolecular simulation**: the Gromos 96 manual and user guide. Groningen: VdF Hochschulverlag AG and der ETH Zürich, 1996.

HAMMOND, D. J.; GUTTERIDGE, W. E. Purine and pyrimidine metabolism in the *Trypanosomatidae*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 13, n. 13, p. 243-261, Nov. 1984.

HARRIS, S. H. **Factories of death**: japanese biological warfare, 1932-1945, and the American Cover-Up. New York: Routledge, 1994.

HARRIS, S. H. **Factories of death**: japanese biological warfare, 1932-1945, and the American Cover-Up. New York: Routledge, 2002.

HARRIS, S. H. Japanese biological warfare research on humans: a case study of microbiology and ethics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 666, p. 21-52, Dec. 1992.

HEHRE, W. J.; DEPPMEIER, B. J.; KLUNZINGER, P. E. **PC SPARTAN Pro**. Irvine: Wavefunction, 1999.

HIGGINS, D.; TAYLOR, W. **Bioinformatics**: sequence, structure and data banks. Oxford: Oxford University, 2001.

HILLISCH, A.; PETERS, O.; KOSEMUND, D.; MULLER, G.; WALTER, A.; SCHNEIDER, B.; REDDERSEN, G.; ELGER, W.; FRITZEMEIER, K. H. Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 18, n. 7, p. 1599-1609, July 2004.

ISTVAN, J. E.; IIDIKO, M. K.; AKOS, B. Molecular dynamics study of active-site interactions with tetracoordinate transients in acetylcholinesterase and its mutants. **Biochemistry**, Easton, v. 353, v. 3, p. 645-653, Feb. 2001.

IWATA, Y.; TAGO, K.; KIHU, T.; KOGEN, H.; FUJIOKA, J.; OTSUKA, N.; SUZUKI-KONAGAI, K.; OGITA, T.; MIYAMOTO, S. Conformational analysis and docking study of potent factor XIIIa inhibitors having a cyclopropenone ring. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, New York, v. 18, n. 6, p. 591-599, Dec. 2000.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS potential functions for proteins: energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, Mar. 1988.

JOSA, D.; CUNHA, E. F. F.; RAMALHO, T. C.; CAETANO, M. S.; SOUZA, T. C. S. Homology modeling of wild-type, D516V and H526L *Mycobacterium Tuberculosis* RNA polymerase and their molecular docking study with inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Easton, v. 25, n. 4, p. 373-376, Feb. 2008.

KARPLUS, M.; PETSCH, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, London, v. 347, p. 631-639, Oct. 1990.

KHAN, M. T. H.; FUSKEVAG, O.; SYLVE, I. Discovery of potent thermolysin inhibitors using structure based virtual screening and binding assays. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 52, n. 1, p. 48-61, 2009.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. **Journal of Molecular Graphics**, Guildford, v. 14, n. 1, p. 51-55, Feb. 1996.

KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 161, n. 2, p. 269-288, Oct. 1982.

KURTZ, J. E.; EXINGER, F.; ERBS, P.; JUND, R. The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, New York, v. 41, n. 3, p. 132-141, June 2002.

LEACH, A. R.; KUNTZ, I. D. Conformational-analysis of flexible ligands in macromolecular receptor-sites. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 13, n. 6, p. 730-748, July/Aug. 1992.

LEITENBERG, M. Biological weapons in the twentieth century: a review and analysis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 27, n. 4, p. 267-320, 2001.

LINDLER, L. E.; LEBEDA, F. J.; KORCH, G. W. **Biological weapons defense: infectious diseases and counter bioterrorism**. New Jersey: Human, 2005.

MARK, E. T.; GLENN, J. M. Understanding modern molecular dynamics: techniques and applications. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 104, n. 2, p. 159-178, 2000.

MAZZELLA, L. J.; PARKIN, D. W.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H.; SCHRAMM, V. L. Mechanistic diagnoses of N-Ribohydrolases and purine nucleoside phosphorylase. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 118, n. 8, p. 2111-2112, Feb. 1996.

MOON, J. E. V. C. **Biological and toxin weapons: research, development and use from the middle Ages to 1945**. Oxford: Oxford University, 1999.

MIZUTANI, M. Y.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 243, n. 2, p. 310-326, Oct. 1994.

NEVINS, N.; CHEN, K.; ALLINGER, N. L. Molecular mechanics (MM4) calculations on alkenes. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 17, n. 5/6, p. 669-694, Apr. 1996a.

NEVINS, N.; CHEN, K.; ALLINGER, N. L. Molecular mechanics (MM4) calculations on conjugated hydrocarbons. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 17, n. 5/6, p. 695-729, Apr. 1996b.

NEVINS, N.; CHEN, K.; ALLINGER, N. L. Molecular mechanics (MM4) vibrational frequency calculations for alkenes and conjugated hydrocarbons. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 17, n. 5/6, p. 730-746, Apr. 1996c.

OGAWA, J.; TAKEDA, S.; XIE, S-X.; HATANAKA, H.; ASHIKARI, T.; AMACHI, T.; SHIMIZU, S. Purification, characterisation, and gene cloning of purine nucleoside from *Ochrobactrum anthropi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1783-1787, Apr. 2001.

OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. Comparative molecular docking of antitrypanosomal natural products into multiple trypanosoma brucei targets. **Molecules**, Switzerland, v. 14, n. 4, p. 1513-1536, Apr. 2009.

ORGANIZATION FOR THE PROHIBITION OF BIOLOGICAL WEAPONS. Disponível em: <<http://www.opbw.org/>>. Acesso em: 11 jan. 2008.

ORGANIZATION FOR THE PROHIBITION OF CHEMICAL WEAPONS. Disponível em: <<http://www.opcw.org/>>. Acesso em: 11 jan. 2008.

PARKIN, D. W. Purine-specific nucleoside N-ribohydrolase from Trypanosoma brucei brucei: purification, specificity, and kinetic mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, n. 36, p. 21713-21719, Sept. 1996.

PARKIN, D. W.; HORENSTEIN, B. A.; ABDULAH, D. R.; ESTUPIÑÁN, B.; SCHRAMM, V. L. Nucleoside hydrolase from crithidia fasciculata: metabolic role, purification, specificity, and kinetic mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n. 31, p. 20658-20665, Nov. 1991.

PARKIN, D. W.; SCHRAMM, V. L. Binding modes for substrate and a proposed transition - state analogue of protozoan nucleoside hydrolase. **Biochemistry**, Easton, v. 34, n. 42, p. 13961-13966, Oct. 1995.

PARKINSON, R.; RAJIC, A.; JENSON, C. Investigation of an anthrax outbreak in Alberta in 1999 using a geographic information system. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 44, n. 4, p. 315-318, Apr. 2003.

PASCUTTI, P. G. Introdução a modelagem e dinâmica molecular. In: _____. **Introdução a modelagem e dinâmica molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2002. v. 1, p. 1-38.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 2. ed. New York: J. Wiley, 2002.

PEITSCH, M. C. **Practical application of computer-aided drug design**. New York: M. Dkker, 1997.

PELLÉ, R.; SCHRAMM, V. L.; PARKIN, D. W. Molecular cloning and expression of a purine-specific N-ribohydrolase from Trypanosoma brucei brucei: sequence, expression, and molecular analysis. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 4, p. 2118-2126, Jan. 2001.

PETERSEN, C.; MOLLER, L. B. The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 2, p. 884-894, Jan. 2001.

PINA, A. S.; ROQUE, A. C. A. Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. **Journal of Molecular Recognition**, London, v. 22, n. 2, p. 162-168, Mar./Apr. 2009.

RAMALHO, T. C.; CAETANO, M. S.; CUNHA, E. F. F.; ROCHA, M. V.; SOUZA, T. C. S. Construction and assessment of reaction models of Class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, New York, v. 27, n. 2, p. 195-208, Oct. 2009.

A RESOURCE for studying biological macromolecules. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G. The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 13-22, Jan. 2003.

SANTANA, D. M.; BORJA-CABRERA, G. P.; SOUZA, E. P. de; STURM, N. R.; PALATNIK, C. B.; CAMPBELL, D. A. Nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p. 315-319, Apr. 2002.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Homology modeling of wild type and pyrimethamine/cycloguanil-cross resistant mutant type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. A model for antimalarial chemotherapy resistance. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 305-317, July 2001.

SCHRAMM, V. L. Enzymatic N-riboside scission in RNA and RNA precursors. **Current opinion in chemical biology**, London, v. 1, n. 3, p. 323-331, Oct. 1997.

SHI, W.; SCHRAMM, V. L.; ALMO, S. C. Nucleoside hydrolase from *Leishmania major*: cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5: a crystal structure. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 30, p. 21114-21120, July 1999.

SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. **Medical aspects of chemical and biological warfare**. Washington: Office of the Surgeon General/Walter Reed Army Medical Center, 1997.

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**. 2003. 168 p. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Rio de Janeiro.

SILVA, M. L.; GONÇALVES, A. S.; BATISTA, P. R.; VILLAR, J. D. R.; PASCUTTI, P. G.; FRANÇA, T. C. C. Design, docking studies and molecular dynamics of new potential selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* serine Hydroxymethyltransferase. **Molecular Simulation**, New York, v. 36, n. 1, p. 5-14, Jan. 2009.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em Eucalyptus. **Addubare**, Piracicaba, v. 2, n. 9, p. 4-7, out./dez. 2003.

SOUSA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, A. D.; COURI, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no vombate ao antraz. **Revista Brasileira de ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2004.

SOUZA, T. C. S.; CUNHA, E. F. F.; RAMALHO, T. C.; JOSA, D.; CAETANO, M. S. Molecular modelling of Mycobacterium tuberculosis acetolactate synthase catalytic subunit. **Molecular Simulation**, New York, v. 34, n. 7, p. 707-713, June 2008.

SPIEGEL, M. R. **Estatística**. 3. ed. São Paulo: Makron Brooks/McGraw-Hill, 1994.

SPOEL, D. van der; BUUREN, A. R. van; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; HESS, B.; FEENTRA, K. A.; LINDAHL, E.; DRUNEN, R. van; BERENDSEN, H. J. C. **GROMACS user manual version 3.0**. Groningen: University of Groningen, Department of Biophysical Chemistry, 2001. Disponível em: <www.gromacs.org>. Acesso em: 11 jan. 2008.

SPOEL, D. van der; BUUREN, A. R. van; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; HESS, B.; FEENSTRA, K. A.; LINDAHL, E.; DRUNEN, R. van; BERENDSEN, H. J. C. **GROMACS user manual version 3.1.4**. Groningen: University of Groningen, Department of Biophysical Chemistry, 2002.

STERNE, M. Distribution and economic importance of anthrax. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 26, n. 5, p. 1493-1495, Sept. 1967.

TASCHETO, A. C. **Defesa química**. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, Curso de Engenharia Química, 2002. Apostila.

TAYLOR, C. L.; TAYLOR JUNIOR, L. B. **Chemical and biological warfare**. New York: Franklin Watts, 1992.

THOMAS, G. **Química medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, Apr. 2006.

TURNBULL, P. C. B. Anthrax is alive and well. **PHLS Microbiology Digest**, London, v. 9, p. 103-106, 1996.

TURNER, P. J. **Xmgr v. 3.01**: a plotting tool for workstations using X/Motif. 1991. Disponível em: <<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Xmgr/>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

VERSÉES, W.; BARLOW, J.; STEYAERT, J. Transition-state complex of the purine-specific nucleoside hydrolase of *T.vivax*: enzyme conformational changes and implications for catalysis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 359, n. 2, p. 331-346, June 2006.

VERSÉES, W.; DECANNIERE, K.; PELLÉ, R.; DEPOORTER, J.; BROSENS, E.; PARKIN, D. W.; STEYAERT, J. Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 307, n. 5, p. 1363-1379, Apr. 2001.

VERSÉES, W.; DECANNIERE, K.; PELLÉ, R.; HOLSBEVE, E. van; STEYAERT, J. Enzyme-substrate interactions in the purine-specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 18, p. 15938-15946, May 2002.

VERSÉES, W.; STEYAERT, J. Catalysis by nucleoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 13, n. 6, p. 731-738, Dec. 2003.

WARREN, D. "The PyMOL molecular graphics system." San Carlos: DeLano Scientific LLC, 2004. Disponível em: <<http://www.pymol.org>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S.; WEINER, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 106, n. 3, p. 765-784, Feb. 1984.

WHEELIS, M. Biological war fare at the 1346 siege of Caffa. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 971-975, Sept. 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/v.8.n.9.p.01-0536.htm>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

WIBERG, G. S.; GRICE, H. C. "Effect of prolonged individual caging on toxicity parameters in rats". **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 597-603, Oct. 1965.

WILLIS, E. A. Landscape with dead sheep: what they did to Gruinard Island. **Medicine, Conflict, and Survival**, London, v. 18, n. 2, p. 199-211, Apr./June 2002. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713673482~db=all~tab=issueslist~branches=18-v18>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Parametrização dos inibidores.

O pacote GROMACS 4.0 não dispõe de bibliotecas com as topologias de moléculas diferentes de proteínas e ácidos nucleicos, portanto, é necessário gerar os arquivos de topologia para essas moléculas antes de incluí-las no sistema. Esse procedimento, chamado de parametrização, foi feito no site <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/> segundo o seguinte procedimento:

- 1 - Acessar o site
<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/prodrgr.html>;
- 2 - Editar o arquivo com as coordenadas .pdb da molécula;
- 3 - Copiar as coordenadas do arquivo e colar na janela do site;
- 4 - Selecionar as opções “full charges” e run PRDRG;
- 5 - Salvar a pasta de arquivos gerados pelo site;
- 6 - Corrigir as cargas no arquivo .itp, substituindo os valores calculados pelo PRDRG pelos valores calculados no programa Gaussian 98;
- 7 - Copiar os arquivos .gro e .itp para a pasta onde serão executados os programas do pacote GROMACS 4.0.

APÊNDICE B - Programas do pacote GROMACS 4.0

A seguir são apresentados os programas executáveis do pacote GROMACS 4.0 utilizados para gerar os arquivos de entrada, executar os cálculos de minimização de energia e de dinâmica molecular e extrair informações dos arquivos de saída para posterior análise.

B.1 - Construindo os arquivos de entrada:

Para a construção dos arquivos de entrada, é necessário apenas o arquivo `banh.pdb` contendo as coordenadas espaciais da proteína. A sequência de programas utilizados foi a seguinte:

- `pdb2gmx -f banh.pdb -p banh.top -o banh.gro -ignh;`
- `editconf -bt cubic -f banh_box.gro -o banh.gro -c -d 0.65;`
- `genbox -cp banh_box.gro -cs spc216.gro -o banh_boxwater.gro -p banh.top;`
- `make_ndx -f banh_boxwater.gro.`

O programa “`pdb2gmx`” converte o arquivo `.pdb` da proteína no arquivo `banh.gro`, contendo as coordenadas da proteína no formato que o pacote GROMACS 4.0 reconhece, e no arquivo `proteína.top` contendo os dados de topologia da proteína.

O programa “`editconf`” gera, em torno da proteína, uma caixa de tamanho adequado ao volume da mesma.

O programa “`genbox`” solvata o sistema, isto é, introduz nesta caixa as moléculas do solvente.

O programa “`make_ndx`” é utilizado para criar arquivos dentro do sistema, separados em grupos, para posterior análise ex: grupo INIB1/Proteína.

B.1.1 - Inserindo íons para equilibrar a carga do sistema

Como os sistemas estudados não apresentaram carga líquida zero, foi necessário incluir íons para equilibrar as cargas. As enzimas apresentaram cargas negativas em todos os casos; foram adicionados íons Na^+ . Estes íons foram inseridos no sistema segundo o procedimento descrito abaixo:

1 - Executar o programa genion para gerar os íons:

- grompp -f stpr.mdp -c banh_boxwater.gro -p banh.top -o banh_stpr.tpr -n;
- genion -s banh_stpr.tpr -o banh_ions.gro -pname “Símbolo químico do cátion” -nq “carga do íon negativo” -random;

2 - Na opção “Select a group”, selecionar sempre o grupo correspondente ao solvente;

3 - Subtrair, no arquivo .top abaixo da linha “[Molecules]”, o número de moléculas do íon adicionado do número de moléculas do solvente.

B.2 - Minimização de energia e dinâmica molecular

Uma vez construídos os arquivos de entrada, a próxima etapa será a execução dos programas para a minimização de energia e simulação de dinâmica molecular. A sequência de programas utilizados foi a seguinte:

Para a minimização de energia:

- grompp -f stpr.mdp -c banh_ions.gro -p banh.top -o banh_stpr.tpr;
- genpr -f ino.ligx -o ligxposre.itp;
- mdrun -e banh_stpr.edr -v -s banh_stpr.tpr -o banh_stpr.trr -c banh_stpr.gro -g stpr>&stpr.job &.

Para a dinâmica das moléculas de água:

- grompp -f st.mdp -c banh_stpr.gro -p banh.top -o banh_st.tpr;
- nohup mdrun -e banh_st.edr -v -s banh_st.tpr -o banh_st.trr -c banh_st.gro -g st>&st.job &.

Para a dinâmica molecular:

- grompp -f cg.mdp -c banh_st.gro -p banh.top -o banh_cg.tpr;

- `nohup mdrun -e banh_cg.edr -v -s banh_cg.tpr -o banh_cg.trr -c banh_cg.gro -g cg>&cg.job &`;
- `grompp -f l-bfgs.mdp -c banh_cg.gro -p banh.top -o banh_lbfgs.tpr`;
- `nohup mdrun -e banh_lbfgs.edr -v -s banh_lbfgs.tpr -o banh_lbfgs.trr -c banh_lbfgs.gro -g lbfgs>&lbfgs.job &`.

Para a dinâmica molecular com restrição:

- `grompp -f pr.mdp -c banh_lbfgs.gro -p banh.top -o banh_pr.tpr`;
- `nohup mdrun -e pr.edr -v -s banh_pr.tpr -o banh_pr.trr -c banh_pr.gro -g pr>&pr.job &`.

Para a dinâmica molecular sem restrição:

- `grompp -f md.mdp -c banh_pr.gro -p banh.top -o banh_md.tpr`;
- `nohup mdrun -e md.edr -v -s banh_md.tpr -o banh_md.trr -c banh_md.gro -g md>&md.job &`.

O programa `grompp` concatena dados dos arquivos de coordenadas (.gro), de topologia (.top) e de parâmetros (.mdp) do sistema em um só arquivo que servirá de arquivo de entrada para a execução dos cálculos que se seguirão;

O programa `mdrun` dá início à simulação e gera os arquivos de saída proteína.trr, que contêm todos os resultados do cálculo. O arquivo proteína_st.gro com as coordenadas do último quadro gerado e o arquivos de log e .job que descrevem o andamento do cálculo.

São os arquivos .mdp que contêm os parâmetros do calculo a ser realizado e, para cada tipo de cálculo, foi utilizado um arquivo .mdp diferente.

Caso a dinâmica seja interrompida por algum motivo, é possível dar continuidade a partir do ponto de interrupção. Para isso, é utilizado o programa “`tpbconv`” para gerar um novo arquivo .tpr que servira de arquivo de entrada para a continuação dos cálculos:

- `tpbconv -s banh_md.tpr -f banh_md.trr -e md.edr -o banh_md1.tpr -time 1378;`
- `nohup mdrun -v -s banh_md1.tpr -deffnm banh_md1 >& banh_md1.job&`

Após finalizada a dinâmica, é possível concatenar os arquivos gerados antes e, após a interrupção com os programas `trjcat`, para trajetórias e `eneconv` para energias:

- `trjcat -o banh_mdt.xtc -f traj1.xtc traj.xtc;`
- `trjcat -o banh_mdt.trr banh_md.trr banh_md1.trr;`
- `eneconv -o banh_mdt.edr banh_md.edr banh_md1.edr;`

Como os arquivos de trajetória, `.trr` são muito grandes, é conveniente comprimi-los para salvar espaço no disco rígido. Para isso, se utiliza o programa “`trjconv`”: `trjconv -f banh_md.trr -o banh_md.xtc`

B.3 - Procedimentos para a análise de resultados das dinâmicas

Após concluída a dinâmica molecular, foram executados os programas para gerar os gráficos de variação da energia e de DRMQ temporal e espacial, e para extrair quadros ao longo da dinâmica. Estes programas são apresentados abaixo:

Para gerar o gráfico de variação da energia total:

`g_energy -f ener.edr -o energy.xvg.`

O arquivo `energia.xvg` pode ser visualizado e manipulado com o programa `xmgrace`.

Para extrair quadros do sistema proteína ou INIB da caixa d’água:

- `make_ndx -f banh_md.tpr [usar o h (help) para criar um o grupo;`

- trjconv -fit progressive -n index.ndx -f banh_md.trr(ou traj.xtc) -s banh_md.tpr -o "banh".pdb -b t_0 -e t_f ;
- trjconv -n index.ndx -f banh_md.trr -s banh_md.tpr -o banh.pdb -b t_f -e t_f .

t_0 → tempo 0; t_f → tempo final

Usando $t_0 = t_f$, extrai-se apenas o último quadro da dinâmica;

A opção `-fit progressive` ajusta os quadros em relação ao seu anterior progressivamente ao longo da dinâmica.

Para gerar os gráficos de DRMQ temporal e DRMQ espacial:

Criar primeiro os grupos que se quer analisar com `make_ndx`:

`make_ndx -f banh_md.tpr.`

DRMQ temporal:

`g_rms -n index.ndx -s banh_md.tpr -f traj.xtc -o DRMQtemp.svg.`

DRMQ espacial:

`g_rmsf -n index.ndx -s banh_md.tpr -f traj.xtc -o DRMQesp.svg -res.`

Para gerar os gráficos de numero médio de ligações hidrogênio:

Criar primeiro os grupos que se quer analisar com `make_ndx`:

`make_ndx -f banh_md.tpr.`

Executa-se o programa `g_hbond` da seguinte forma:

`g_hbond -f traj.xtc -s banh_md.tpr -n index.ndx -num NumLigH.svg,`

em que `NumLigH.svg` é o arquivo que contém o número de ligações hidrogênio formadas em função do tempo de simulação.

Todos os arquivos com extensão `.svg` contidos neste trabalho foram visualmente analisados pelo programa `XMGRACE`.

B.4 - Conteúdo dos arquivos de parâmetros .mdp

stpr.mdp:

```
title           = min_steepest_descent_PR
cpp             = /lib/cpp
define         = -DFLEXIBLE -DPOSRES
constraints    = none
integrator     = steepnsteps           = 20000
nstlist       = 10
ns_type       = grid
rlist         = 1.0
pbc           = xyzcoulombtype        = PME
rcoulomb      = 1.0epsilon-r          = 1
vdw-type      = Cut-offfrvdw          = 1.0emtol
              = 209.2
emstep        = 0.01
fourierspacing = 0.12
pme_order     = 4ewald_rtol           = 1e-5
optimize_fft  = yes
```

st.mdp:

```
title           = min_steepest_descent
cpp             = /lib/cpp
define         = -DFLEXIBLE
constraints    = none
integrator     = steep
nsteps        = 20000
nstlist       = 10
ns_type       = grid
rlist         = 1.0
pbc           = xyz
coulombtype   = PME
rcoulomb      = 1.0
epsilon-r     = 1.0 ;1 for CUTOFF, PME and SWITCH and,
              54 for
REACTIONFIELD
vdw-type      = Cut-offfrvdw          = 1.0emtol
              = 104.6
emstep        = 0.01
ewald_rtol    = 1e-5
optimize_fft  = yes
```

cg.mdp:

```

title           = min cg
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEXIBLE
constraints     = none
integrator      = cg
nsteps         = 20000
nstlist        = 10
ns_type        = grid
nstcgsteep     = 100
rlist          = 1.0
pbc            = xyz
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 1.0
vdw-type       = Cut-off ;Switch
rvdw           = 1.0
emtol          = 41.84
emstep         = 0.01
ewald_rtol     = 1e-5
optimize_fft   = yes

```

lbfgs.mdp:

```

title           = min_steepest_descent
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEXIBLE
constraints     = none
integrator      = l-bfgs ;steep
nsteps         = 20000
nstlist        = 10
ns_type        = grid
rlist          = 1.0
pbc            = xyz
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 1.0epsilon-r           = 1.0 ;1 for CUTOFF,
PME and SWITCH and, 54 forREACTIONFIELD
vdw-type       = Cut-off
rvdw           = 1.0
emtol          = 41.84
emstep         = 0.01
ewald_rtol     = 1e-5
optimize_fft   = yes

```

pr.mdp:

```

title           = 500ps_pr_fixocpp
= /lib/cpp
define          = -DPOSRES

```

```

integrator           = md
tinit               = 0
dt                  = 0.002
nsteps              = 250000 ; total 500 ps
comm-mode           = Linear
nstcomm             = 1
nstxout             = 500
nstvout             = 20000
nstfout            = 20000
nstlog              = 1000
nstenergy           = 100
nstxtcout           = 500
xtc-precision       = 1000
energygrps          = Protein PAM TAB NA+ SOL
nstlist             = 5
ns_type             = grid
pbc                  = xyz
rlist               = 1.0
domain-decomposition = no
coulombtype         = PME
rcoulomb            = 1.0
epsilon-r           = 1
vdw-type            = Cut-off
rvdw                = 1.0
DispCorr            = EnerPres
optimize_fft        = yes
Tcoupl              = berendsen
tc-grps             = system
tau-t               = .1
ref-t               = 310
gen_vel             = yesgen_temp           =
310gen_seed         = 173529
Pcoupl              = berendsen
Pcoupltype          = Isotropic
tau-p               = 1
compressibility      = 4.5e-5
ref-p               = 1
constraints          = all-bonds
constraint-algorithm = Lincs
unconstrained-start = no
Shake-SOR           = no
shake-tol           = 1e-04
lincs-order          = 4
lincs-warnangle     = 30
morse                = no

```

md.mdp:

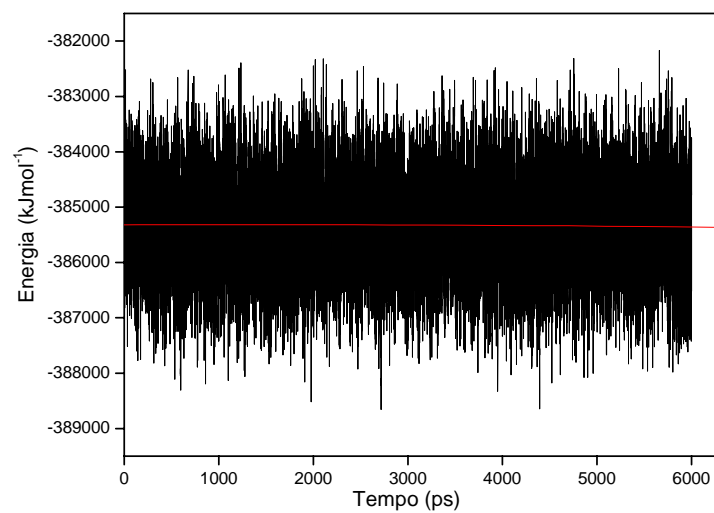

```

title                = 6.5 ns
cpp                  = /lib/cpp
include              =
define               =
integrator           = md
tinit                = 0
dt                   = 0.002
nsteps               = 3250000 ; 6.5 ns
comm-mode            = Linear
nstcomm              = 1
nstxout              = 50000 ; trr
nstvout              = 50000 ; velocidades
nstfout              = 50000 ; forcas
nstlog               = 1000
nstenergy            = 100
nstxtcout            = 10000 ; xtc
xtc-precision        = 1000
energygrps           = TAB PAM NA+ Protein SOL
nstlist              = 5
ns_type              = grid
pbc                  = xyz
rlist                = 1.0
domain-decomposition = no
coulombtype          = PME
rcoulomb             = 1.0
epsilon-r            = 1
vdw-type             = Cut-off
rvdw                 = 1.0DispCorr           =
EnerPresoptimize_fft = yes
Tcoupl               = berendsen
tc-grps              = System
tau-t                = .1
ref-t                = 310
gen_vel              = no
gen_temp             = 310
gen_seed             = 173529
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = Isotropic
tau-p                = 1
compressibility       = 4.5e-5
ref-p                = 1
constraints           = all-bonds
constraint-algorithm = Lincs
unconstrained-start  = no
Shake-SOR            = no
shake-tol            = 1e-04
lincs-order          = 4

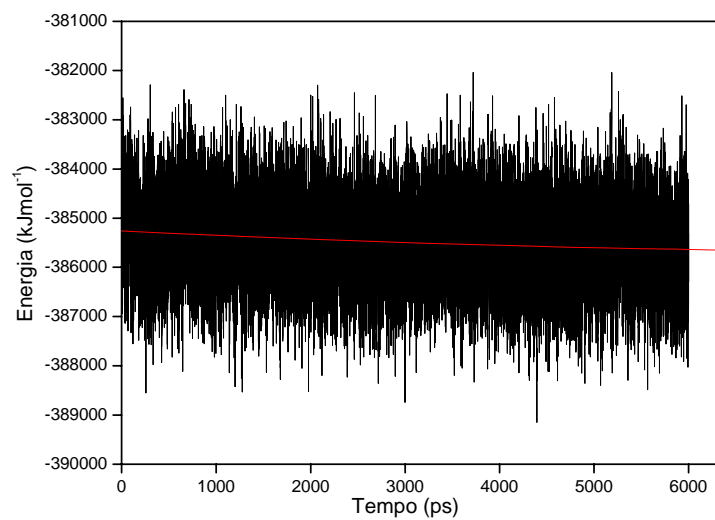
```

lincs-warnangle = 30
morse = no

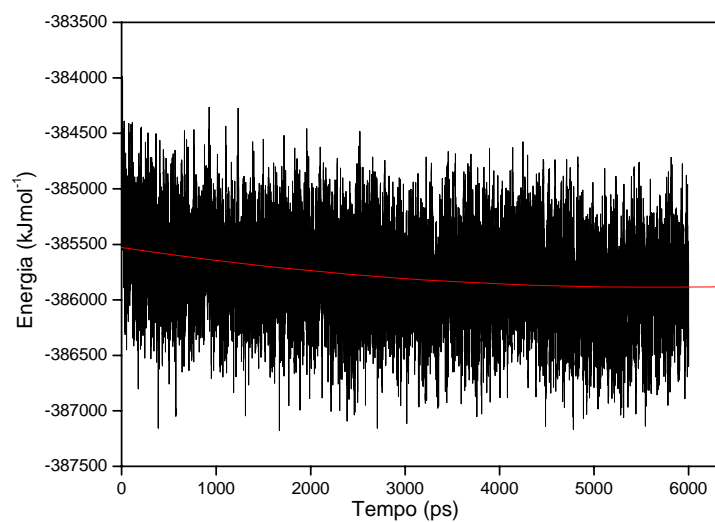
APÊNDICE C – Gráficos de Energia total



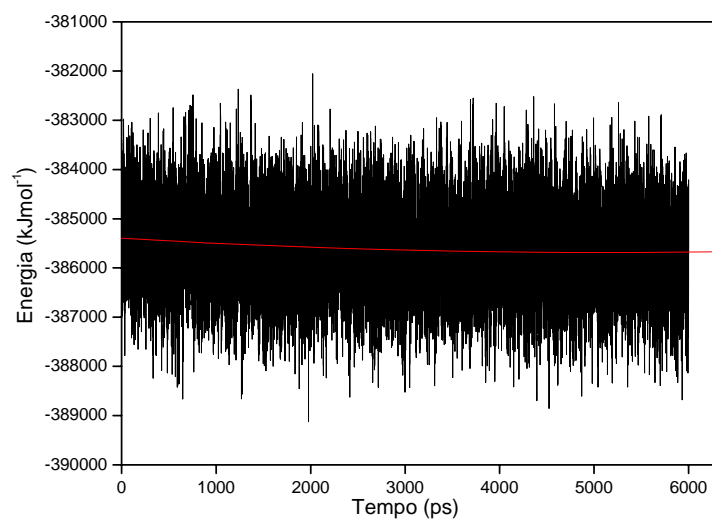
Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 2.



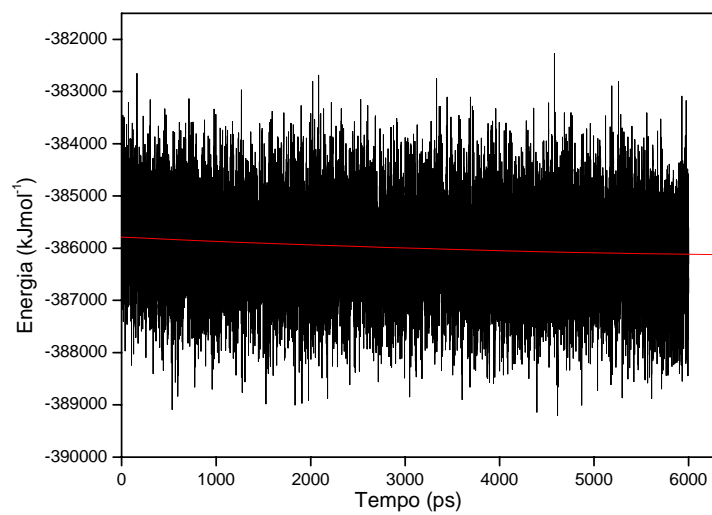
Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 3.



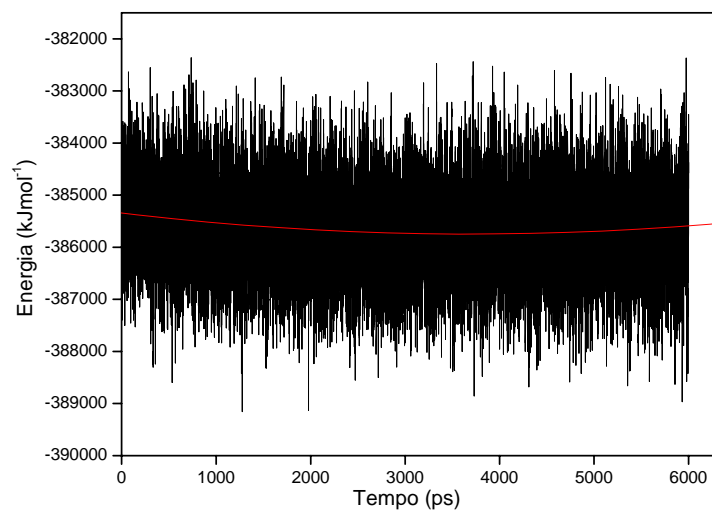
Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 4.



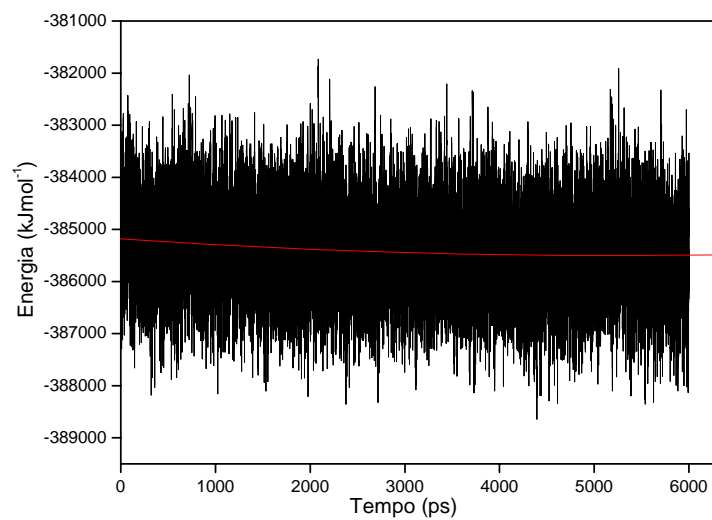
Variação da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 5.



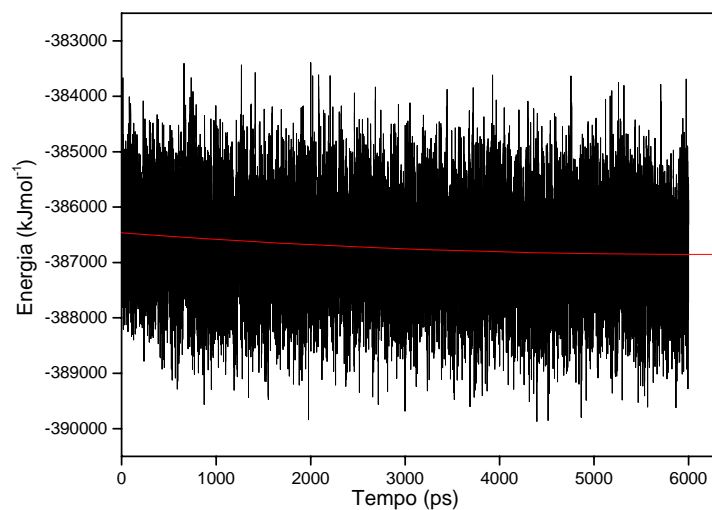
Variação da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 6.



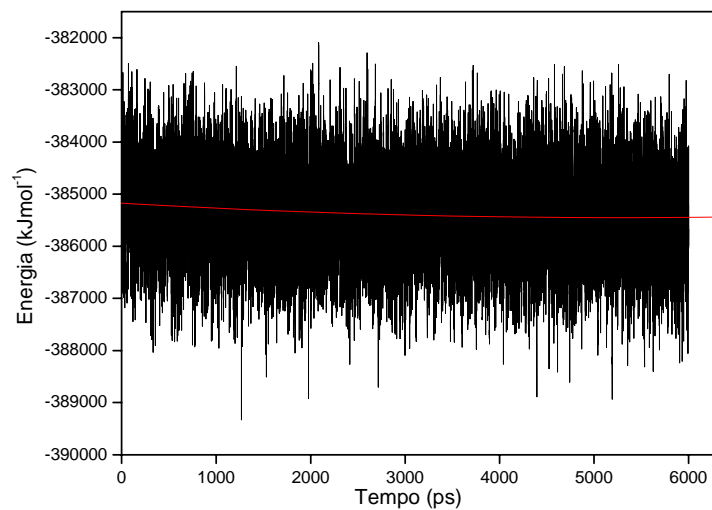
Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 7.



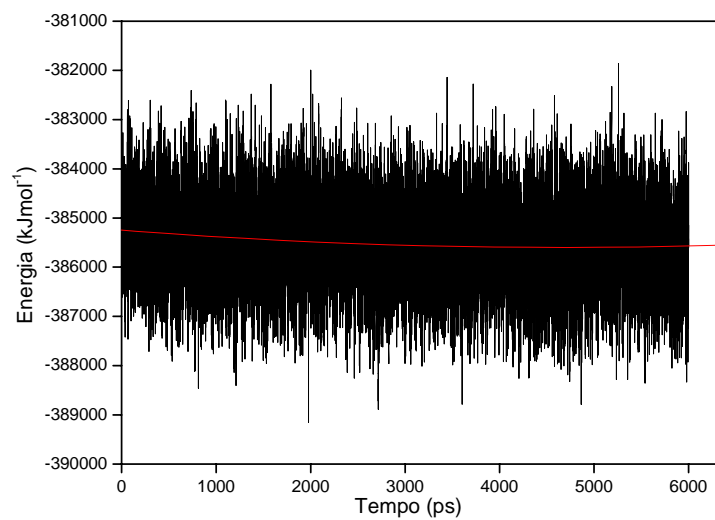
Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 8.



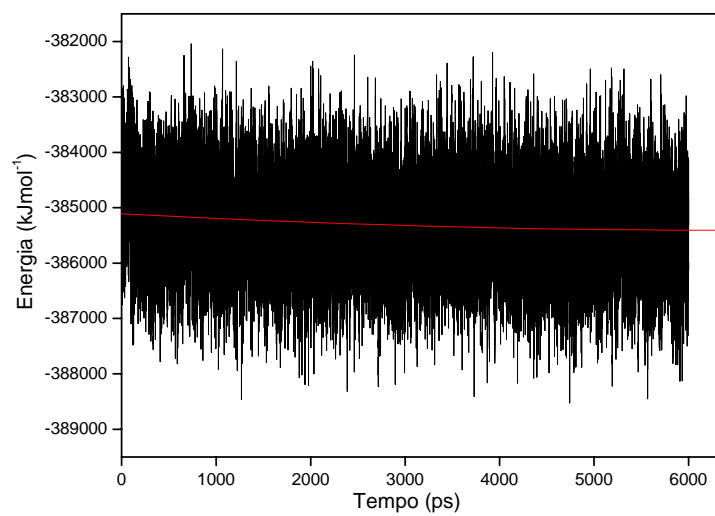
Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 9.



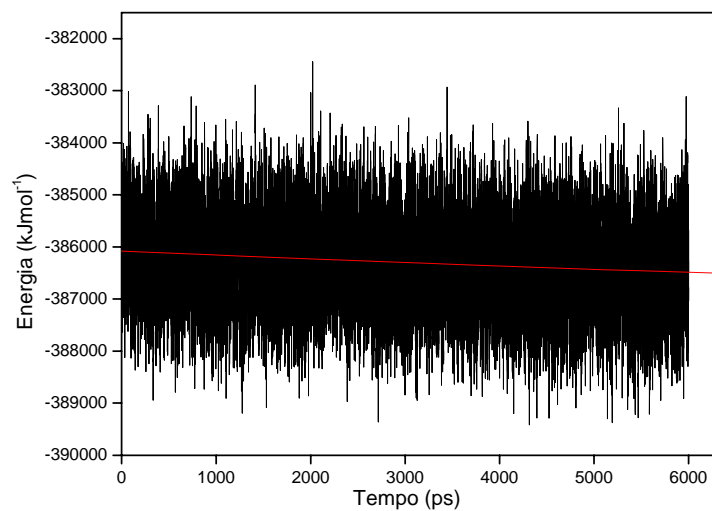
Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 10.



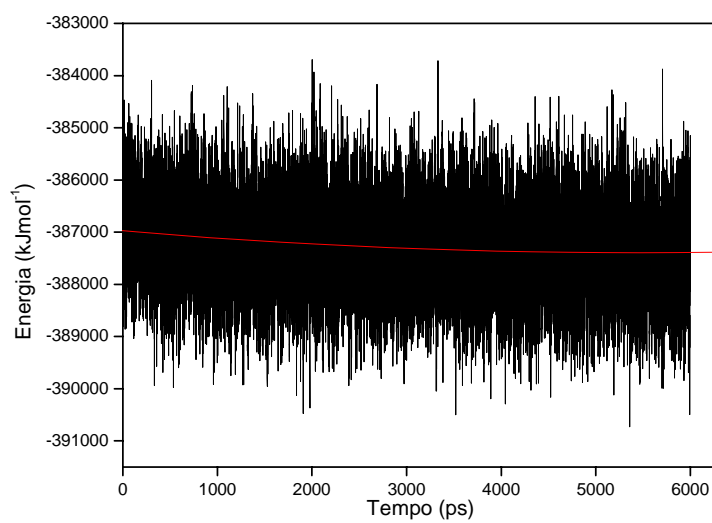
Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 11.



Varição da energia total para o sistema *BaNH*/inibidor 12.

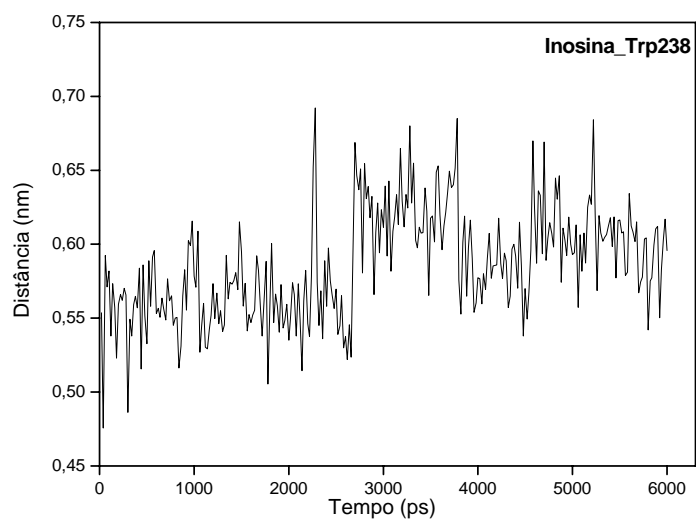


Varição da energia total para o sistema *BaNH/inosina*.

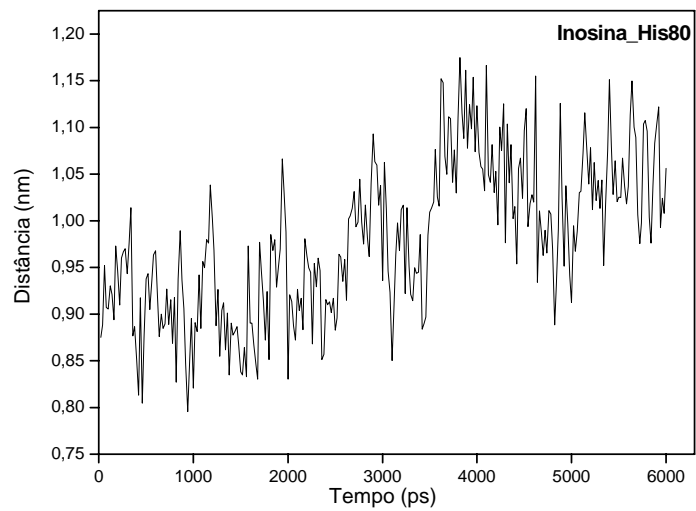


Varição da energia total para o sistema *BaNH/uridina*.

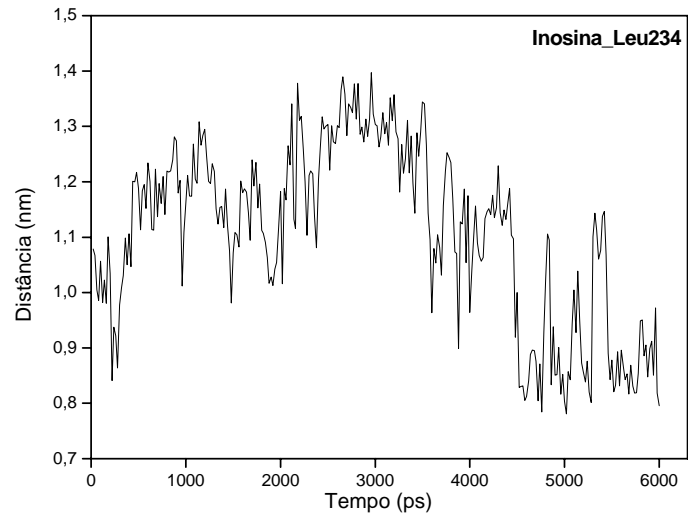
APÊNDICE D – Gráficos de Distância



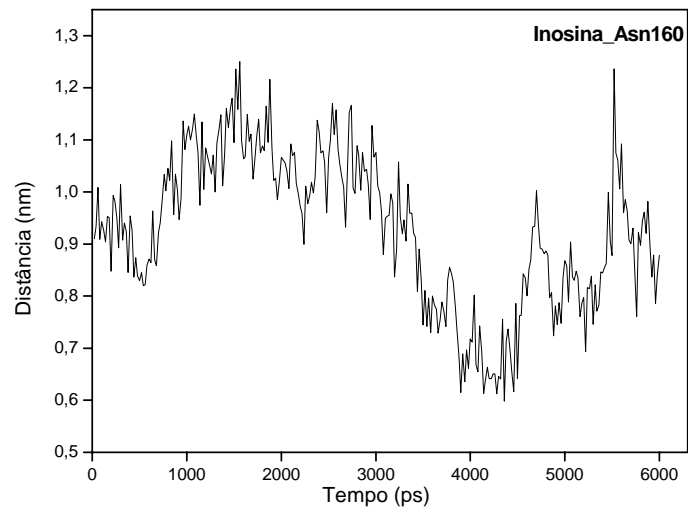
Variação da distância entre o resíduo Trp238 e a inosina, durante a simulação de DM.



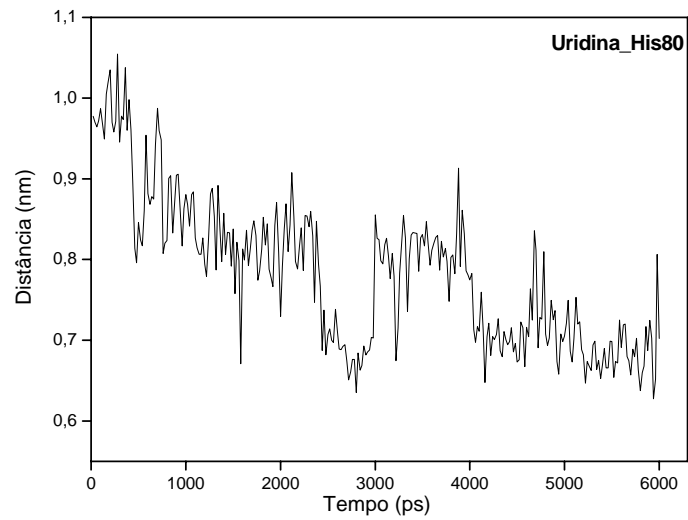
Variação da distância entre o resíduo His80 e a inosina, durante a simulação de DM.



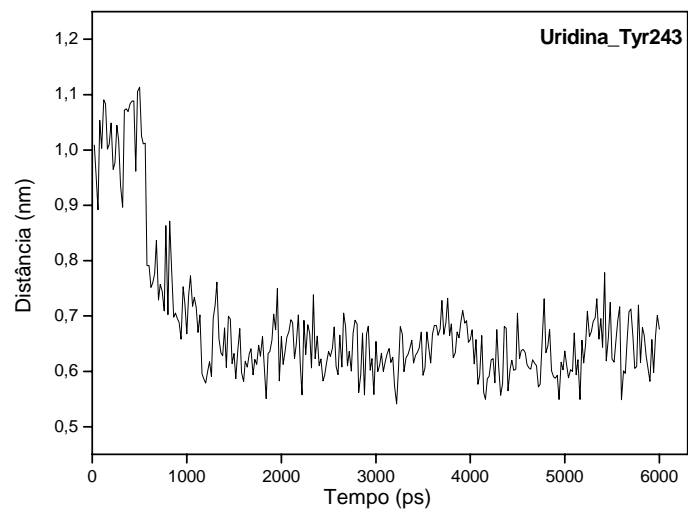
Variação da distância entre o resíduo Leu234 e a inosina, durante a simulação de DM.



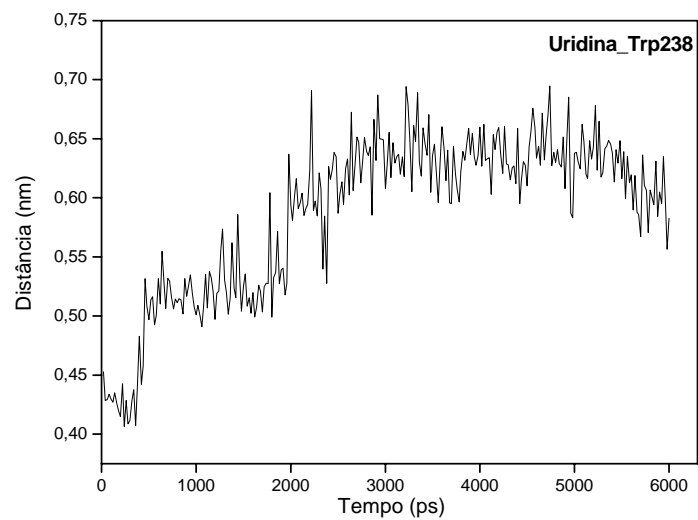
Variação da distância entre o resíduo Asn160 e a inosina, durante a simulação de DM.



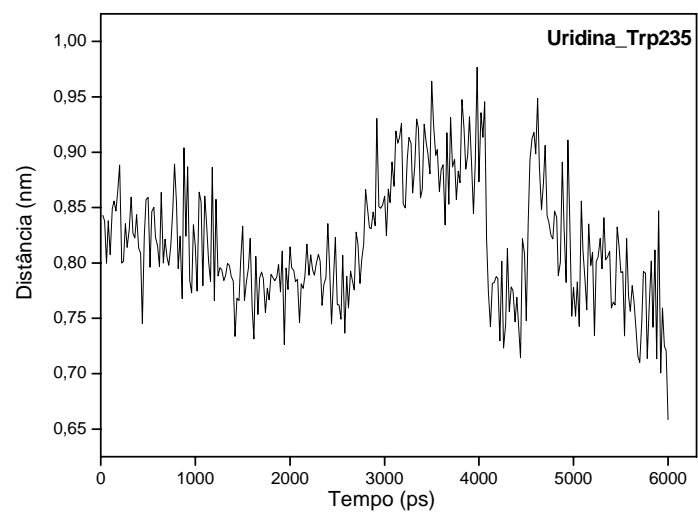
Varição da distância entre o resíduo His80 e a uridina, durante a simulação de DM.



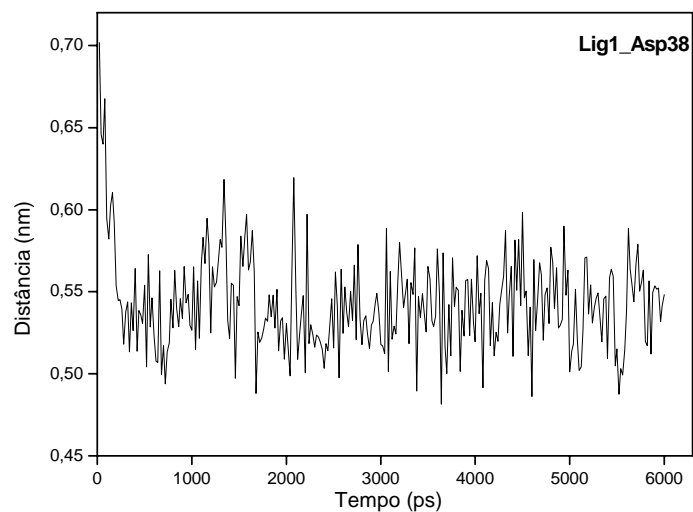
Varição da distância entre o resíduo Tyr243 e a uridina, durante a simulação de DM.



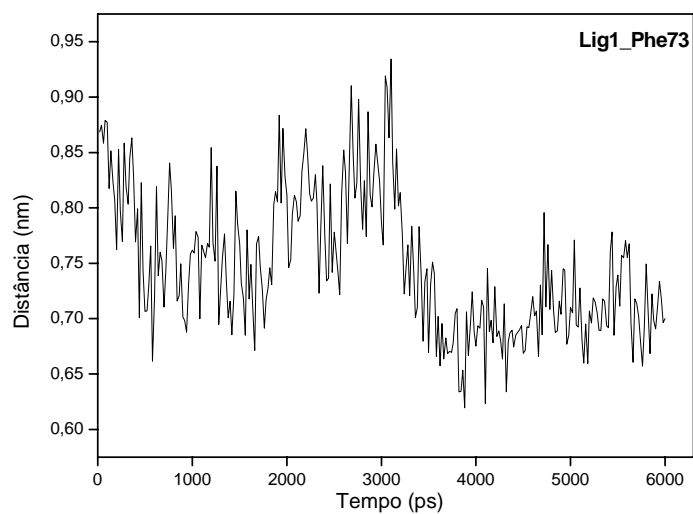
Varição da distância entre o resíduo Trp238 e a uridina, durante a simulação de DM.



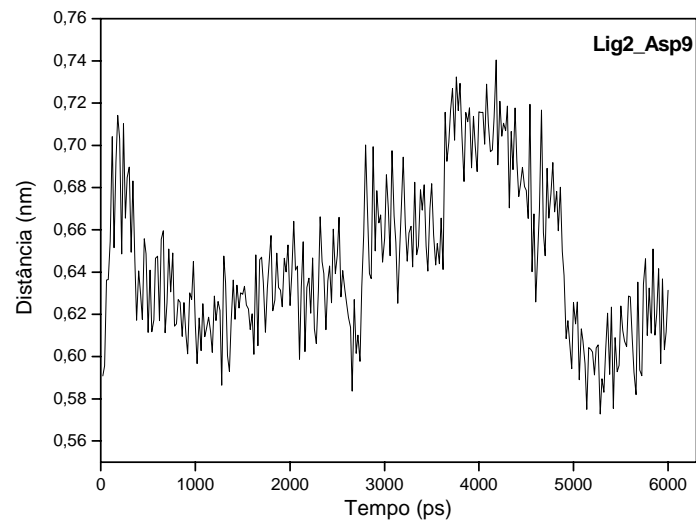
Varição da distância entre o resíduo Trp235 e a uridina, durante a simulação de DM.



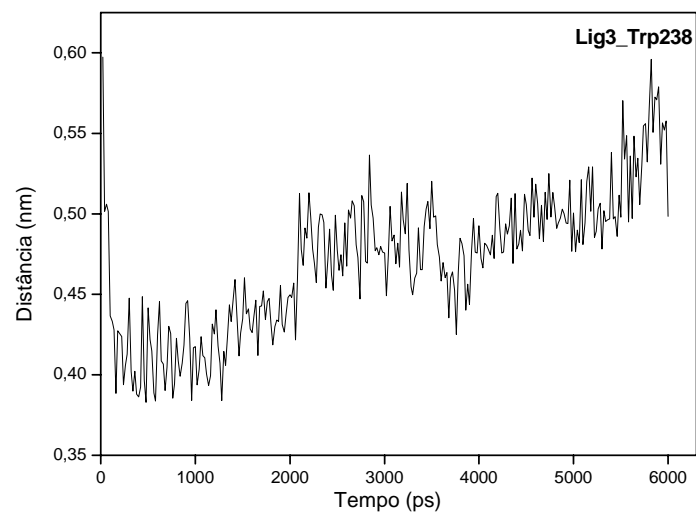
Varição da distância entre o resíduo Asp38 e o ligante1, durante a simulação de DM.



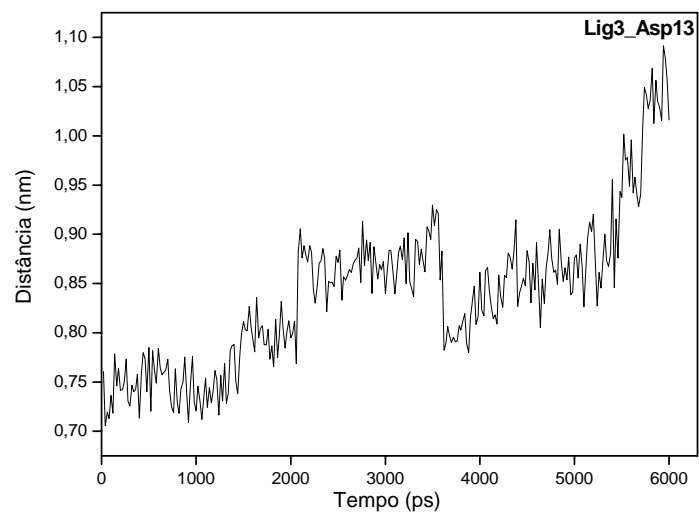
Varição da distância entre o resíduo Phe73 e o ligante 1, durante a simulação de DM.



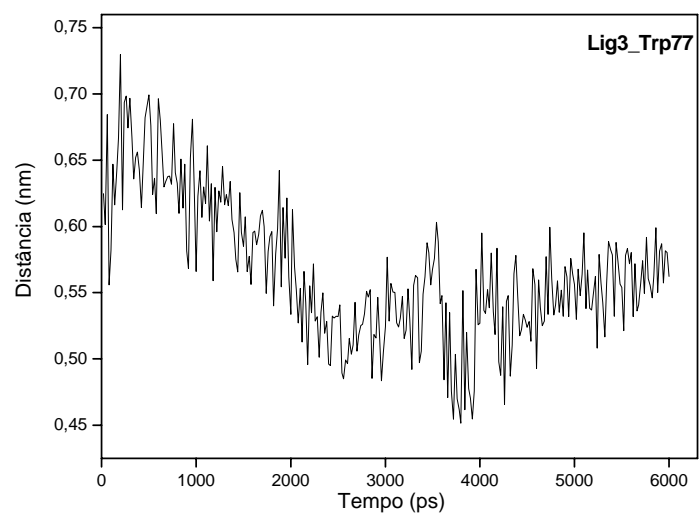
Varição da distância entre o resíduo Asp9 e o ligante 2, durante a simulação de DM.



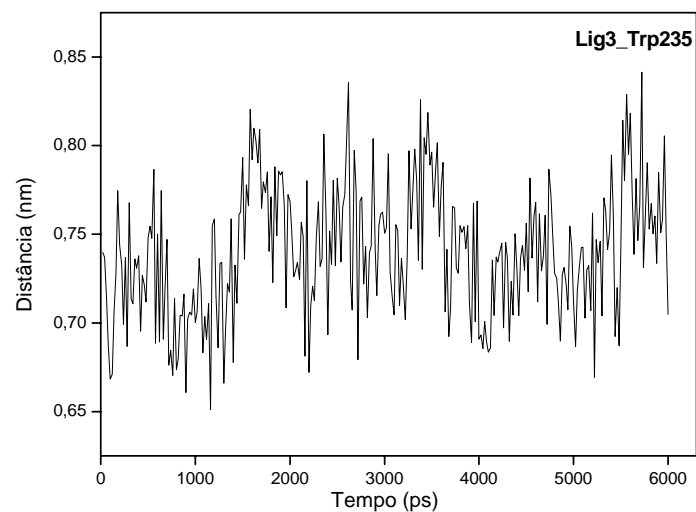
Varição da distância entre o resíduo Trp238 e o ligante 3, durante a simulação de DM.



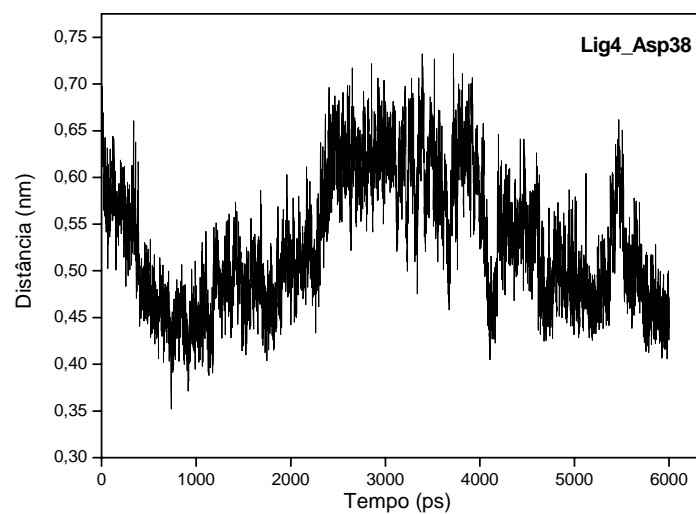
Variação da distância entre o resíduo Asp13 e o ligante 3, durante a simulação de DM.



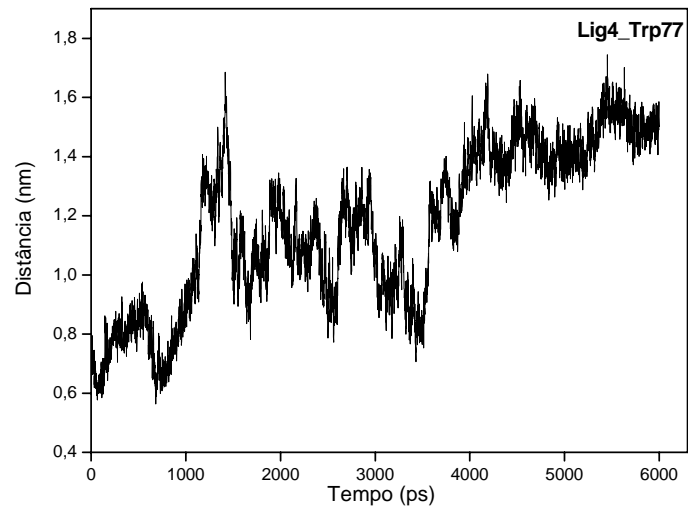
Variação da distância entre o resíduo Trp77 e o ligante 3, durante a simulação de DM.



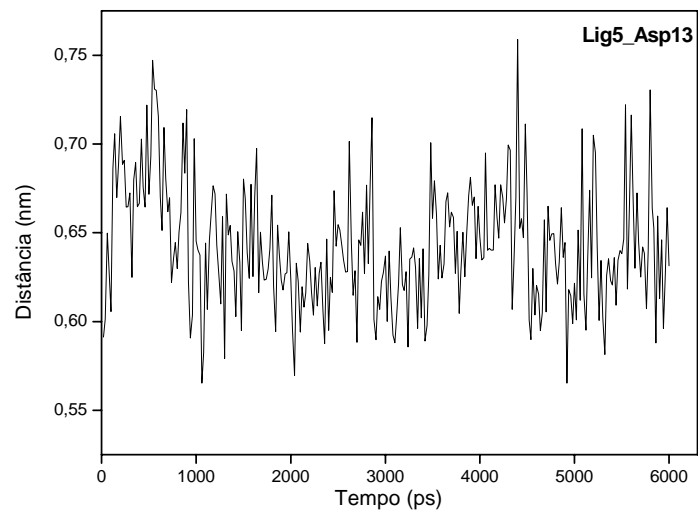
Variação da distância entre o resíduo Trp235 e o ligante 3, durante a simulação de DM.



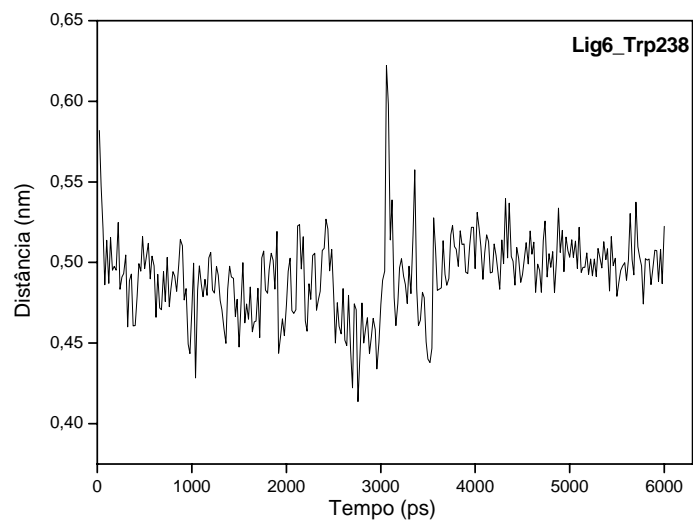
Variação da distância entre o resíduo Asp38 e o ligante 4, durante a simulação de DM.



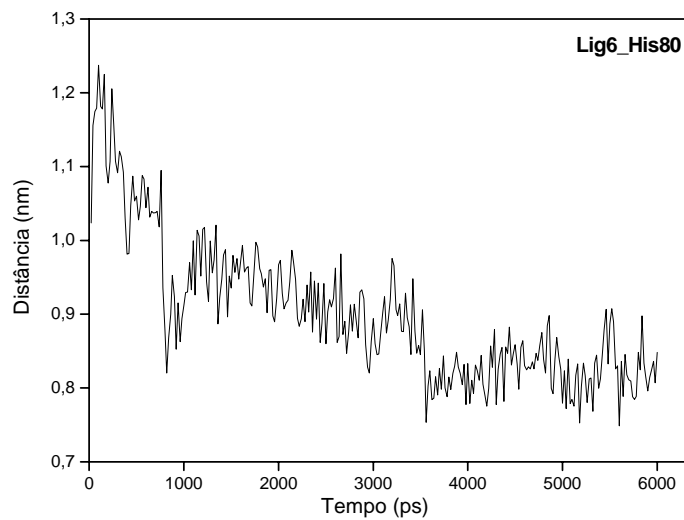
Variação da distância entre o resíduo Trp77 e o ligante 4, durante a simulação de DM.



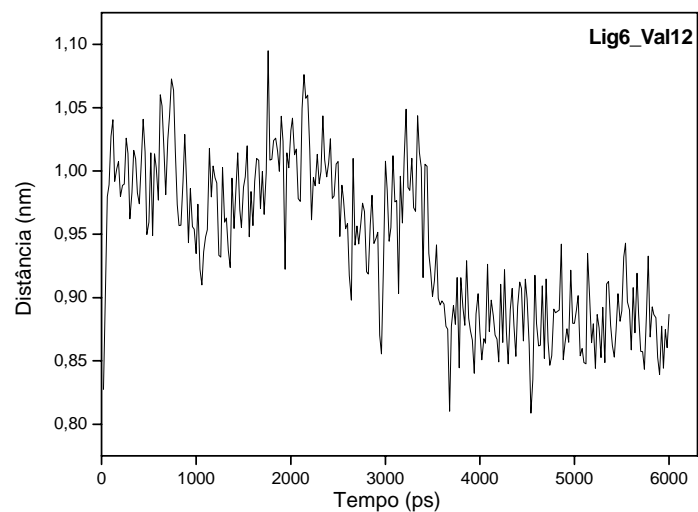
Variação da distância entre o resíduo Asp13 e o ligante 5, durante a simulação de DM.



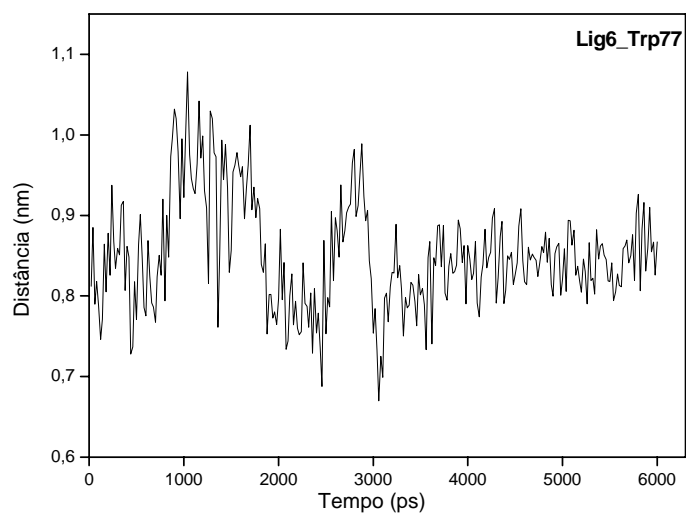
Variação da distância entre o resíduo Trp238 e o ligante 6, durante a simulação de DM.



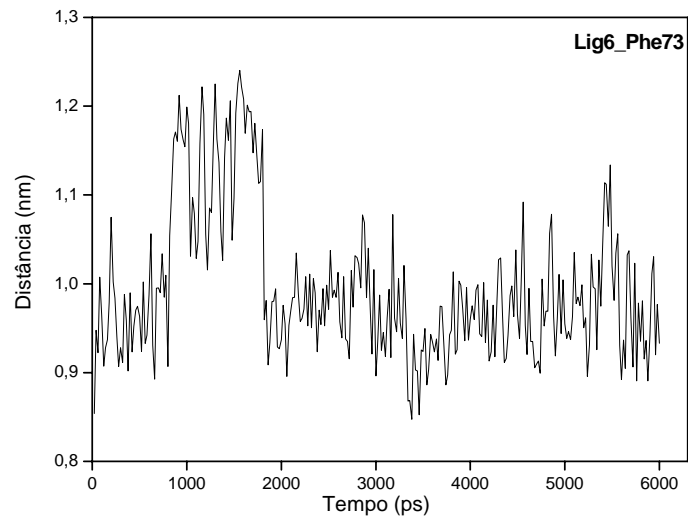
Variação da distância entre o resíduo His80 e o ligante 6, durante a simulação de DM.



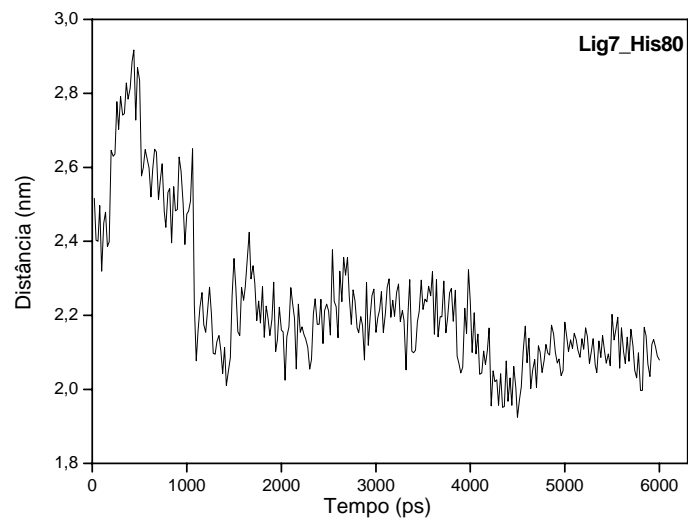
Variação da distância entre o resíduo Val12 e o ligante 6, durante a simulação de DM.



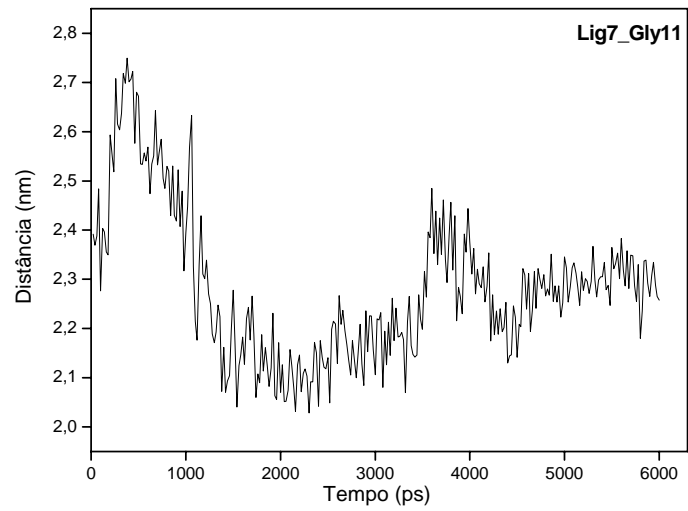
Variação da distância entre o resíduo Trp77 e o ligante 6, durante a simulação de DM.



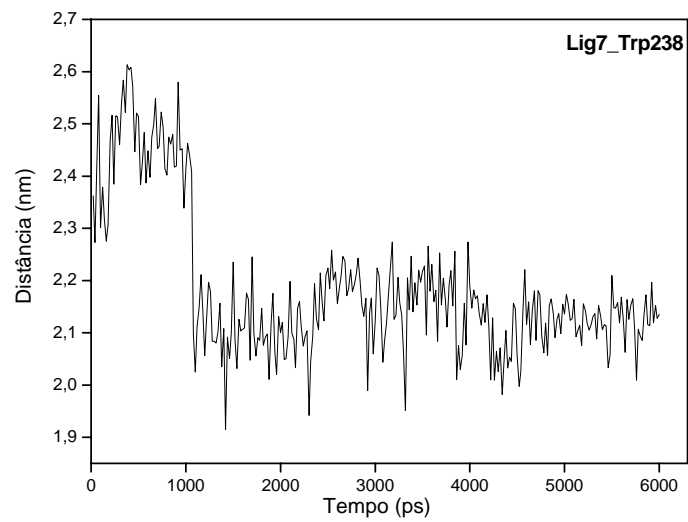
Variação da distância entre o resíduo Phe73 e o ligante 6, durante a simulação de DM.



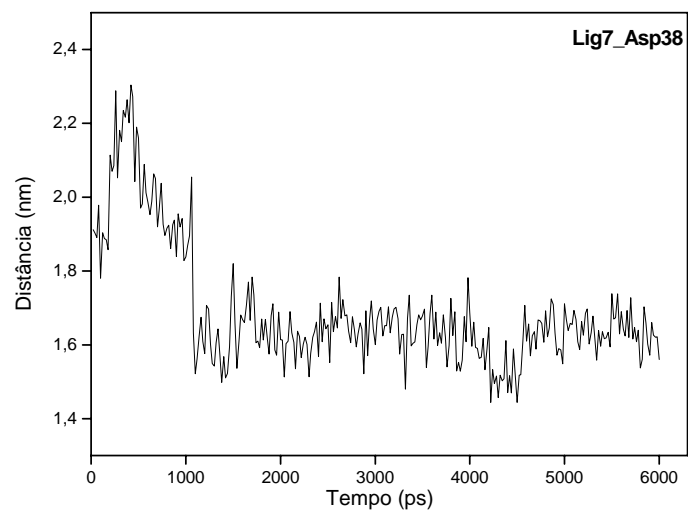
Variação da distância entre o resíduo His80 e o ligante 7, durante a simulação de DM.



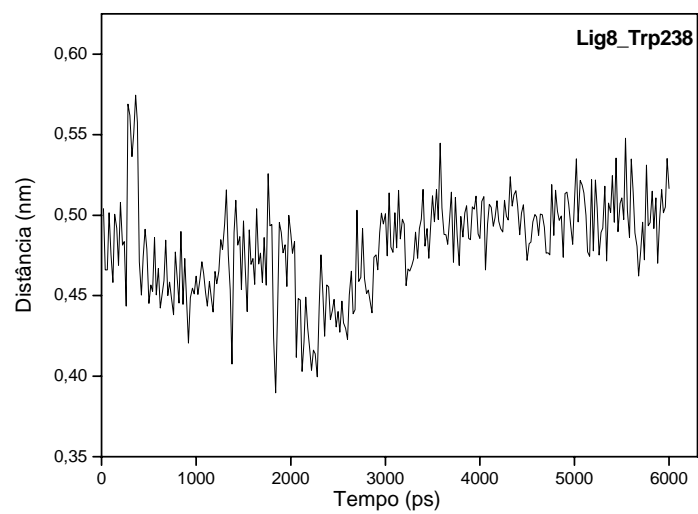
Variação da distância entre o resíduo Gly11 e o ligante 7, durante a simulação de DM.



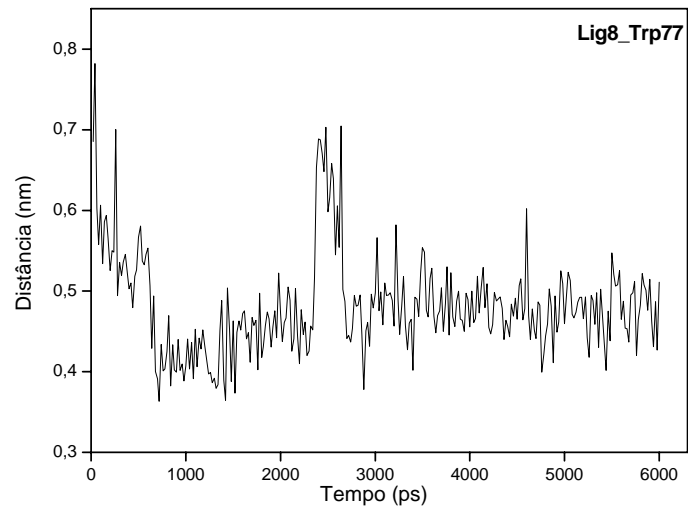
Variação da distância entre o resíduo Trp238 e o ligante 7, durante a simulação de DM.



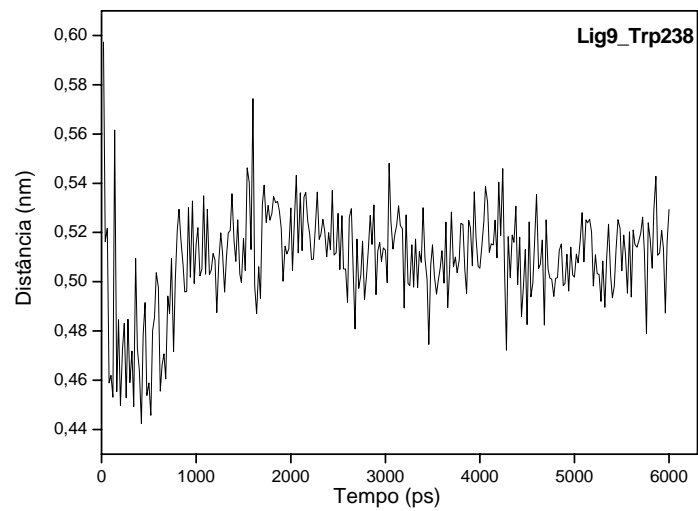
Variação da distância entre o resíduo Asp38 e o ligante 7, durante a simulação de DM.



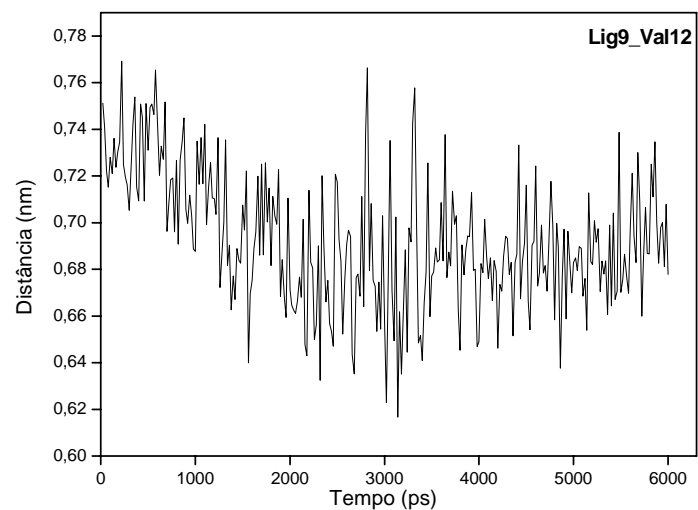
Variação da distância entre o resíduo Trp238 e o ligante 8, durante a simulação de DM.



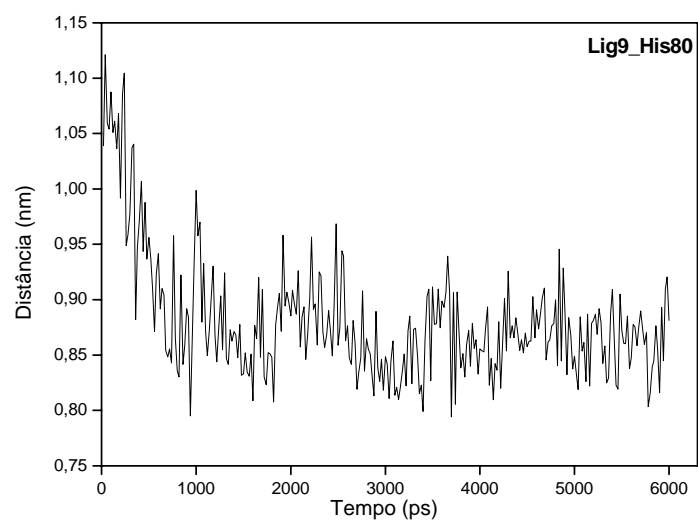
Variação da distância entre o resíduo Trp77 e o ligante 8, durante a simulação de DM.



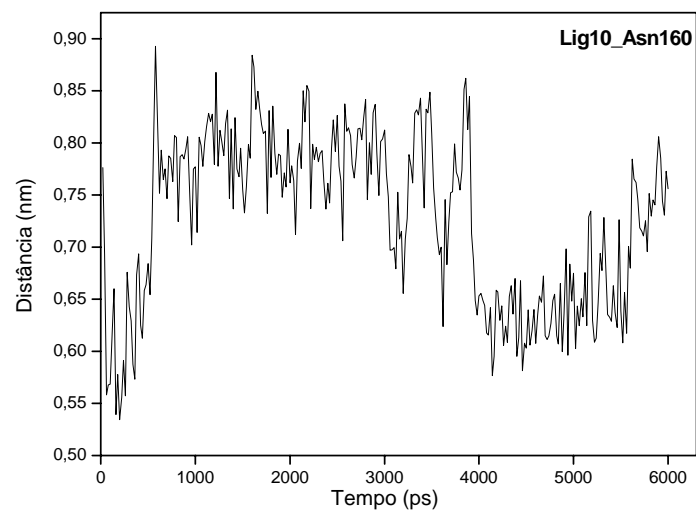
Variação da distância entre o resíduo Trp238 e o ligante 9, durante a simulação de DM.



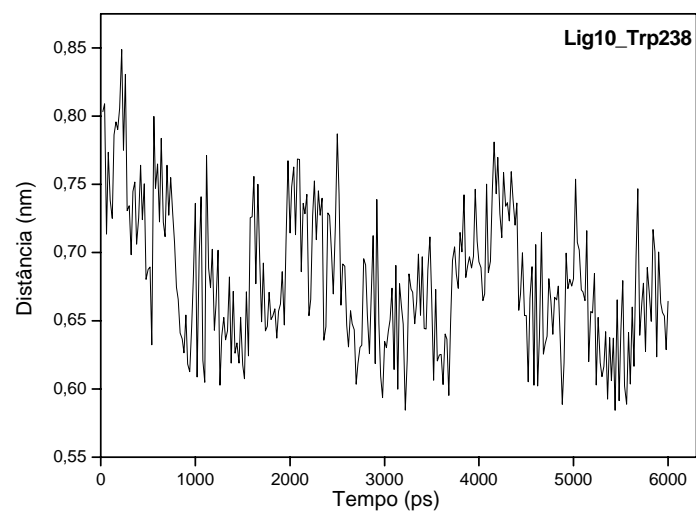
Variação da distância entre o resíduo Val12 e o ligante 9, durante a simulação de DM.



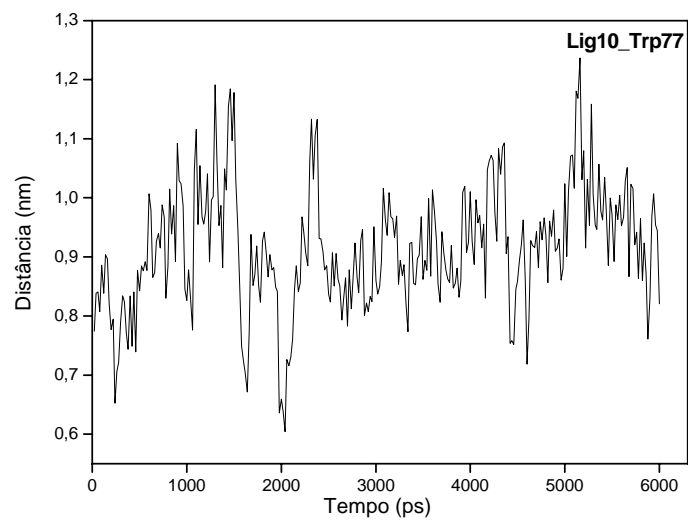
Variação da distância entre o resíduo His80 e o ligante 9, durante a simulação de DM.



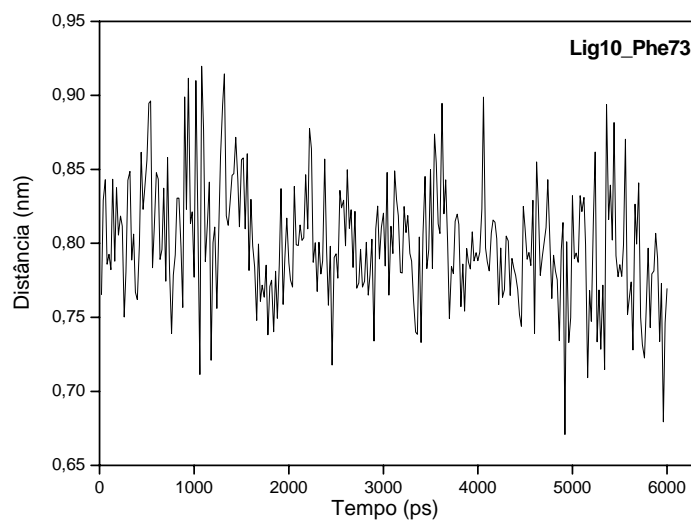
Varição da distância entre o resíduo Asn160 e o ligante10, durante a simulação de DM.



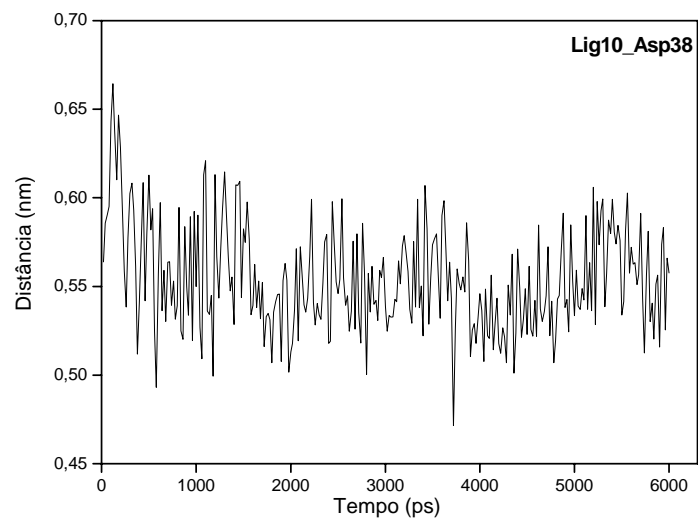
Varição da distância entre o resíduo Trp238 e o ligante10, durante a simulação de DM.



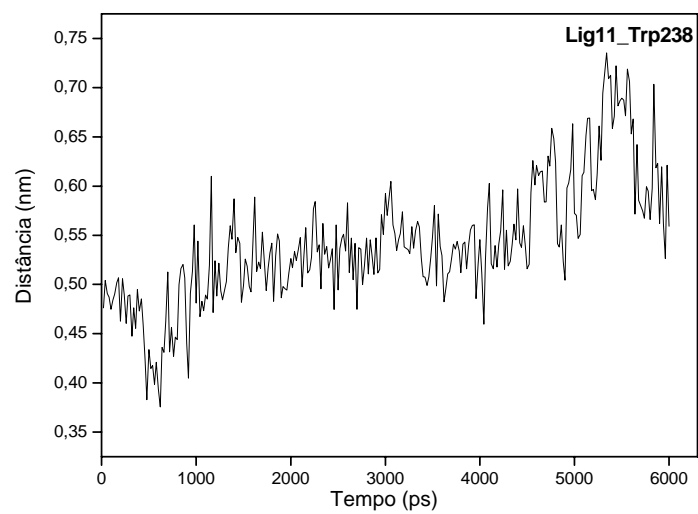
Variação da distância entre o resíduo Trp77 e o ligante10, durante a simulação de DM.



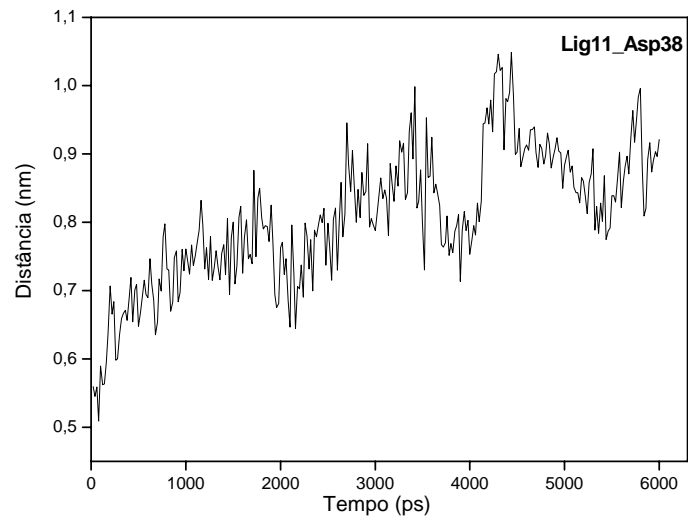
Variação da distância entre o resíduo Phe73 e o ligante10, durante a simulação de DM.



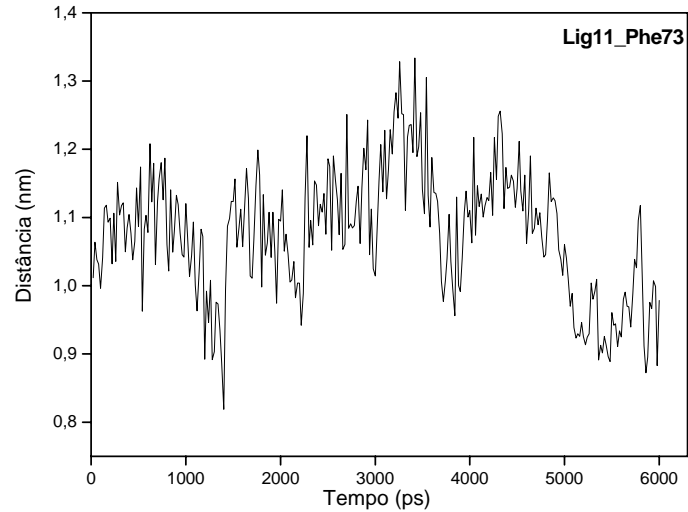
Varição da distância entre o resíduo Asp38 e o ligante 10, durante a simulação de DM.



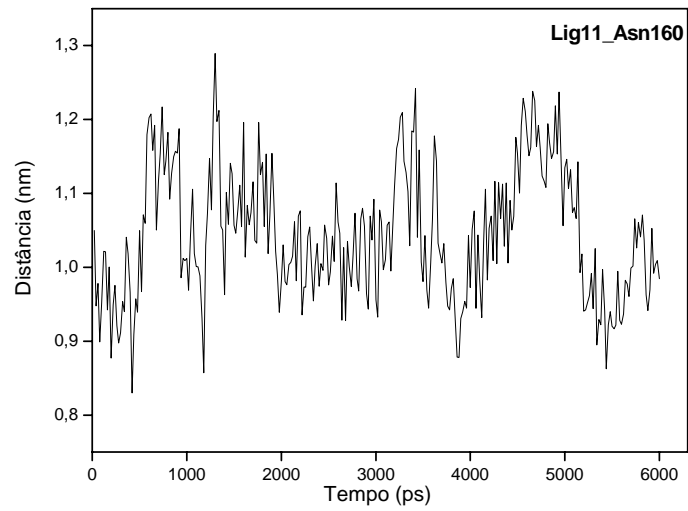
Varição da distância entre o resíduo Trp238 e o ligante11, durante a simulação de DM.



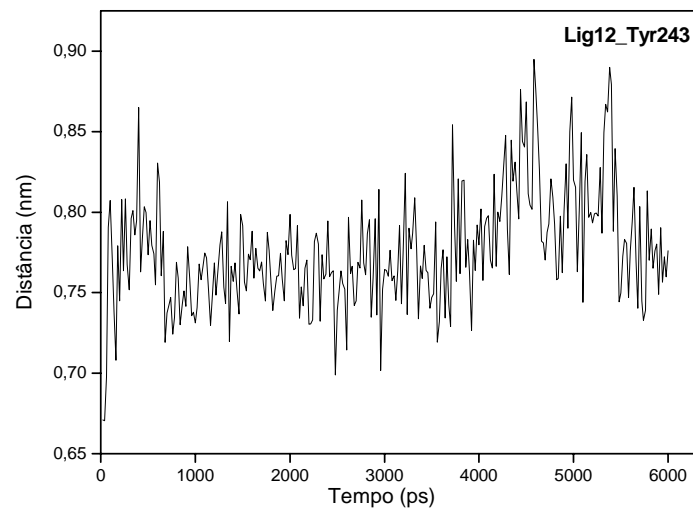
Variação da distância entre o resíduo Asp38 e o ligante11, durante a simulação de DM.



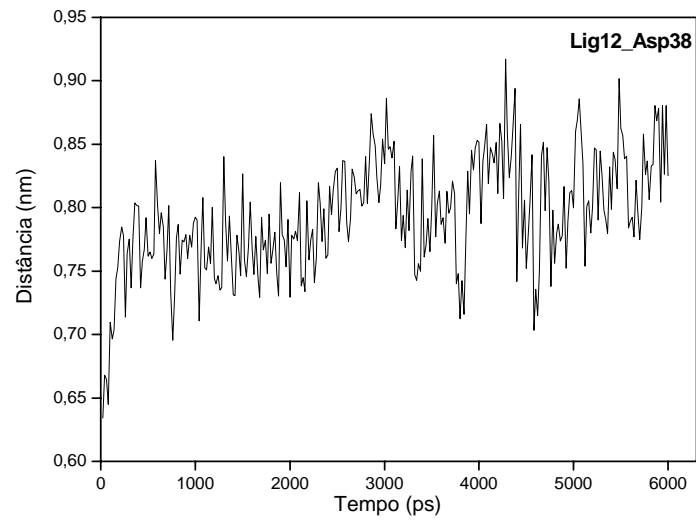
Variação da distância entre o resíduo Phe73 e o ligante11, durante a simulação de DM.



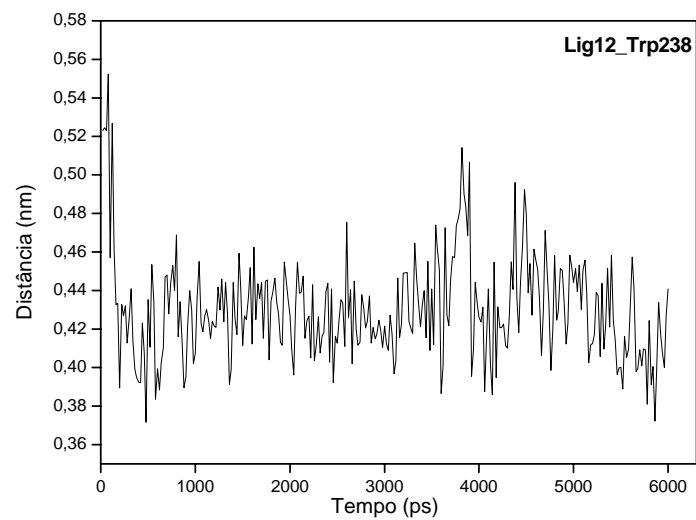
Varição da distância entre o resíduo Asn160 e o ligante 11, durante a simulação de DM.



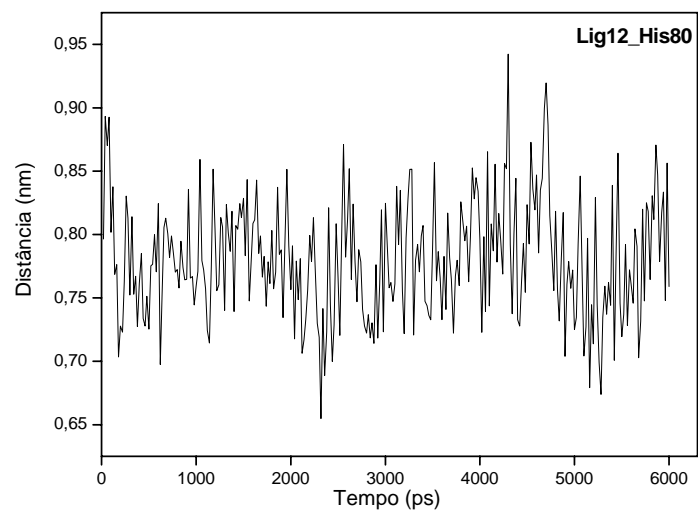
Varição da distância entre o resíduo Tyr243 e o ligante 12, durante a simulação de DM.



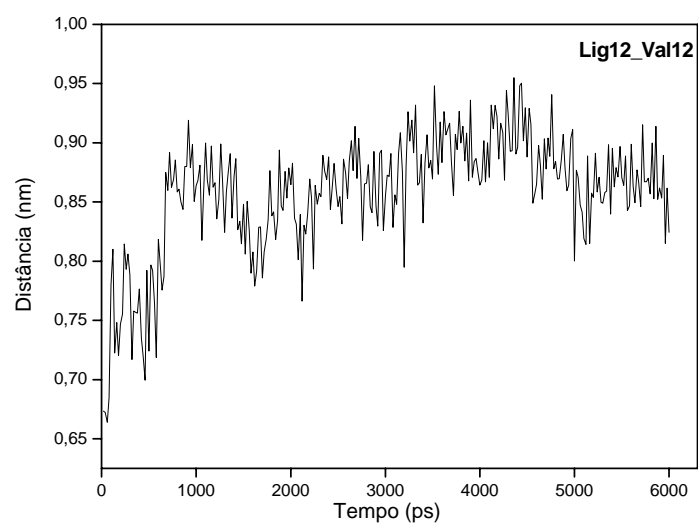
Variação da distância entre o resíduo Asp38 e o ligante 12, durante a simulação de DM.



Variação da distância entre o resíduo Trp238 e o ligante 12, durante a simulação de DM.



Variação da distância entre o resíduo His80 e o ligante 12, durante a simulação de DM.



Variação da distância entre o resíduo Val12 e o ligante 12, durante a simulação de DM.