



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Ernesto Tavares Neto

Avaliação das propriedades de interação envolvendo as proteínas  
Albumina de Soro Humano (HSA) e Albumina de Soro Bovino (BSA)

São José do Rio Preto  
2022

Ernesto Tavares Neto

Avaliação das propriedades de interação envolvendo as proteínas  
Albumina de Soro Humano (HSA) e Albumina de Soro Bovino (BSA)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira

São José do Rio Preto  
2022

T231a	<p>Tavares Neto, Ernesto</p> <p>Avaliação das propriedades de interação envolvendo as proteínas Albumina de Soro Humano (HSA) e Albumina de Soro Bovino (BSA) / Ernesto Tavares Neto. -- São José do Rio Preto, 2022</p> <p>49 p. : il., tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientador: Leandro Cristante de Oliveira</p> <p>1. Albumina. 2. Estresse Oxidativo. 3. Afinidade de ligação. 4. Fenilbutazona. 5. DCM. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ernesto Tavares Neto

**Avaliação das propriedades de interação envolvendo as proteínas  
Albumina de Soro Humano (HSA) e Albumina de Soro Bovino (BSA)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucianna Helene Silva dos Santos  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
04 de Fevereiro 2021

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Antônio Angelo Tavares e Vera Sônia Santiago Tavares, e familiares que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos meus amigos e colegas de grupo de pesquisa por todo apoio e paciência ao longo desse percurso.

A minha namorada Mariana, que é e foi fundamental durante essa jornada, em especial durante esse período caótico que enfrentamos no ano de 2020.

Ao professor Leandro pela orientação, paciência, confiança e todos os ensinamentos proporcionados.

Ao professor Valdecir, pela colaboração, discussão de resultados e sugestões, e ao trabalho de seu grupo de pesquisa que foram fundamentais durante a execução deste projeto.

Aos professores Lucianna e Marinônio, por aceitar o convite para compor a banca examinadora e pelas contribuições ao trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, diretamente ou indiretamente, e que não mencionei aqui.

Ao Departamento de Física e GridUnesp pela infraestrutura e suporte oferecidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

SCHOPENHAUER, Arthur

## RESUMO

Albumina de Soro Humano (HSA) é uma proteína com grande importância biológica especialmente por sua função transportadora. Alterações em suas características de transporte é um problema chave em estudos atuais. O estresse oxidativo é responsável por causar grande parte dessas modificações em HSA, proteína que sofre com as espécies reativas ao oxigênio (ROS). O excesso de ROS está diretamente relacionado ao processo de oxidação em proteínas. O trabalho foi dividido em duas propostas distintas, onde na primeira os resíduos de aminoácidos de sítio I, Trp-214 e Lys-199, foram modificados computacionalmente e comparados aos dados experimentais obtidos por colaboradores. Assim, foi avaliado as alterações na afinidade de ligação com o composto fenilbutazona. Os agentes taurina monoclорamina (Tau-NHCl) e taurina dibromamina (Tau-NBr<sub>2</sub>) foram usados para oxidar a HSA. Foram observadas experimentalmente alterações espectroscópicas na proteína resultantes da oxidação do Trp-214, indicando a formação de N'-formylkynurenine (NFK). A oxidação da HSA via Tau-NBr<sub>2</sub> gerou um significativo aumento na constante de associação com a fenilbutazona, o que não foi verificado via Tau-NHCl. Os resíduos Trp-214 e Lys-199 foram substituídos computacionalmente e simulados pelos respectivos produtos da oxidação. A energia de interação calculada usando a função Amber score mostrou que a forma nativa da HSA apresentou uma energia de interação menor do que para os casos oxidados, HSA com Trp-214 modificado para NFK e HSA com Lys-199 modificada para sua forma carbonilada. Assim, os resultados computacionais corroboraram com os obtidos experimentalmente indicando que as alterações oxidativas dos resíduos de aminoácidos no sítio I da HSA afetam suas propriedades de ligação. Na segunda proposta, a Albumina de Soro Bovino (BSA), uma proteína homóloga a HSA, foi avaliada por sua estrutura similar e por possuir algumas especificidades em sua sequência primária. A análise computacional revelou que HSA oferece algumas vantagens como a preferência pela ligação de compostos em comparação a BSA. Neste trabalho, a mesma abordagem computacional e experimental foi usada para caracterizar as especificidades na afinidade de ligação entre as proteínas humana e bovina. O composto 4-(Dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (DCM) foi utilizado nessas análises. As simulações de *docking* e dinâmica molecular mostraram que o composto apresenta uma maior afinidade verificada pelas energias de ligação para as interações no sítio I da HSA comparado aos sítios II e III, e o deslocamento do DCM de seu sítio de ligação na presença de compostos de mesmo sítio mostrou que o mesmo ocorre experimentalmente. Também foi mostrado pelas simulações computacionais que o DCM possui maior afinidade de ligação para a HSA (sítio I) comparado ao mesmo sítio da BSA, e esses resultados corroboraram com a medida experimental das constantes de associação (avaliado por fluorescência e pela supressão da fluorescência intrínseca das proteínas). Em geral, esses resultados sugerem a existência de especificidades nas características de ligação entre as espécies da albumina, indicando potenciais causadores das diferenças e fornecendo pontos de partida para estudos futuros envolvendo essas proteínas e compostos com propriedades farmacológicas.

**Palavras-chave:** Albumina. HSA. BSA. Estresse Oxidativo. Afinidade de Ligação. Fenilbutazona. DCM. Análise Computacional e Experimental.

## ABSTRACT

Human Serum Albumin (HSA) is a protein of great biological importance especially for its transport function. Alterations in its transport characteristics are a key problem in current studies. Oxidative stress is responsible for causing most of these alterations in HSA, a protein that suffers from reactive oxygen species (ROS). The excess of ROS is directly related to the oxidation process in proteins. The work was divided into two distinct proposals. In the first one the amino acid residues of site I, Trp-214 and Lys-199, were computationally modified and compared to the experimental data obtained by collaborators. Thus, the alterations in the binding affinity with the compound phenylbutazone was evaluated. The agents taurine monochloramine (Tau-NHCl) and taurine dibromamine (Tau-NBr<sub>2</sub>) were used to oxidize HSA. Spectroscopic changes in the protein resulting from the oxidation of Trp-214 were observed experimentally, indicating the formation of N'-formylkynurenine (NFK). The oxidation of HSA via Tau-NBr<sub>2</sub> generated a significant increase in the association constant with Phenylbutazone, which was not verified by Tau-NHCl. Trp-214 and Lys-199 residues were computationally replaced and simulated by the respective oxidation products. The binding energy calculated using the Amber score function showed that the native form of HSA had a lower binding energy than for oxidized cases, HSA with Trp-214 modified to NFK and HSA with Lys-199 modified to its carbonylated form. Thus, the computational results corroborated with those obtained experimentally indicating that the oxidative alterations of the amino acids residues in the site I of HSA affect its binding properties. In the second proposal, Bovine Serum Albumin (BSA), a protein homologous to HSA, was evaluated for its similar structure and for presenting some specificities in its primary sequence. Computational analysis revealed that HSA offers some advantages related to the binding of compounds over BSA. In this work, the same computational and experimental approach was used to characterize the specificities in the binding affinity between human and bovine proteins. The compound 4-(Dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (DCM) was used in these analyzes. Molecular docking and molecular dynamics simulations showed that the compound has a higher affinity verified by the binding energies for interacting at site I of HSA compared to sites II and III, and the displacement of DCM from its binding site in the presence of compounds from the same site showed that the same occurs experimentally. It was also shown by computer simulations that DCM has a higher affinity for binding to HSA (site I) compared to the same site of BSA, and these results corroborated with the experimental measurement of association constants (evaluated by fluorescence and by the quenching of intrinsic fluorescence of proteins). In general, these results suggest the existence of specificities in the binding characteristics between the albumin species, indicating potential causes of the differences and providing starting points for future studies involving these proteins and compounds with pharmacological properties.

**Keywords:** Albumin; HSA; BSA; Oxidative Stress; Binding Affinity; Phenylbutazone; DCM; Computational and Experimental Analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação na forma de **cartoon** da estrutura cristalográfica da proteína HSA (PDB ID: 2BXC). Os domínios estão nomeados e coloridos de acordo com seus subdomínios. O subdomínio A está representado pelas cores azul escuro (I), verde escuro (II) e amarelo (III), enquanto o subdomínio B está representado pelas cores azul claro (I), verde claro (II) e vermelho (III). Sua estrutura foi resolvida pelo método de difração de raios-X, com resolução de 3.1Å 14
- Figura 2:** Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas HSA e BSA. Os resíduos estão coloridos de acordo com a seguinte representação: alta conservação (vermelho), baixa conservação (azul) e neutro (preto). Representação preparada usando a ferramenta MultiAlin [37]. 15
- Figura 3:** Representação na forma de cartoon da estrutura cristalográfica da proteína BSA (PDB ID: 4OR0). Os domínios estão nomeados e coloridos de acordo com seus subdomínios. O subdomínio A está representado pelas cores azul escuro (I), verde escuro (II) e amarelo (III), enquanto o subdomínio B está representado pelas cores azul claro (I), verde claro (II) e vermelho (III). Sua estrutura foi resolvida pelo método de difração de raios-X, com resolução de 2.58Å. 16
- Figura 4:** Representação ilustrativa da metodologia de busca por cavidades por meio de esferas sobre a superfície molecular do receptor. (a) Cada esfera é gerada tangente aos pontos de superfície  $i, j$  com o centro na superfície normal do ponto  $i$ . (b) Representação esquemática de um pequeno sítio de ligação formado por cinco átomos (roxo). As esferas (azul) são geradas usando pontos da superfície molecular (verde) com seus centros que se encontram ao longo dos vetores normais da superfície. 19
- Figura 5:** Transformação dos resíduos para mimetizar o processo de oxidação. Representação tridimensional dos resíduos mudando de a) 25

triptofano para b) *N*'-formylkynurenine, e de c) lisina para d) lisina carbonilada. Imagem preparada usando UCSF chimera.

**Figura 6:** Resultados do Docking molecular entre a HSA e o composto DCM. As orientações do DCM com as menores energias da função Amber score para cada sítio de ligação da HSA estão apresentadas em amarelo (sítio I), azul (sítio II), e verde (sítio III). Os recortes mostram uma visão de cada sítio, onde os pontos em volta do ligante representam sua superfície molecular. As energias de ligação calculadas entre o DCM e a HSA foram -46.0 kJ/mol, -43.8 kJ/mol, e -45.1 kJ/mol, respectivamente. Representação preparada usando UCSF Chimera.

**Figura 7:** Mapas de interação. Representação das interações entre fenilbutazona e a) HSA, b) HSA com Trp-214 modificado para *N*'-formylkynurenine (W\*214), e d) HSA com Lys-199 modificado para sua forma carbonilada (K\*199). A legenda na base apresenta todos os tipos de interação avaliadas pelo programa Maestro, com, em particular, ligações de hidrogênio representadas pelas setas na cor rosa e interações hidrofóbicas em verde. As medidas das distâncias e orientações das cadeias laterais para a conformação na Figura 11c sugerem que apenas a ligação de hidrogênio envolvendo a Lys-199 está ocorrendo (a interação com a Lys-205 apenas aparece na representação devido instruções do algoritmo do Maestro). Representações preparadas usando Maestro (Schrödinger Release 2017-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017).

**Figura 8:** Resultados de Docking molecular entre a HSA e o composto DCM. As orientações do DCM com as menores energias da função Amber score para cada sítio de ligação da HSA estão apresentadas em amarelo (sítio I), azul (sítio II), e verde (sítio III). Uma visão detalhada de cada sítio está apresentada em destaque, onde os pontos em volta do ligante representam sua superfície molecular. As energias de ligação calculadas entre o DCM e a HSA foram -46.0 kJ/mol, -43.8 kJ/mol, e -45.1 kJ/mol, respectivamente. Representação preparada usando UCSF Chimera.

**Figura 9:** RMSD entre o composto DCM e HSA durante os 20 ns das simulações de dinâmica molecular. Os cálculos mostram a estabilidade do

ligante durante sua interação no a) sítio I, b) sítio II, e c) sítio III da HSA. Os gráficos mostram que o DCM possui estabilidade similar nos sítios I e III, sendo menos estável no sítio II. A leve diferença entre esses dois sítios é evidenciada pelas energias de ligação apresentadas na Tabela 3.

**Figura 10:** Comparação entre as estruturas da HSA e BSA. As orientações do DCM com as menores energias da função Amber score para o sítio I de cada proteína estão apresentadas em amarelo (HSA) e vermelho (BSA). As estruturas da HSA e BSA estão coloridas em azul e verde, respectivamente. O recorte mostra uma visão detalhada do sítio I de cada proteína, onde os pontos em volta do ligante representam sua superfície molecular. As energias de ligação calculadas entre DCM-HSA e DCM-BSA foram -46.0 kJ/mol e -37.0 kJ/mol, respectivamente. Representação preparada usando UCSF Chimera.

**Figura 11:** RMSD do composto DCM no sítio I das proteínas HSA e BSA durante os 20ns das simulações de dinâmica molecular. Os cálculos mostram a estabilidade do ligante durante sua interação com a) HSA, e b) BSA. Os gráficos mostram que o DCM é mais estável durante sua interação com a HSA. Essa diferença é corroborada pelas energias de ligação mostradas na Tabela 4. Esses resultados também sugerem que o ligante possa identificar as especificidades entre o mesmo sítio dessas duas proteínas homólogas.

**Figura 12:** Mapas de interação. Representação do DCM durante sua interação com a) HSA, e b) BSA, ambas no sítio I. O algoritmo do Maestro avaliou todos os tipos de interação possíveis. No entanto, a legenda na base mostra apenas as interações que estão ocorrendo, em particular, ligações de hidrogênio (setas em rosa), e interações hidrofóbicas (resíduos em verde). Representações preparadas usando Maestro (Schrödinger Release 2019-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019).

**Figura 13:** Representação da rede cúbica infinita utilizada nas simulações de MD. A caixa central de simulação está em destaque ao centro da imagem, seguida por suas réplicas ao longo de todo o espaço.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores obtidos para as energias de ligação entre HSA e PBZ.	25
Tabela 2 – Valores das energias de ligação obtidos via simulações de docking molecular entre HSA e DCM, antes e após as simulações de dinâmica molecular.	31
Tabela 3 – Valores das energias de ligação obtidos via simulações de docking molecular para o DCM no sítio I das proteínas HSA e BSA, antes e após as simulações de dinâmica molecular.	33

## SUMÁRIO

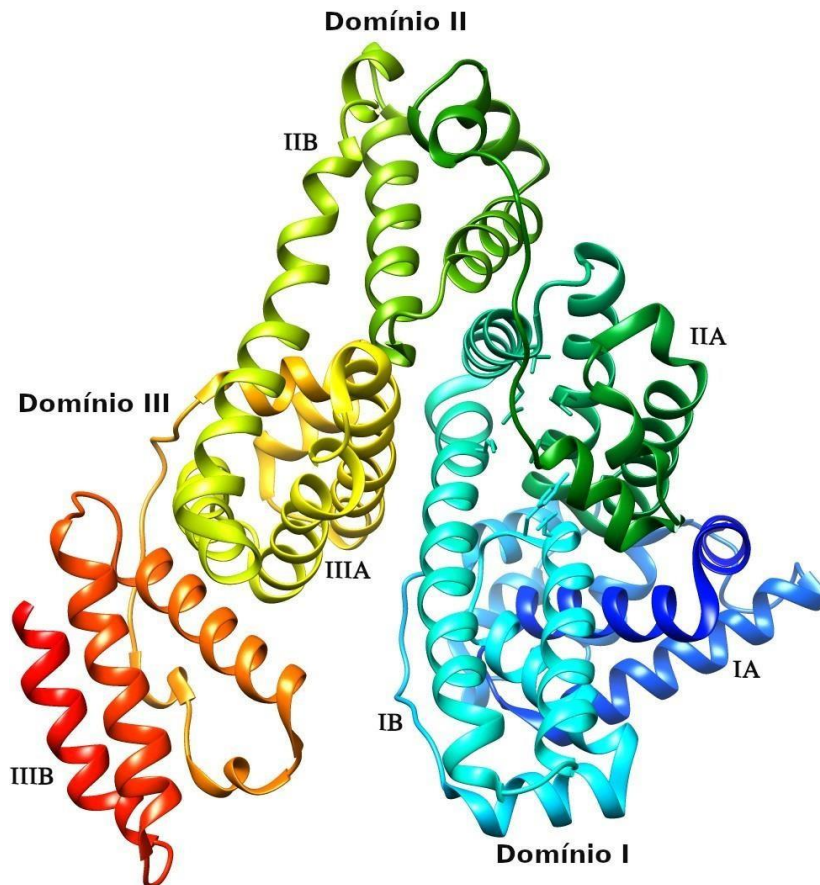
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2</b>	<b>MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS</b>	17
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	18
3.1	<i>Docking Molecular</i>	18
3.2	Dinâmica Molecular	22
<b>4</b>	<b>ALTERAÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS TRP-214 E</b>	24
	<b>LYS-199 DA PROTEÍNA HSA VIA OXIDAÇÃO</b>	
4.1	Resultados	24
4.2	Discussão	28
4.3	Conclusões	29
<b>5</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS</b>	30
	<b>HSA E BSA COM O COMPOSTO DCM</b>	
5.1	Resultados	30
5.2	Discussão	35
5.3	Conclusões	36
	<b>REFERÊNCIAS</b>	37
	<b>APÊNDICE A - Descrição de algumas metodologias</b>	45
	<b>empregadas para as simulações de dinâmica molecular</b>	
	<b>ANEXO A - Publicações referentes ao presente curso de</b>	47
	<b>mestrado</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

A albumina do soro é a principal proteína do plasma sanguíneo encontrando-se em grandes concentrações [2]. Ela possui grande importância no metabolismo de diversos compostos, participando diretamente do controle da pressão osmótica e do pH sanguíneo [3]. As albuminas são carregadas negativamente e são altamente solúveis em água, sendo assim responsáveis também pela distribuição de líquidos nos tecidos [4]. Devido a essas características, as proteínas séricas atuam de maneira eficiente no transporte e distribuição de compostos [5,6], sendo alvo de vários estudos, os quais tentam elucidar os mecanismos envolvidos na interação dessas proteínas com pequenas moléculas de interesse biológico [7]. Diferentes espécies de albuminas são conhecidas, sendo a humana (HSA) e bovina (BSA) os principais alvos de estudo presentes na literatura, as quais apresentam em torno de 25-30% de variedade em suas sequências primárias [8,9,10].

Albumina de Soro Humano (HSA) possui a característica de interagir de maneira reversível com diversos fármacos [11], o que a torna uma das principais proteínas de transporte no corpo humano. Ela compõe aproximadamente 60% do total de proteínas no corpo humano [2]. Sua sequência de aminoácidos é constituída por 585 resíduos, dentre eles um único resíduo de triptofano que é um aminoácido que sofre com o processo de oxidação [12,13]. Três domínios (I,II e III) formam sua estrutura, cada um sendo composto por dois subdomínios (A e B) [14], de acordo com a figura 1.

**Figura 1:** Representação na forma de **cartoon** da estrutura cristalográfica da proteína HSA (PDB ID: 2BXC). Os domínios estão nomeados e coloridos de acordo com seus subdomínios. O subdomínio A está representado pelas cores azul escuro (I), verde escuro (II) e amarelo (III), enquanto o subdomínio B está representado pelas cores azul claro (I), verde claro (II) e vermelho (III). Sua estrutura foi resolvida pelo método de difração de raios-X, com resolução de 3.1Å.



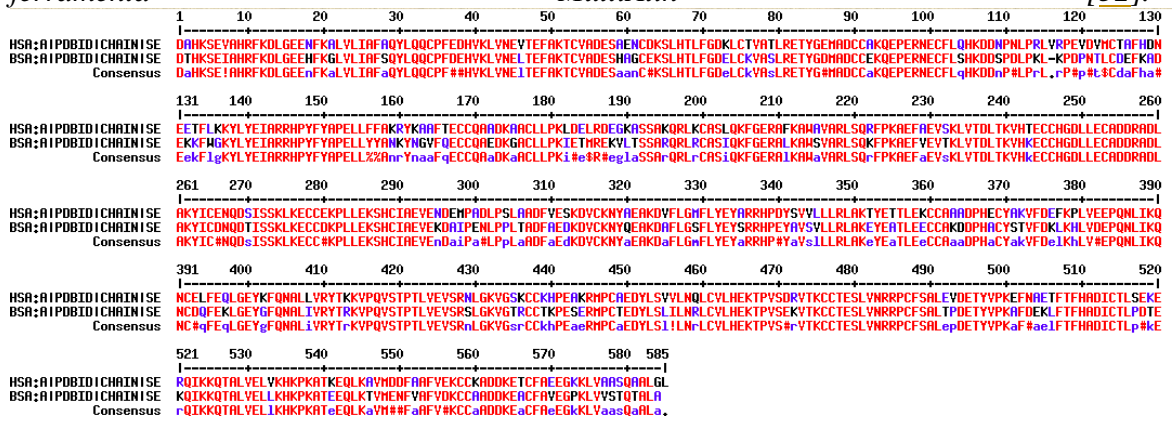
*Fonte: Elaborado pelo autor.*

O desequilíbrio entre a produção endógena e a neutralização das espécies reativas aos oxigênio (ROS) é a principal causa do estresse oxidativo [15], gerando dano em tecidos e biomoléculas, tais como câncer e doenças neurológicas e degenerativas [16,17,18,19]. As proteínas possuem aminoácidos suscetíveis a oxidação e isso pode causar modificações em suas estruturas secundária e terciária, alterando a capacidade delas em exercerem suas principais funções [20]. Dentre as moléstias causadas pela exposição de proteínas a um ambiente de estresse oxidativo, a diabetes, por exemplo, é causada pela alteração na habilidade da Albumina de Soro Humano (HSA) em desempenhar sua função como antioxidante

[21,22]. Essa proteína é altamente afetada pelo processo de oxidação [23]. HSA é encontrada no plasma sanguíneo, em condições fisiológicas, em duas formas, reduzida e oxidada, sendo a primeira predominante (70-80%) [24,25]. Diversas doenças, dentre elas complicações renais, diabetes e doenças no fígado, estão diretamente relacionadas com a oxidação da HSA, aumentando a concentração de sua forma oxidada [26,27,28]. Essas alterações também podem ter influências na afinidade de fármacos pela HSA, afetando a eficácia dessas drogas [29].

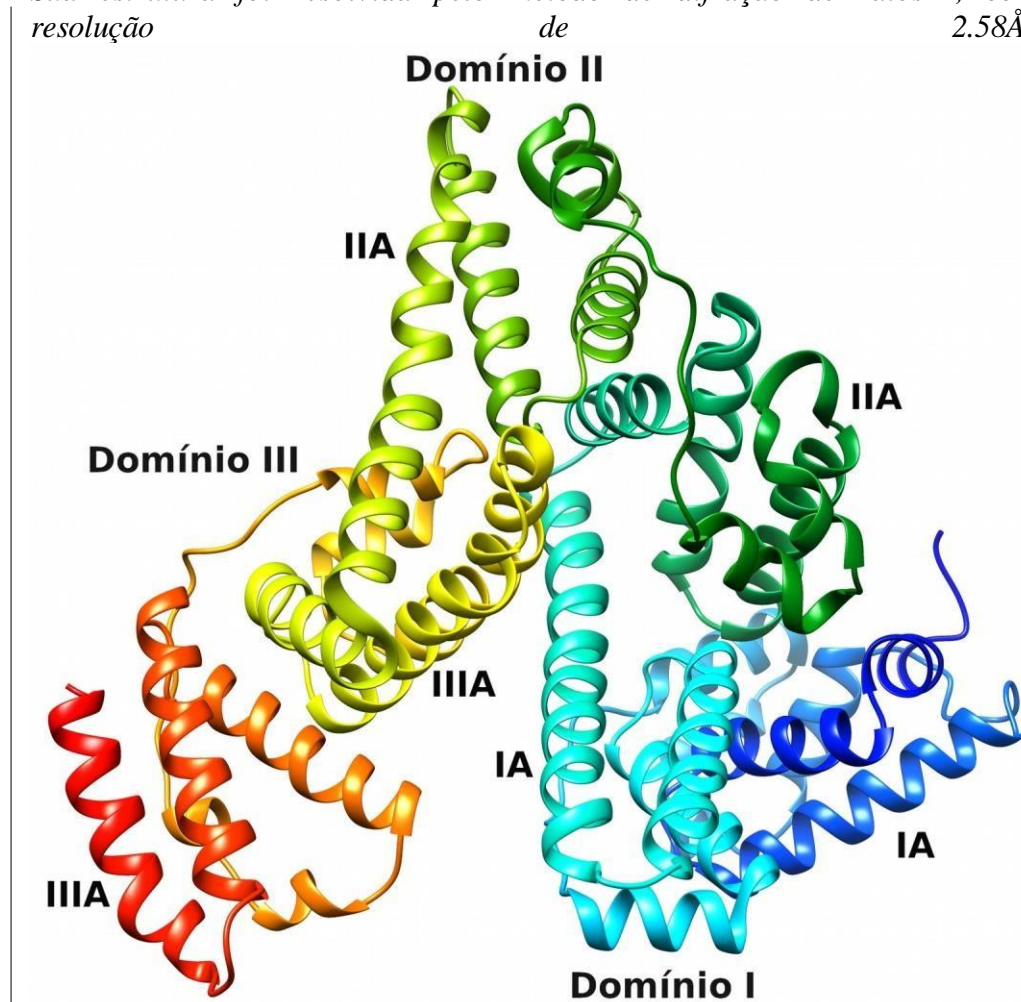
Albumina de Soro Bovino (BSA) é uma proteína que, apesar de apresentar variações em sua sequência de resíduos de aminoácidos (figura 2), possui estrutura semelhante a HSA [29], como apresentado na figura 3. Por serem proteínas homólogas, a BSA apresenta domínios parecidos com a HSA em estrutura (RMSD=5.6Å) e sequência (75.6% de identidade e 92.6% de similaridade). Sua estrutura possui três domínios (I, II e III), sendo esses rearranjados em dois domínios menores (A e B), e ela é composta por 583 aminoácidos [26].

**Figura 2:** Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas HSA e BSA. Os resíduos estão coloridos de acordo com a seguinte representação: alta conservação (vermelho), baixa conservação (azul) e neutro (preto). Representação preparada usando a ferramenta *MultiAlin* [32].



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 3:** Representação na forma de cartoon da estrutura cristalográfica da proteína BSA (PDB ID: 4OR0). Os domínios estão nomeados e coloridos de acordo com seus subdomínios. O subdomínio A está representado pelas cores azul escuro (I), verde escuro (II) e amarelo (III), enquanto o subdomínio B está representado pelas cores azul claro (I), verde claro (II) e vermelho (III). Sua estrutura foi resolvida pelo método de difração de raios-X, com resolução de 2.58Å.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 2 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

Baseado nas características da HSA como uma proteína carreadora e dos efeitos causados pela oxidação de seus resíduos, a primeira proposta do trabalho foi composta pela modificação dos aminoácidos que mais sofrem alterações em um ambiente oxidativo. Os agentes taurina cloramina (Tau-NHCl) e taurina dibromamina (Tau-NBr<sub>2</sub>) foram utilizados experimentalmente para avaliar essas alterações na HSA, as quais foram medidas pelo comportamento no composto Fenilbutazona (ligante de sítio I [31]) durante sua interação com HSA. Uma abordagem experimental e computacional foi empregada, na qual foram medidas as constantes de associação para as formas nativa e oxidada da proteína e esses dados foram comparados com os valores de energia obtidos, para ambos os casos, pelas simulações de *docking* molecular.

Em seguida, devido à necessidade do entendimento a respeito das funções das proteínas HSA e BSA como proteínas carreadoras no corpo, a segunda proposta do trabalho teve como objetivo a investigação dos sítios de ligação da HSA, destacando as especificidades das principais regiões de ligação de compostos e sua comparação com os mesmo sítios de sua proteína homóloga BSA. A sonda fluorescente 4-(Dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (DCM), que possui propriedades óticas, por exemplo, sendo muito utilizada como agente dopante [32], foi empregada nas análises a fim de caracterizar o comportamento das albuminas em sua presença. Os dados das simulações de docking e dinâmica molecular obtidos foram correlacionados com os resultados experimentais, indicando possíveis diferenças nas propriedades de ligação entre essas proteínas e o ligante avaliado.

### 3 METODOLOGIA

A identificação de regiões alvo, interação com diferentes compostos químicos com essas regiões e mapeamento das interações é realizado utilizando majoritariamente técnicas de *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular na sua forma convencional.

#### 3.1 *Docking* Molecular

O *docking* molecular é tradicionalmente o processo de “encaixar” pequenas moléculas (também chamadas de ligantes) à macromoléculas (receptores). Consiste em uma técnica computacional que pode empregar diversos algoritmos, em especial condicionados a potenciais fisicamente razoáveis. O processo de *docking*, em geral, consiste em uma busca exaustiva de conformações com a mais baixa energia de interação. Energias baixas indicam uma forte interação atrativa, podendo bloquear regiões específicas, dificultar transições ou atuar alostericamente, interferindo na ação ou cascata de sinalização celular, e assim apresentar propriedades farmacológicas desejáveis.

Os cálculos de *docking* molecular envolvendo as proteínas HSA e BSA (receptores) e os compostos Fenilbutazona e DCM (ligantes) foram preparados com o programa UCSF Chimera v1.10.2 [33] e realizados por meio do programa UCSF Dock v6.7 [41].

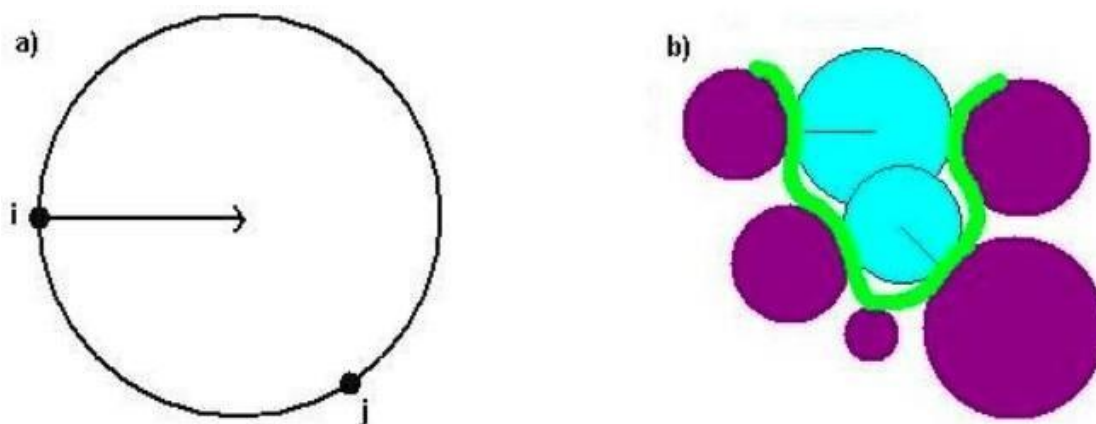
Inicialmente, o UCSF Chimera reconstrói trechos da proteína ou átomos quando estes não estão presentes na estrutura do receptor utilizando uma biblioteca de rotâmeros [34], caso necessário. A preparação das estruturas é realizada pelo programa/script *DockPrep* que adiciona hidrogênios e calcula as cargas do receptor. O campo de força ff99SB foi utilizado para os resíduos essenciais e o AM1-BCC para os não-essenciais. O Antechamber realizou o mesmo procedimento para os ligantes.

A busca por possíveis cavidades para a interação proteína-ligante é realizada pela geração de uma superfície proteica e uso do algoritmo desenvolvido por Richards [35] e adaptado por Connolly [36]. O *script* DMS constrói uma esfera do tamanho de uma molécula de água (1.4Å) e a desliza sobre a superfície de Van der Waals do receptor. Essa etapa calcula o vetor normal à superfície em cada ponto da

superfície. Essas cavidades recebem o nome de *clusters*, seguindo os padrões do dock UCSF.

São calculadas esferas sobre toda a superfície por meio do *script* SPHGEN. O raio de cada esfera pode variar entre 1.4Å e 4.0Å. Esta representação é, então, selecionada, mantendo apenas as cavidades onde cabem o maior número de esferas. O conjunto filtrado é associado a cada possível cavidade de interação no receptor. A figura 4 mostra uma representação das esferas geradas.

**Figura 4:** Representação ilustrativa da metodologia de busca por cavidades por meio de esferas sobre a superfície molecular do receptor. (a) Cada esfera é gerada tangente aos pontos de superfície *i*, *j* com o centro na superfície normal do ponto *i*. (b) Representação esquemática de um pequeno sítio de ligação formado por cinco átomos (roxo). As esferas (azul) são geradas usando pontos da superfície molecular (verde) com seus centros que se encontram ao longo dos vetores normais da superfície.



Fonte: Figura extraída de [http://dock.compbio.ucsf.edu/DOCK\\_6/tutorials](http://dock.compbio.ucsf.edu/DOCK_6/tutorials).

Uma caixa é construída no *cluster* contendo as esferas selecionadas. Essa etapa é realizada pelo *script* SHOWBOX. Essa caixa abrange todas as esferas de interesse e possui margens de 8Å em todas as direções. Esse tamanho foi suficiente para os ligantes utilizados. São geradas grades de 0.3Å pelo *script* GRID. Essas

grades são necessárias para evitar a sobreposição de átomos durante o cálculo das interações.

O processo de docking molecular emprega o algoritmo de "Ancoragem e Crescimento" (do inglês, Anchor and Grow). Nessa etapa, o qual o ligante é tratado como flexível, favorecendo estericamente o encaixe. O ligante é separado em subestruturas não rígidas que funcionam como âncoras no processo de encaixe. Em seguida, são crescidas as subestruturas flexíveis do ligante, respeitando a geometria do receptor. A próxima etapa do algoritmo de "Anchor and Grow", consiste em orientar a âncora rigidamente no sítio ativo do receptor. São avaliadas orientações de ancoragem e otimizadas mediante às funções de pontuação e o minimizador simplex [37]. Cada pose é então classificada energeticamente pela função de pontuação *Grid Score*. Essa função é composta por interações eletrostáticas e restrições estéricas. As interações são descritas pela Equação 1.

$$E = \sum_{i=1}^{\text{ligante}} \sum_{j=1}^{\text{receptor}} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^a} + 332,0 \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \right) \quad (1)$$

onde  $i$  e  $j$  formam o par de átomos em que a energia está sendo calculada e, no primeiro termo, conhecido como Potencial de Lennard-Jones,  $A_{ij}$  e  $B_{ij}$  são os valores dos raios de Van der Waals do par;  $a$  e  $b$  são definidos pelos valores padrão: 12 e 6; no segundo termo, denominado Potencial Coulombiano,  $q$  e  $r$  são a carga e o raio de cada átomo, respectivamente; 332,0 é a constante dielétrica do meio ajustada para obter a energia em Kcal/mol.

Na próxima etapa do processo, é então realizada uma reclassificação energética que consiste no emprego da função *Amber Score* e permite reavaliar as configurações obtidas na primeira fase do processo empregando o campo de força do AMBER [38]. A etapa reduz o custo computacional ao longo do processo de "anchor and grow" e acomoda melhor ligante e cadeias laterais sob o ponto de vista energético. O *Amber Score* realiza uma dinâmica molecular utilizando solvente implícito. Nessa etapa, o ligante e os resíduos do receptor próximos a ele são flexíveis, mantendo os átomos distantes do sítio de ligação congelados.

Neste processo a energia é calculada empregando o modelo de solvatação GB/SA [38]:

$$E_{Ligação} = E_{Complexo} - (E_{Receptor} + E_{Ligante}) \quad (2)$$

onde  $E_{Ligação}$  é a diferença entre a energia do complexo e a soma das energias do receptor e ligante,  $E_{Complexo}$  é a energia associada aos pares de átomos (receptor-ligante) participando da interação,  $E_{Receptor}$  e  $E_{Ligante}$  são as energias associadas aos átomos do receptor e aos átomos do ligante de maneira individual, respectivamente. A energia total do sistema,  $E$ , é dada por:

$$E = E_{MM} + (E_{p-sol} + E_{np-sol}) \quad (3)$$

sendo  $E_{p-sol}$  e  $E_{np-sol}$  as partes eletrostática e não-polar da energia de solvatação, respectivamente.

Ainda,  $E_{MM}$  pode ser obtido por meio do potencial definido pelo campo de força do Amber:

$$V = \sum_{Ligações\ Covalentes} K (r - r_0)^2 + \sum_{\text{Ângulos}} K (\vartheta - \vartheta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{Diedros} V_n (1 + \cos(n\phi - \gamma))$$

$$+ \sum_{Ligações\ Não-Covalentes} (K_{LJ} (\frac{A}{r^{12}} - \frac{C}{r^6}) + K_c (q_1 \frac{q_2}{Dr})) \quad (4)$$

Na expressão, o primeiro termo é um potencial harmônico que modela ligações covalentes e  $r$  representa a distância entre os átomos envolvidos. As variáveis com índice 0 são valores padrões do campo de força. O segundo termo da expressão é um potencial harmônico, onde  $\theta$  é o ângulo formado por três átomos interligados covalentemente. Esse parâmetro, assim como o anterior, também é uma definição geométrica da química orgânica. O terceiro termo está relacionado a modelagem quiral, o que garante o correto arranjo de estruturas secundárias. O mesmo termo é utilizado para ligações rígidas, conhecidas como diedros impróprios.

O quarto e último termo, representa as interações de Lennard-Jones (potencial 6-12) e as interações coulombianas, onde  $A$  e  $B$  são os valores dos raios de Van der Waals e  $r$  o raio de cada átomo,  $q_1$  e  $q_2$  são as cargas dos pares de átomos (receptor-ligante).  $K_r$ ,  $K_\theta$ ,  $V_n$ ,  $K_{LJ}$  e  $K_C$  são as constantes do campo de força do Amber para cada termo do potencial.

O algoritmo gera 500 conformações para o complexo proteína-ligante. O processo é repetido 1500 vezes por orientação do ligante, gerando um total de 750.000 cálculos.

### 3.2 Dinâmica Molecular

Simulações de dinâmica molecular (DM) foram empregadas como uma tentativa de acomodar os compostos adequadamente na cavidade do receptor ao longo do tempo. As cavidades da proteína avaliada possuem baixa exposição ao solvente. Assim, os cálculos de *docking* partiram de uma estrutura previamente gerada pela DM. Desse modo, essa etapa é essencial para a relaxação de cadeias laterais e acomodação dos ligantes nas cavidades de interesse.

O pacote GROMACS v4.5.7 [40] foi empregado para a realização da dinâmica molecular. A etapa de DM foi realizada utilizando caixas cúbicas de 10Å a partir das bordas da proteína, solvente explícito com modelo de água TIP3P e condições periódicas de contorno. Foi realizada uma neutralização do sistema, por meio da substituição de moléculas de água por íons Cloro ( $\text{Cl}^-$ ) (0.15 mM). Esse processo possibilita avaliar o comportamento do receptor e ligante. São permitidos pequenos rearranjos estruturais. Assim, é possível avaliar a estabilidade das ligações entre proteína e ligante.

O programa SWISSPARAM [41] foi empregado para a parametrização dos ligantes por meio do Web Server <http://www.swissparam.ch/>. Este programa realiza uma parametrização específica, voltada para o campo de força CHARMM27 [42].

Foram realizados passos de 0.01Å de minimização por dois diferentes métodos. Uma primeira minimização utilizando o Steepest-Descent até a força máxima de 250.0kJ/mol/nm. Em seguida, utilizando o Método dos Gradientes Conjugados até que a força máxima de 50.0kJ/mol/nm. O processo de equilíbrio empregou uma DM de 100ps no ensemble Canônico (NVT) e uma DM de 100ps no

ensemble “Isotérmico-Isobárico” (NPT). Foram utilizados passos de integração de 2fs. Após esse processo, o sistema foi acoplado a um banho térmico até alcançar a temperatura de interesse. As velocidades iniciais das partículas foram atribuídas de maneira aleatória por meio de uma distribuição de Maxwell-Boltzmann.

Foram simulados 20ns de DM com pressão e temperatura constantes. Esse tempo foi considerado suficiente uma vez que os resultados obtidos foram suportados por dados experimentais de colaboradores. No controle de pressão foi empregado o barostato de Parrinelo-Rahman, utilizando o valor de 1atm. O controle de temperatura foi realizado pelo termostato v-rescale, mantendo o valor de 295K. As coordenadas e velocidades foram salvas a cada 10ps de simulação.

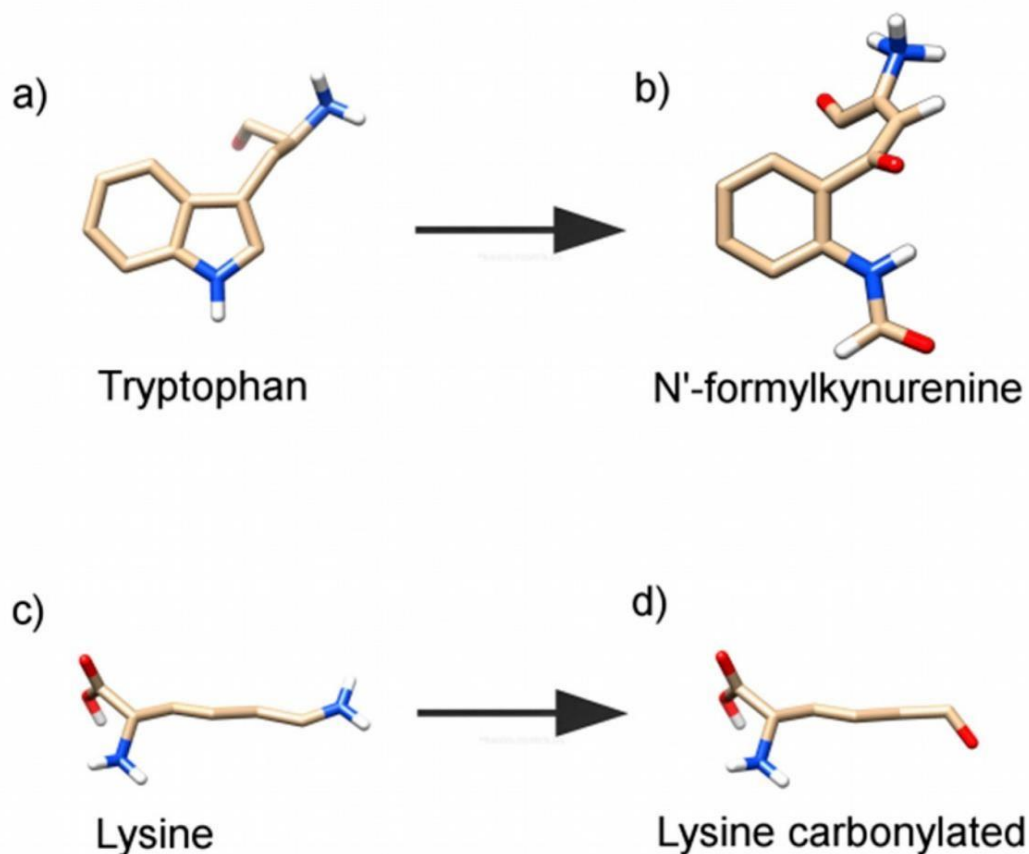
## 4 ALTERAÇÃO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS TRP-214 E LYS-199 DA PROTEÍNA HSA VIA OXIDAÇÃO

### 4.1 Resultados

Durante o estudo da oxidação dos resíduos de aminoácidos Trp-214 e Lys-199, foram usados os agentes oxidantes Tau-NBr<sub>2</sub> e Tau-NHCl. Uma sequência de testes experimentais foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes da Unesp – Bauru com o intuito de caracterizar o comportamento desses resíduos antes e após o processo de oxidação. Todos os dados experimentais que serão discutidos na seção seguinte foram obtidos pela aluna de doutorado Luiza de Carvalho Bertozo.

Com base nos dados obtidos pelo grupo experimental, a proteína HSA foi modelada computacionalmente para verificar a interação com o composto Fenilbutazona, antes e após o processo de oxidação. Foi realizada a substituição dos resíduos Trp-214 e Lys-199 por N'-formylkynurenine e Lisina em sua forma carbonilada, respectivamente. O software Avogadro (versão 1.2.0. <http://avogadro.cc/>) [43] foi usado para realizar essas alterações, conforme apresentado na figura 5.

**Figura 5:** Transformação dos resíduos para mimetizar o processo de oxidação. Representação tridimensional dos resíduos mudando de a) triptofano para b) N'-formylkynurenine, e de c) lisina para d) lisina carbonilada. Imagem preparada usando UCSF chimera.



Fonte: Figura extraída de Bertozo et al. (2018).

Simulações de *docking* foram realizadas entre a proteína HSA e o composto Fenilbutazona, antes e após as alterações que mimetizaram a oxidação da proteína. Foram geradas 500 conformações e cada uma avaliada 1500 vezes. A afinidade de ligação para a interação proteína-ligante foi avaliada por meio das energias obtidas pela função *Amber Score*. Os valores estão apresentados na tabela 1.

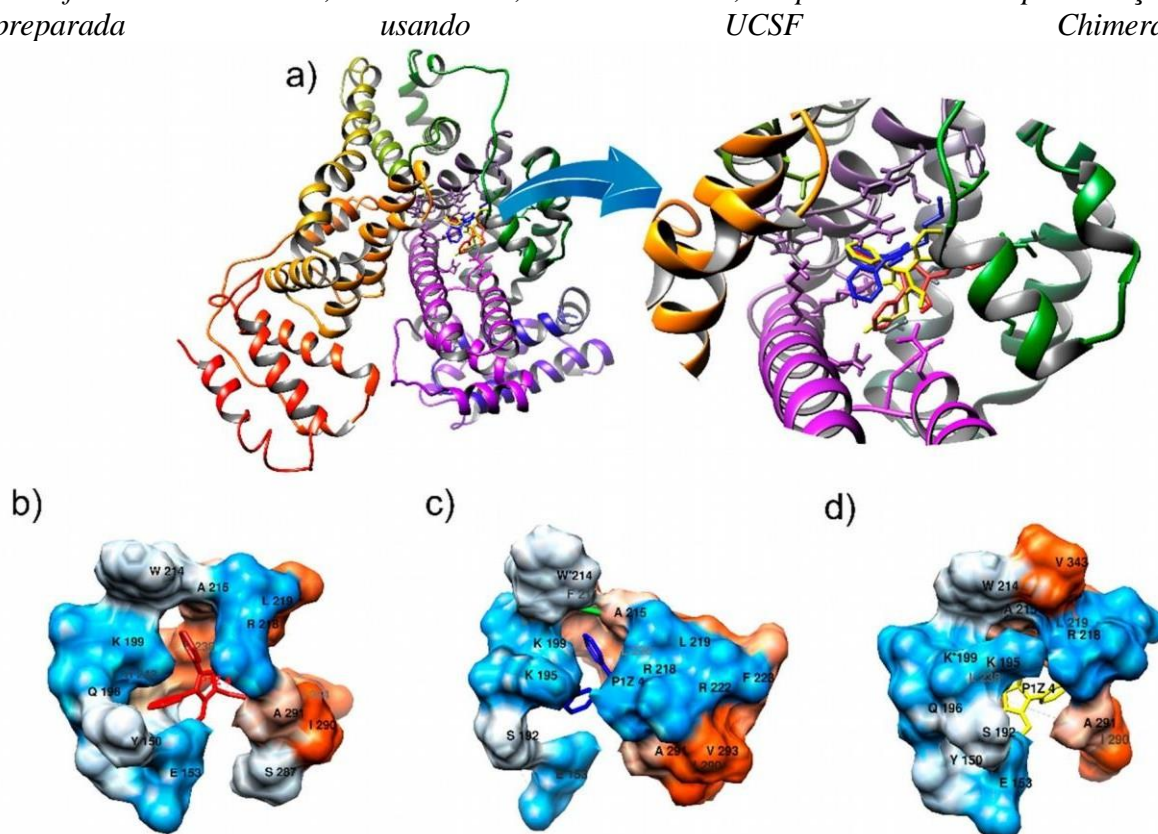
Tabela 1: Valores obtidos para as energias de ligação entre HSA e PBZ

Sistema	Energia de Ligação (kJ/mol)
HSA	-21.3
HSA <sub>ox</sub> via Tau-NBr <sub>2</sub>	-28.4
HSA <sub>ox</sub> via Tau-NHCl	-33.9

Fonte: Dados extraídos de Bertozo et al. (2018).

A análise das interações para os três casos, HSA em sua forma nativa e HSA oxidada via Tau-NBr<sub>2</sub> e Tau-NHCl, indica que não houve mudança significativa na orientação do ligante, figura 6. A tabela 1 permite observar uma diminuição significativa nas energias de ligação para os casos envolvendo a oxidação da proteína. Essa variação pode ser a causa da estabilização do composto na proteína oxidada por esse agente. As energias calculadas por meio da função Amber Score utilizaram solvente implícito. Simulações de 10ns de MD foram realizadas com solvente explícito, na tentativa de analisar o papel da água nas interações. A característica predominantemente hidrófoba dos sítios de ligação é reforçada pelo fato de não ser possível visualizar nenhuma interação envolvendo o solvente.

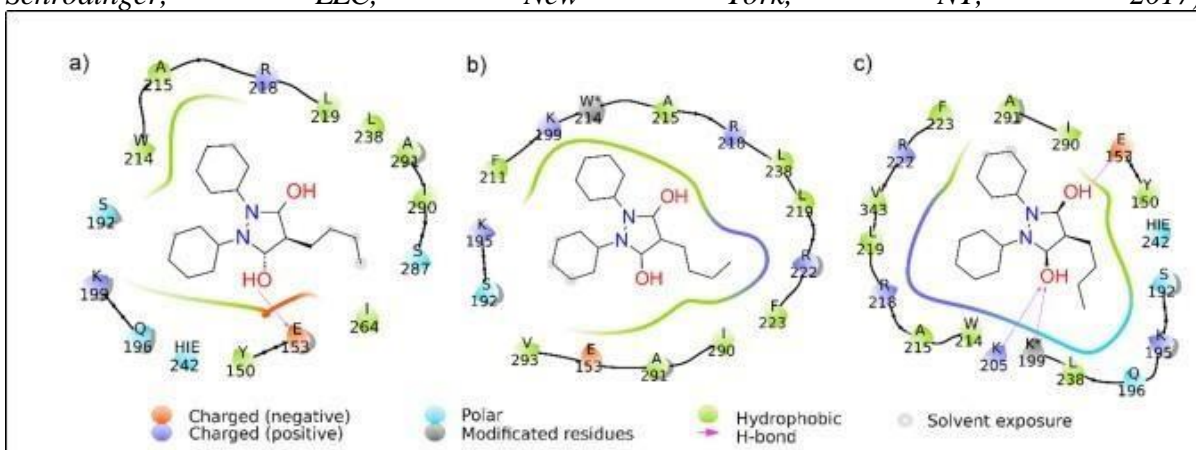
**Figura 6:** Resultados do Docking molecular entre a HSA e o composto DCM. As orientações do DCM com as menores energias da função Amber score para cada sítio de ligação da HSA estão apresentadas em amarelo (sítio I), azul (sítio II), e verde (sítio III). Os recortes mostram uma visão de cada sítio, onde os pontos em volta do ligante representam sua superfície molecular. As energias de ligação calculadas entre o DCM e a HSA foram -46.0 kJ/mol, -43.8 kJ/mol, e -45.1 kJ/mol, respectivamente. Representação preparada usando UCSF Chimera.



Fonte: Figura extraída de Bertozo et al. (2018).

Os mapas de interação apresentados na figura 7 permitem visualizar as interações que estão ocorrendo entre HSA e Fenilbutazona. A figura 7b permite visualizar a predominância de interações hidrofóbicas estabilizando a ligação para o caso da HSA oxidada via Tau-NBr<sub>2</sub>, enquanto a figura 7a mostra uma ligação de hidrogênio incluindo o resíduo Glu-193 para o caso da proteína nativa. No caso da oxidação via Tau-NHCl, figura 7c, podemos observar uma maior afinidade do composto no sítio de ligação em comparação à proteína nativa, e essa interação é mediada por ligações de hidrogênio, em particular com o resíduo modificado. Os resíduos alterados estão apresentados com o símbolo \* em seus nomes, a fim de facilitar a visualização.

**Figura 7:** Mapas de interação. Representação das interações entre fenilbutazona e a) HSA, b) HSA com Trp-214 modificado para N'-formylkynurenine (W\*214), e d) HSA com Lys-199 modificado para sua forma carbonilada (K\*199). A legenda na base apresenta todos os tipos de interação avaliadas pelo programa Maestro, com, em particular, ligações de hidrogênio representadas pelas setas na cor rosa e interações hidrofóbicas em verde. As medidas das distâncias e orientações das cadeias laterais para a conformação na Figura 11c sugerem que apenas a ligação de hidrogênio envolvendo a Lys-199 está ocorrendo (a interação com a Lys-205 apenas aparece na representação devido instruções do algoritmo do Maestro). Representações preparadas usando Maestro (Schrödinger Release 2017-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017).



Fonte: Figura extraída de Bertozo et al. (2018).

## 4.2 Discussão

Nessa proposta do trabalho, foi estudado o processo de oxidação da proteína HSA, por meio dos resíduos de aminoácidos Trp-214 e Lys-199, ambos presentes no sítio I desta proteína e que são aminoácidos com grande potencial a serem oxidados [44,45,46,47] neste sítio, utilizando o composto Fenilbutazona (ligante de mesmo sítio) para avaliar esse mecanismo. Uma abordagem com base experimental e computacional foi empregada.

Durante esse estudo, os agentes oxidantes Tau-NBr<sub>2</sub> e Tau-NHCl foram empregados. Os resíduos de sulfidril são um alvo conhecido do Tau-NHCl em proteínas [48], o que foi observado experimentalmente pela depleção desses resíduos na HSA, apresentando maior eficiência em comparação ao Tau-NBr<sub>2</sub>.

O processo de oxidação via Tau-NBr<sub>2</sub> e Tau-NHCl também demonstrou que, em relação à formação de grupos carbonila na albumina, o agente Tau-NBr<sub>2</sub> apresentou maior eficiência. Embora a hipótese levantada seja de que o Tau-NBr<sub>2</sub> foi capaz de oxidar os resíduos Trp-214 e Lys-199 no sítio I da HSA, isso não descarta a possibilidade de outros aminoácidos estarem participando do processo de oxidação e, conseqüentemente, podendo causar mudanças na interação do composto Fenilbutazona.

O método de dicroísmo circular foi utilizado para o cálculo das constantes de associação entre a proteína e o ligante, o qual se mostrou adequado, uma vez que HSA e PBZ não possuem sinais de CD no comprimento de onda observado, indicando a formação do complexo. Em concordância com os resultados apresentados anteriormente, foi observado uma alteração no valor da constante de associação para o caso da oxidação via Tau-NBr<sub>2</sub>, enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada para o caso da oxidação via Tau-NHCl, em comparação à proteína nativa.

Os resultados obtidos via simulações computacionais, como esperado, corroboraram com os experimentos. Em ambos os casos de oxidação, as energias de ligação encontradas entre HSA e PBZ foram menores do que para o caso da proteína nativa. Para o caso da proteína oxidada por Tau-NBr<sub>2</sub>, além da alteração na energia, uma interação predominantemente hidrofóbica foi observada. Uma vez que o sítio de ligação possui baixa exposição ao solvente, essa estabilização e conseqüente aumento da constante de associação pode estar ligada ao fato da água

não conseguir acessar a região de ligação. No caso da proteína oxidada via Tau-NHCl, a alteração na energia de ligação está relacionada a uma interação estabilizada por ligações de hidrogênio. Vale a pena notar que essas interações podem ser consequência de fatores entálpicos, que muitas vezes são a causa dessas forças intermoleculares [49], e esse tipo de interação pode gerar um regime dinâmico de flutuações e expor o sítio de ligação, facilitando o acesso do solvente nessa região.

### **4.3 Conclusões**

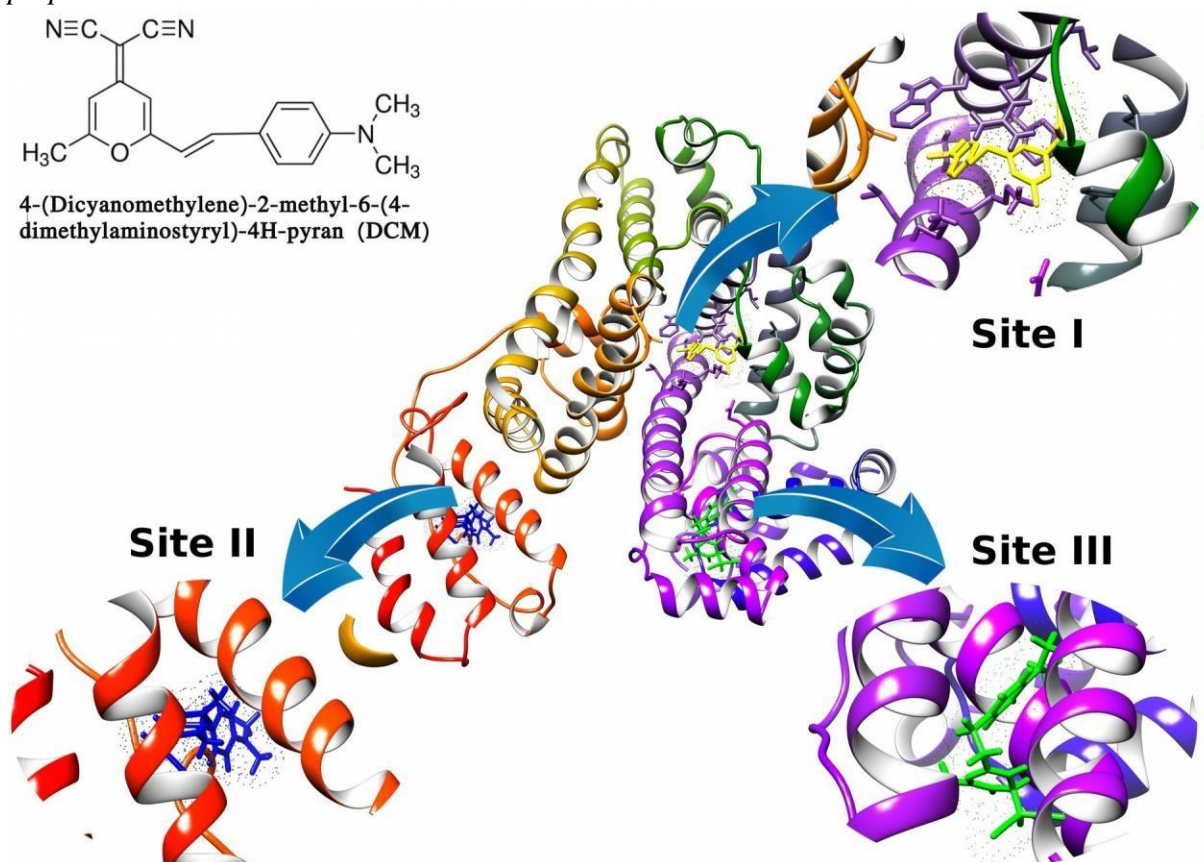
Foi observado pelas interações entre HSA e o composto Fenilbutazona que as alterações oxidativas podem influenciar na ligação de compostos em HSA. Esse é um fator importante devido sua característica como proteína transportadora e susceptível à oxidação e como já indicado na literatura [26]. Os resultados computacionais reforçam essa hipótese por meio da transformação dos resíduos Trp-214 em N-formylkynurenine e Lys-199 em sua forma carbonilada, onde ambas as mudanças causaram alterações nas energias de ligação. Esses resultados indicam que as alterações provocadas pela oxidação da proteína HSA podem afetar suas funções de transporte e modificar as características farmacocinéticas dessas moléculas.

## 5 CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS HSA E BSA COM O COMPOSTO DCM

### 5.1 Resultados

A Albumina de Soro Humano (HSA) possui algumas regiões descritas como possíveis sítios de ligação de pequenos compostos [50]. Dentre essas regiões, os principais sítios que são alvos de estudos atuais são os descritos como I, II e III [51,52,53]. Na figura 8 é possível visualizar o composto DCM e seu respectivo encaixe em cada um desses três sítios.

**Figura 8:** Resultados de Docking molecular entre a HSA e o composto DCM. As orientações do DCM com as menores energias da função Amber score para cada sítio de ligação da HSA estão apresentadas em amarelo (sítio I), azul (sítio II), e verde (sítio III). Uma visão detalhada de cada sítio está apresentada em destaque, onde os pontos em volta do ligante representam sua superfície molecular. As energias de ligação calculadas entre o DCM e a HSA foram -46.0 kJ/mol, -43.8 kJ/mol, e -45.1 kJ/mol, respectivamente. Representação preparada usando UCSF Chimera.



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados ainda não publicados.

As energias de ligação, calculadas por meio da função *Amber Score*, são apresentadas na tabela 2. Esses valores mostram que o composto DCM se liga de maneira similar nos três sítios de ligação. No entanto, existe uma pequena diferença nas energias de ligação entre os três sítios, antes e após as simulações de dinâmica molecular, indicando que o composto possui uma preferência a se ligar no sítio I desta proteína, comparado aos outros dois sítios.

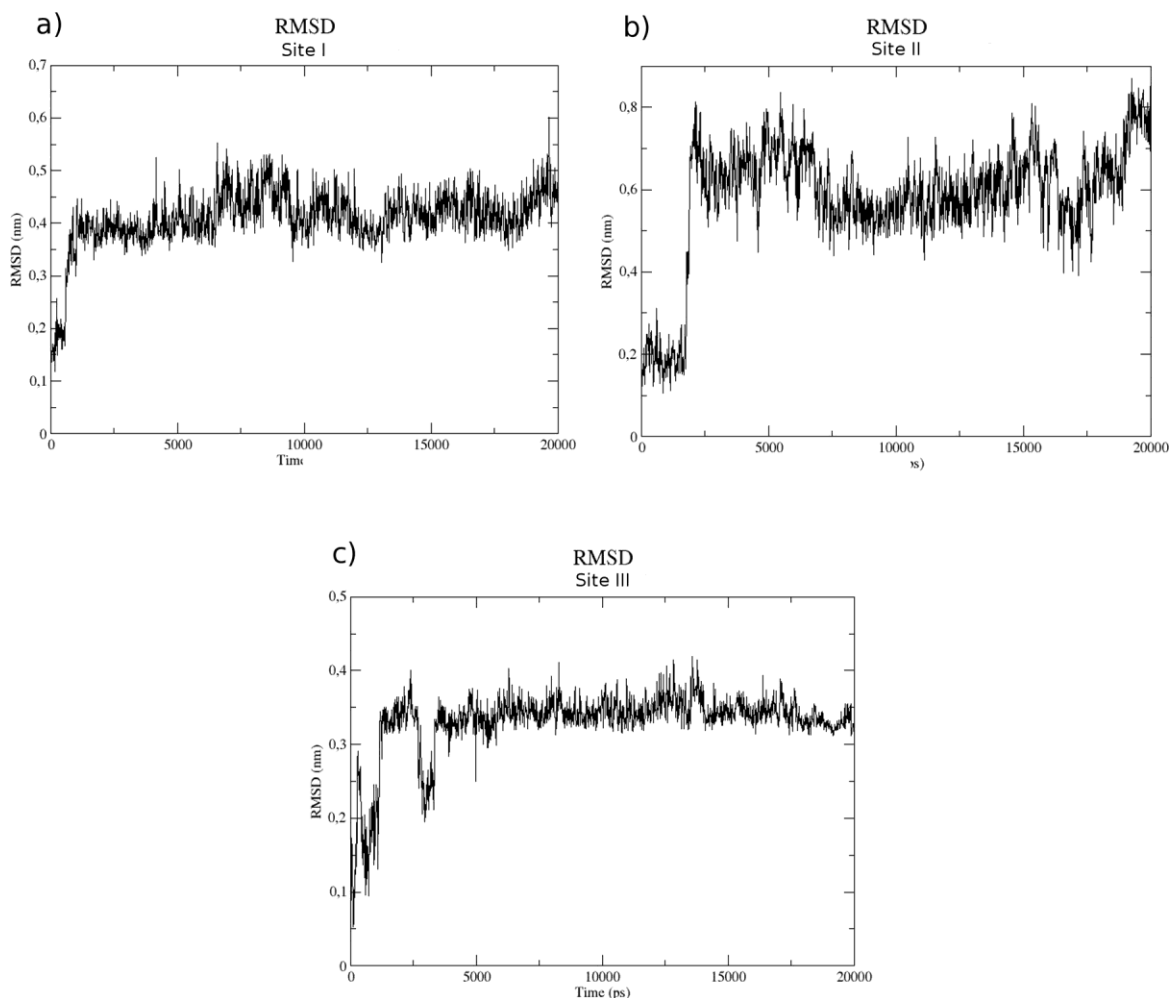
Tabela 2: Valores das energias de ligação obtidos via simulações de docking molecular entre HSA e DCM, antes e após as simulações de dinâmica molecular.

	<b>Sítio I</b>	<b>Sítio II</b>	<b>Sítio III</b>
<b>Antes MD</b>	-42.1	-40.0	-41.7
<b>Após MD</b>	-46.0	-43.8	-45.1

*Fonte: Elaborado pelo autor. Dados ainda não publicados*

Além disso, os sítios I e III possuem valores da energia muito próximos, e essa correlação é evidenciada na Figura 9, onde é possível visualizar os gráficos de RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Esses gráficos nos permitem comparar o comportamento do ligante nos três sítios de ligação durante os 20ns de simulação.

**Figura 9:** RMSD entre o composto DCM e HSA durante os 20 ns das simulações de dinâmica molecular. Os cálculos mostram a estabilidade do ligante durante sua interação no a) sítio I, b) sítio II, e c) sítio III da HSA. Os gráficos mostram que o DCM possui estabilidade similar nos sítios I e III, sendo menos estável no sítio II. A leve diferença entre esses dois sítios é evidenciada pelas energias de ligação apresentadas na Tabela 3.

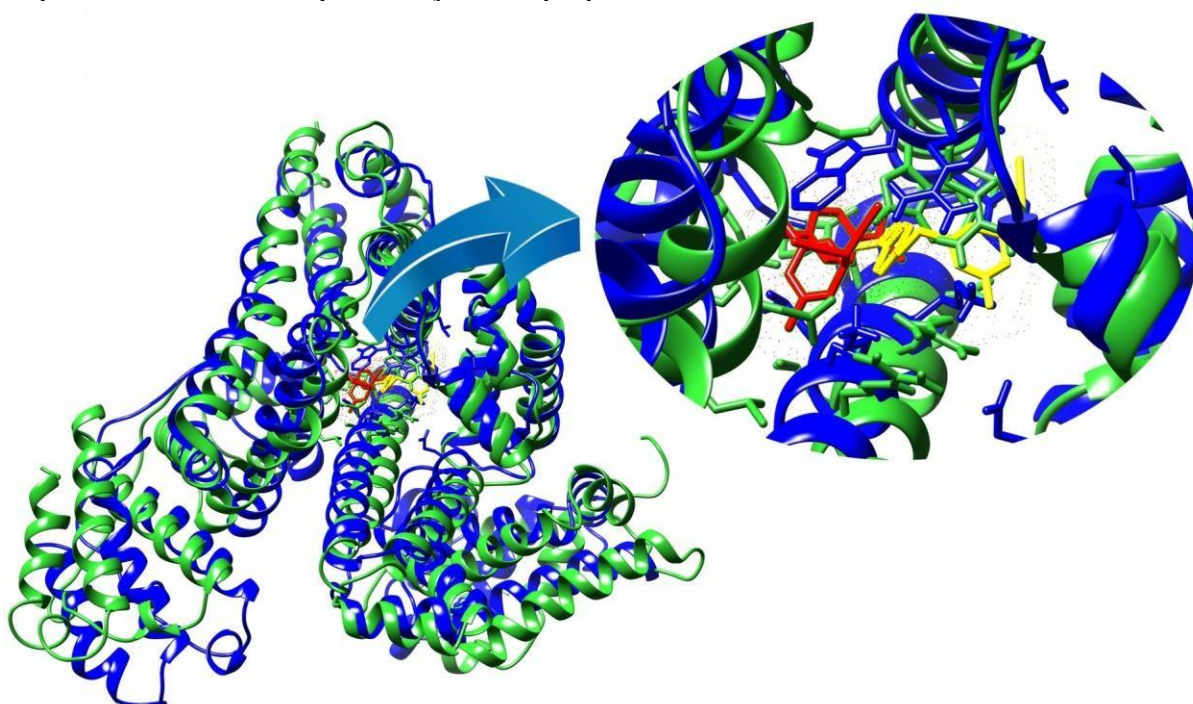


*Fonte: Elaborado pelo autor. Dados ainda não publicados.*

Uma vez estabelecida a maior afinidade do DCM pelo sítio I da HSA, o passo seguinte foi realizar a comparação entre as interações desse composto com a

Albumina de Soro Bovino (BSA), uma proteína homóloga à HSA. Na figura 10 é possível visualizar a sobreposição das estruturas cristalográficas da HSA e BSA e o respectivo encaixe do DCM no sítio I de cada proteína.

**Figura 10:** Comparação entre as estruturas da HSA e BSA. As orientações do DCM com as menores energias da função Amber score para o sítio I de cada proteína estão apresentadas em amarelo (HSA) e vermelho (BSA). As estruturas da HSA e BSA estão coloridas em azul e verde, respectivamente. O recorte mostra uma visão detalhada do sítio I de cada proteína, onde os pontos em volta do ligante representam sua superfície molecular. As energias de ligação calculadas entre DCM-HSA e DCM-BSA foram  $-46.0$  kJ/mol e  $-37.0$  kJ/mol, respectivamente. Representação preparada usando UCSF Chimera.



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados ainda não publicados.

As energias de ligação, calculadas por meio da função Amber Score, são mostradas na tabela 3. A diferença nas energias de ligação entre as proteínas HSA e BSA, antes e após as simulações de dinâmica molecular, revela que o composto possui uma preferência a se ligar no sítio I da proteína HSA, comparado ao mesmo sítio da proteína BSA.

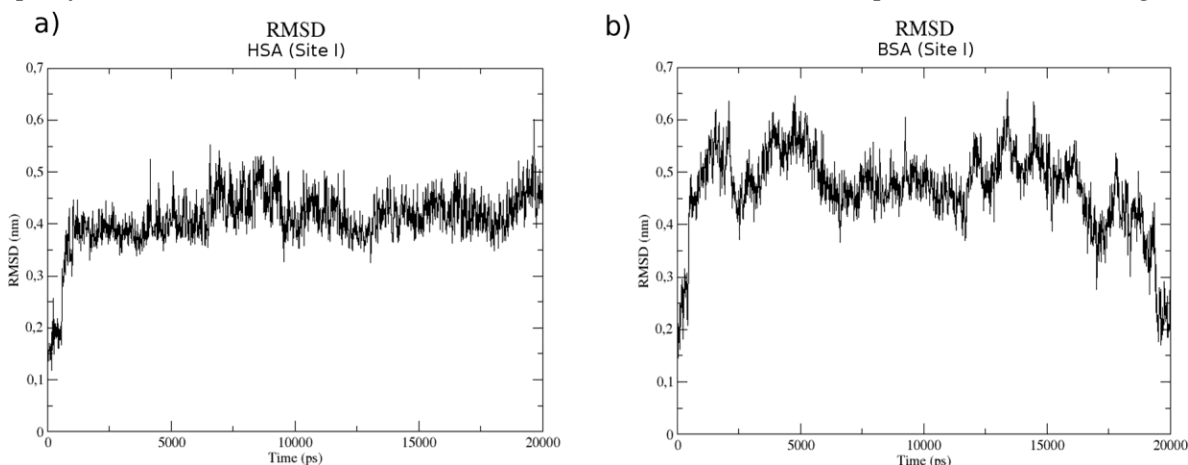
Tabela 3: Valores das energias de ligação obtidos via simulações de docking molecular para o DCM no sítio I das proteínas HSA e BSA, antes e após as simulações de dinâmica molecular

	HSA (Sítio I)	BSA (Sítio I)
<b>Antes MD</b>	-42.1	-32.1
<b>Após MD</b>	-46.0	-37.0

Fonte: Elaborado pelo autor. Dados ainda não publicados.

Os cálculos de RMSD para a interação do composto DCM com as proteínas HSA e BSA durante os 20ns das simulações de dinâmica molecular são apresentados na figura 11. Esse resultado nos permite avaliar o comportamento do ligante no sítio I de ambas as proteínas, complementando os valores de energias obtidos e reforçando a maior afinidade do composto pela proteína humana.

**Figura 11:** RMSD do composto DCM no sítio I das proteínas HSA e BSA durante os 20ns das simulações de dinâmica molecular. Os cálculos mostram a estabilidade do ligante durante sua interação com a) HSA, e b) BSA. Os gráficos mostram que o DCM é mais estável durante sua interação com a HSA. Essa diferença é corroborada pelas energias de ligação mostradas na Tabela 4. Esses resultados também sugerem que o ligante possa identificar as especificidades entre o mesmo sítio dessas duas proteínas homólogas.

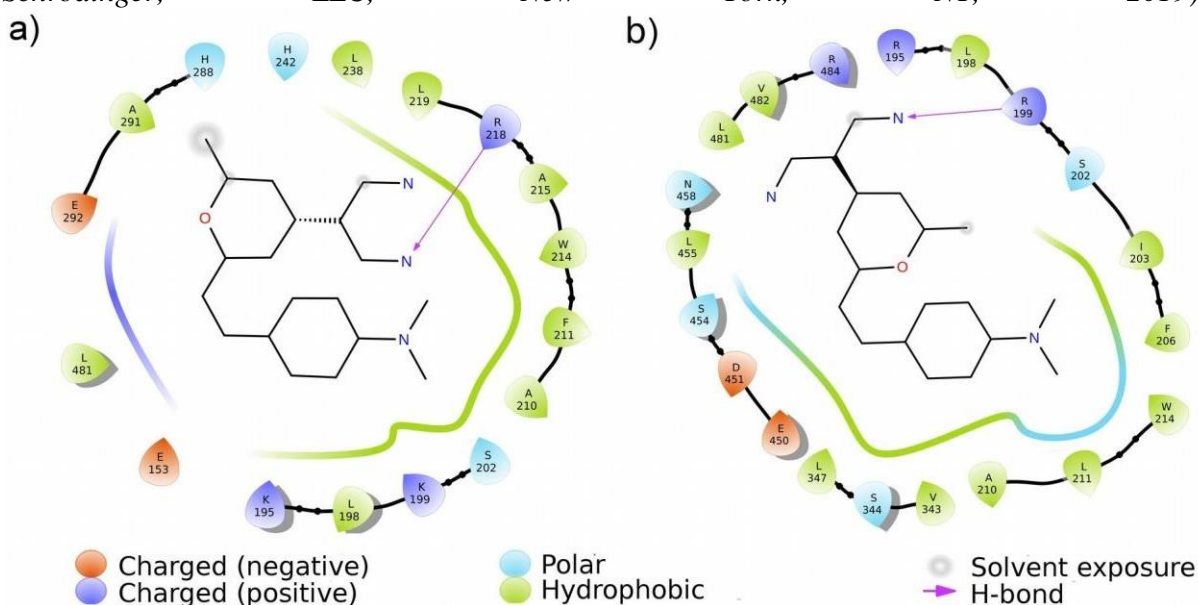


Fonte: Elaborado pelo autor. Dados ainda não publicados.

A Figura 12 mostra os tipos de interação que estão ocorrendo nos casos avaliados, fazendo-se possível identificar as características das interações proteína-ligante. A natureza destas interações é predominantemente hidrofóbica (9 resíduos da proteína HSA e 11 resíduos da proteína BSA envolvidos) e estabilizada por

ligações de hidrogênio. A maior afinidade do composto DCM durante sua interação com a proteína HSA (Figura 12a), mostrada na tabela 3, pode ser uma consequência do rearranjo estrutural sofrido pelo ligante para ser acomodado no sítio I desta proteína.

**Figura 12:** Mapas de interação. Representação do DCM durante sua interação com a) HSA, e b) BSA, ambas no sítio I. O algoritmo do Maestro avaliou todos os tipos de interação possíveis. No entanto, a legenda na base mostra apenas as interações que estão ocorrendo, em particular, ligações de hidrogênio (setas em rosa), e interações hidrofóbicas (resíduos em verde). Representações preparadas usando Maestro (Schrödinger Release 2019-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019).



Fonte: Elaborado pelo autor. Dados ainda não publicados.

De acordo com os dados das simulações computacionais obtidos acima, testes experimentais foram realizados, novamente em colaboração, pelo grupo do Professor Valdecir Farias Ximenes – Unesp Bauru, no intuito de validar os resultados teóricos. Todos esses resultados que serão discutidos na seção seguinte foram obtidos pela aluna de doutorado Luiza de Carvalho Bertoso e pela aluna de mestrado Ana Julia Foganholi Carvalho Fernandes.

## 5.2 Discussão

Utilizando a mesma abordagem da seção anterior, foram analisadas as características de ligação da proteína HSA e as especificidades de seus três principais sítios de ligação. Para tal análise, foi utilizado o composto DCM e a proteína BSA (devido sua homologia com a HSA).

Neste trabalho, por meio de simulações computacionais, a comparação entre o comportamento do DCM durante sua interação nos três sítios da HSA revelou maior afinidade do composto em sua ligação no sítio I, comparado aos sítios II e III. A estabilidade do ligante mostra uma similaridade entre os três sítios, revelando uma leve preferência do composto a se ligar no sítio I (uma energia de ligação de, aproximadamente, 0.9 kJ/mol menor que o sítio III). Os resultados experimentais de fluorescência corroboraram os dados teóricos, mostrando que o DCM foi deslocado do sítio I na adição do composto Fenilbutazona (ligante de sítio I). A mesma análise, usando compostos específicos dos sítios II e III, não mostrou alterações significativas, de acordo com o esperado.

As diferenças na ligação do DCM no sítio I das proteínas HSA e BSA revelou que, experimentalmente, o DCM teve uma maior constante de associação durante sua interação com a proteína humana. Esse resultado foi validado pelo cálculo das constantes usando dois diferentes métodos, aumento da fluorescência do DCM e supressão da fluorescência intrínseca da HSA e BSA. Em concordância, as simulações de dinâmica molecular mostraram que esse composto é mais estável no sítio I da primeira proteína, comparado ao mesmo sítio da BSA e esse resultado é corroborado pela diferença de 9 kJ/mol nas energias de ligação.

## 5.3 Conclusões

O estudo da interação entre a proteína HSA e o composto DCM indicou que essa ligação é mais estável para o sítio I, em comparação aos outros dois sítios de ligação avaliados. Além disso, analisando o comportamento do DCM no sítio I das proteínas HSA e BSA, foi observado uma preferência do composto para interagir com a proteína humana. Esses resultados computacionais são plausíveis com estudos usando diferentes composto que apresentam o mesmo comportamento [9,54]. Deste modo, foi possível indicar diferenças nas propriedades de ligação a

pequenas moléculas entre essas duas proteínas, e esse resultado é relevante devido à importância dessas proteínas como carreadoras de diversos compostos.

## REFERÊNCIAS

- 1 Schopenhauer, Arthur. Sobre a filosofia e seu método. São Paulo: Hedra, 2010. p. 156-157
- 2 Chaves, O., Amorim, A.P.O, Castro, L.H.E., Sant'Anna, C.M.R., Oliveira, M.C.C., Cesarin-Sobrinho, D., Netto-Ferreira, J.C., Ferreira, A.B.B. Fluorescence and Docking Studies of the Interaction between Human Serum Albumin and Pheophytin. *Molec.*2015,20, 19526–19539.
- 3 Liu, X., Ling, Z., Zhou, X., Ahmad, F., Zhou, Y. Comprehensive spectroscopic probing the interaction and conformation impairment of bovine serum albumin (BSA) by herbicide butachlor. *J. Photochem. Photobiol. B.*2016,162, 332–339.
- 4 Nicholson, J.P., Wolmarans, M.R., Park, G.R. The role of albumin in critical illness. *British Journal of Anaesthesia.*2000,85, 599–610.
- 5 Taguchi, K., Chuang, V.T.G., Maruyama, T., Otagiri, M. Human Serum Albumin—New Insights on its Structural Dynamics, Functional Impacts and Pharmaceutical Applications. *J. Pharm. Sci.*2012,101, 3033–3046.
- 6 Peters, T. All about albumin. Academic Press.1995, 1–432.
- 7 Majorek, K.A., Porebski, P.J., Dayal, A., Zimmerman, M.D., Jablonska, K., Stewart, A.J., Chruszcz, M., Minor, W. Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins. *J. Mol. Immunol.*2012,52, 174–182.
- 8 Rafols, C., Amezqueta, S., Fuguet, E., Bosch, E. Molecular interactions between warfarin and human (HSA) or bovine (BSA) serum albumin evaluated by isothermal titration calorimetry (ITC), fluorescence spectrometry (FS) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). *J. Pharm. Biomed. Anal.*2018,150, 452–459.
- 9 Poor, M., Li, Y., Matisz, G., Kiss, L., Kunsagi-Mate, S., Koszegi, T. Quantitation of species differences in albumin–ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: A test case with some Sudlow's site ligands. *J. Lum.*2014,145, 767–773.
- 10 Kosa, T., Maruyama, T., Otagiri, M. Species Differences of Serum Albumins: I. Drug Binding Sites. *Pharm. Res.*1997,14, 11.
- 11 Bertozo, L.D.C., Tavares Neto, E., Oliveira, L.C., Ximenes, V.F. Oxidative Alteration of Trp-214 and Lys-199 in Human Serum Albumin Increases Binding Affinity with Phenylbutazone: A Combined Experimental and Computational Investigation. *Int. J. Mol. Sci.*2018,19, 2868.
- 12 Abou-Zied, O.K. Understanding the Physical and Chemical Nature of the Warfarin Drug Binding Site in Human Serum Albumin: Experimental and Theoretical Studies. *Curr. Pharm. Des.*2015,21, 1800.
- 13 Kouno, Y., Anraku, M., Yamasaki, K., Okayama, Y., Iohara, D., Nakamura, H., Maruyama, T., Hirayama, F., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. N-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against post-translational oxidation as compared to N-acetyl-L-tryptophan. *Biochem. Biophys. Rep.*2016,6, 266–274.

- 14 Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy.3rd ed. Springer.2006,16.
- 15 Zhivkova, Z. Studies on Drug—Human Serum Albumin Binding: The Current State of the Matter. *Curr. Pharm. Des.*2015,21, 1817–1830.
- 16 Pisoschi, A.M., Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.*2015,97, 55–74.
- 17 Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.*2015,38, 592–607.
- 18 Moloney, J.N., Cotter, T.G. ROS signal ling in the biology of cancer. *Semin. CellDev. Biol.*2018,80, 50–64.
- 19 Rani, V., Deep, G., Singh, R.K., Palle, K., Yadav, U.C.S. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.*2016,148,183–193.
- 20 Neves Carvalho, A., Firuzi, O., Joao Gama, M., van Horsen, J., Saso, L. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope?. *Curr. Drug Targets.*2017,18, 705–718.
- 21 Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., Butterfield, D.A. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res. Bull.*2017,133, 88–96.
- 22 Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E., Bourdon, E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.*2008,582, 1783–1787
- 23 Prakash, S. Role of human serum albumin and oxidative stress in diabetes. *J.Appl. Biotechnol. Bioeng.*2017,3, 1–5
- 24 Maciazek-Jurczyk, M., Szkudlarek, A., Chudzik, M., Pozycka, J., Sulkowska, A. Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*2018,188, 675–683.
- 25 Naldi, M., Baldassarre, M., Domenicali, M., Caraceni, P. Structural and functional integrity of human serum albumin: Analytical approaches and clinical relevance inpatients with liver cirrhosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*2017,144, 13–153
- 26 Oettl, K., Marsche, G. Redox State of Human Serum Albumin in Terms of Cysteine-34 in Health and Disease. *Methods Enzymol.*2010,474, 181–195.
- 27 Sitar, M.E., Aydin, S., Cakatay, U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clin. Lab.*2013,59, 945–952.
- 28 Arif, Z., Neelofar, K., Arfat, M.Y., Zaman, A., Tarannum, A., Parveen, I.;Ahmad, S., Khan, M.A., Badar, A., Islam, S.N. Hyperglycemia induced reactive species trigger structural changes in human serum albumin of type 1 diabetic subjects. *Int. J. Biol. Macromol.*2018,107, 2141–2149.

- 29 Fujii, R., Ueyama, J., Aoi, A., Ichino, N., Osakabe, K., Sugimoto, K., Suzuki, K., Hamajima, N., Wakai, K., Kondo, T. Oxidized human serum albumin as a possible correlation factor for atherosclerosis in a rural Japanese population: The results of the Yakumo Study. *Environ. Health Prev. Med.* 2018, 23, 1.
- 30 Gelamo, E.L., Tabak, M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectro. Acta Part A: Mol. Biomol. Spec.* 2000, 11, 2255–2271.
- 31 Sekula, B., Zielinski, K., Bujacz, A. Crystallographic studies of the complexes of bovine and equine serum albumin with 3,5- diiodosalicylic acid. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013, 6, 316–324.
- 32 Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 1988, 16, 10881–10890.
- 33 Russeva, V.N., Zhivkova, Z.D. Protein binding of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs studied by high-performance liquid affinity chromatography. *Int. J. Pharm.* 2013, 180, 69–74.
- 34 Kim, J.Y., Yoon, S.S., Kim, Y.S. DCM-based organic dyes with electron donating groups for dye-sensitized solar cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014, 7, 5203–5206.
- 35 Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004, 25, 1605–1612.
- 36 Kuntz, I.D., Blaney, J.M., Oatley, S.J., Langridge, R., Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* 1982, 161, 269–288.
- 37 Shapovalov, M.V., Dunbrack, R.L. Jr. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure.* 2011, 19, 844–858.
- 38 Richards, F.M. Areas, Volumes, Packing, and Protein Structure. *Annual Review of Biophys and Bioeng.* 1977, 6, 151–176
- 39 Connolly, M. Ph.D. Thesis. University of California, Berkeley. 1981.
- 40 Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminf.* 2012, 4, 17.
- 41 Maier, J.A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K.E., Simmerling, C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* 2015, 11, 3696–3713.

- 42 Qiu, D., Shenkin, P.S., Hollinger, F.P., Still, W.C. The GB/SA Continuum Model for Solvation. A Fast Analytical Method for the Calculation of Approximate Born Radii. *J. Phys. Chem. A*.1997,101, 3005–3014.
- 43 Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M.R., Smith, J.C., Kasson, P.M., van der Spoel, D., Hess, B., Lindahl, E. GROMACS4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinf.*2013,29, 845–854.
- 44 Zoete, V., Cuendet, M.A., Grosdidier, A., Michielin, O. Swiss Param: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem.*2011,32,2359–2368.
- 45 B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, J. *Comput. Chem.* 4 (1983) 187.
- 46 Ghuman, J., Zunszain, P.A., Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Otagiri, M., Curry, S. Structural Basis of the Drug-Binding Specificity of Human Serum Albumin. *J. Mol. Biol.*2005,353, 38.
- 47 Ryan, A.J., Ghuman, J., Zunszain, P.A., Chung, C.W., Curry, S. Structural Basis of Binding of Fluorescent, Site-Specific Dansylated Amino Acids to Human Serum Albumin. *J. Struct. Biol.*2011,174, 84.
- 48 Zhang, Y., Lee, P., Liang, S., Zhou, Z., Wu, X., Yang, F., Liang, H. Structural Basis of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Diclofenac Binding to Human Serum Albumin. *Chem. Biol. Drug Des.*2015,86, 1178–1184.
- 49 Ryan, A.J., Chung, C.-W., Curry, S. Crystallographic analysis reveals the structural basis of the high-affinity binding of iophenoxic acid to human serum albumin. *BMC Struct. Biol.*2011,11, 18.
- 50 Grigoryan, H., Li, H., Iavarone, A.T., Williams, E.R., Rappaport, S.M. Cys34 Adducts of Reactive Oxygen Species in Human Serum Albumin. *Chem. Res. Toxicol.*2012,25, 1633–1642.
- 51 Lazaridis, T., Archontis, G., Karplus, M. Enthalpic Contribution to Protein Stability: Insights from Atom-Based Calculations and Statistical Mechanics. *Adv. Protein Chem.*1995,47, 231–306.
- 52 Caruso, I.P., Vilegas, W., Oliveira, L.C., Cornelio, M.L. Fluorescence spectroscopic and dynamics simulation studies on isoorientin binding with human serum albumin. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spec.*2020,228, 117738.
- 53 Zunszain, P.A., Ghuman, J., McDonagh, A.F., Curry, S. Crystallographic Analysis of Human Serum Albumin Complexed with 4Z,15E-Bilirubin-Ixalpa. *J. Mol. Biol.*2008,381, 394.
- 54 Joshi, R., Jadhao, M., Kumar, H., Ghosh, S.K. Is the Sudlow site I of human serum albumin more generous to adopt prospective anti-cancer bioorganic compound

than that of bovine: A combined spectroscopic and docking simulation approach. *Bioorg. Chem.* 2017, 75, 332–346.

55 Alder, B. J. and Wainwright, T. E. Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of Chemical Physics*, 27(5):1208–1209, 1957.

56 Allen, M. P., Tildesley, D. J. *Computer simulation of liquids*, Oxford University Press, New York, 1987.

57 Verlet, L. *Phys. Rev.* 165 (1967) 201.

57 Hockney, R. W. *Methods Comput. Phys.* 9 (1970) 136.

59 Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., Haak, J. R. J. *Chem. Phys.* 81 (1984) 3684.

60 Namba, A. M., da Silva, V.B., da Silva, C. H. T. P. *Dinâmica Molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. Eclética Química.* 33 (4). (2008).

61 Parrinello, M., Rahman, A. J. *Appl. Phys.* 52 (1981) 7182.

62 Burkert, U. Allinger, N. L. *Molecular Mechanics, Molecular Mechanics*, ACS Monograph 177, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982, 64-72.

63 Pascutti, P. G. *Introdução à Modelagem e Dinâmica Molecular*. In: Pedro G Pascutti. (Org.). *Introdução à Modelagem e Dinâmica Molecular* v. 1, p. 1-38, 2002.

64 Arfken, G. *Mathematical Methods for Physicists*, Academic Press, Orlando, FL, 3rd ed., 1985.

65 Menzel, D. (Ed), *Fundamental Formulas of Physics*, New York, 2nd ed. 1960.

66 Morse, P. M., Feshbach, H. *Methods of Theoretical Physics, Part I*, McGraw-Hill, New York 1953.

67 Hestenes, M. R., Stiefel, E. J. *Res. Nat. Bur. Stand.* 49(6) (1952) 409.

68 Peckham, G.D., McNaught, I.J., *Applications of the Maxwell-Boltzmann Distribution*. *J. Chem. Ed.* 1992, 69, 554-558.

## APÊNDICE A – Descrição de algumas metodologias empregadas para as simulações de dinâmica molecular

### Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular Clássica (DM) é uma técnica que avalia a evolução de um determinado sistema de interesse ao longo do tempo. Esse método utiliza potenciais clássicos para descrever o comportamento do sistema, possibilitando entender a dinâmica desse sistema a nível molecular. As primeiras simulações de DM foram executadas por Alder e Wainwright, visando estudar o movimento de partículas em um sistema e foi empregado um modelo de esferas rígidas para tal análise [55].

### Integração das equações de movimento

As simulações de DM usam as leis de Newton da mecânica para descrever os sistemas de interesse. Por meio da energia potencial  $V(r_i)$ , é possível calcular a força  $F_i$  que age sobre as partículas  $i$  do sistema. Esse cálculo é feito por meio da derivada da energia potencial em relação a posição  $r_i$  de cada partícula, sendo  $i = 1, 2, 3, \dots, N$ , de acordo com a equação A.1.

$$F_i = -\frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad (\text{A.1})$$

A aceleração  $a_i$  pode ser calculada pela divisão entre a força  $F_i$  e a massa  $m_i$  de cada átomo:

$$a_i = \frac{F_i}{m_i} \quad (\text{A.2})$$

A aceleração  $a_i$  calculada pode ser substituída no algoritmo de Verlet [56,57] para a obtenção da posição de cada partícula nos intervalos de tempo  $dt$ :

$$r_i(t+\delta t)=2r_i(t)-r_i(t-\delta t)+a_i(t)\delta t^2 \quad (\text{A.3})$$

Além disso, ainda por meio do algoritmo de Verlet, podemos obter as velocidades  $v_i$  de cada partícula:

$$v_i(t)=\frac{(r_i(t+\delta t)-r_i(t-\delta t))}{2\delta t} \quad (\text{A.4})$$

Introduzindo pequenas modificações no algoritmo de Verlet, podemos reduzir o erro entre termos grandes durante o cálculo das velocidades. O chamado algoritmo de Leap-Frog [58] permite calcular as velocidades e posições com maior precisão numérica:

$$r_i(t+\delta t)=r_i(t)+v_i(t+\frac{\delta t}{2})\delta t \quad (\text{A.5})$$

$$v_i(t+\frac{\delta t}{2})=v_i(t+\frac{\delta t}{2})+a_i(t)\delta t \quad (\text{A.6})$$

Em resumo, a força obtida pela derivada da energia potencial em relação a posição é utilizada para o cálculo da aceleração, que inserida no algoritmo utilizado gera as novas posições das partículas para cada intervalo de tempo e o processo é repetido durante todo o tempo de simulação.

### Controle da temperatura e pressão

Um dos métodos mais utilizados para o controle da temperatura durante o processo da DM é o chamado termostato de Berendsen [59]. Uma temperatura inicial é mantida fixa por meio do acoplamento do sistema a um banho térmico. No processo de DM é feito um re-escalamento das velocidades em cada passo de integração, adequando a energia cinética para alcançar a temperatura desejada [59,60]. Desse modo, com as restrições de posições impostas para os átomos da proteína e do ligante, o solvente tem liberdade para se ajustar corretamente ao sistema.

O processo de controle da pressão é realizado por meio da substituição da variável  $T$  por  $P$ . Além disso, as coordenadas dos átomos são usadas para substituir as velocidades atômicas. Um dos barostatos mais utilizados é o de Parrinello-Rahman [61]. Nesse modelo, o sistema de interesse (caixa de simulação da DM) pode sofrer variações em sua forma e tamanho, de acordo com as condições externas impostas. Em outras palavras, o sistema fica livre de restrições para as posições de modo que as partículas possam se adaptar às condições termodinâmicas impostas.

### **Minimização de energia e equilíbrio**

Para evitar a sobreposição dos átomos e ajustar suas posições corretamente, no início das simulações de DM, o sistema deve ser minimizado. O processo de minimização de energia busca as coordenadas adequadas de modo a minimizar a energia potencial do sistema, otimizando a geometria dos átomos [60]. Nessa técnica, o sistema é direcionado ao seu mínimo local de energia mais próximo. Assim, as deformidades nas ligações químicas e nos ângulos entre elas são otimizadas por meio dos ajustes nas posições atômicas [60,62,63].

Dentre os métodos mais utilizados para realizar as minimizações de energia em simulações de DM estão o método do *Steepest descent* (SD) [64,65,66] e o método dos gradientes conjugados (CG) [67]. O SD usa as derivadas primeiras para encontrar o caminho de mínimo. Esse método é utilizado para gerar uma primeira minimização, geralmente de uma estrutura que está distante de um mínimo. O CG parte das derivadas primeiras já encontradas para otimizar a busca pelo ponto de mínimo, evitando passos repetidos. Nesse método, o algoritmo realiza uma busca em  $n$  direções conjugadas, de modo que a progressão em uma direção não afete a progressão nas outras direções.

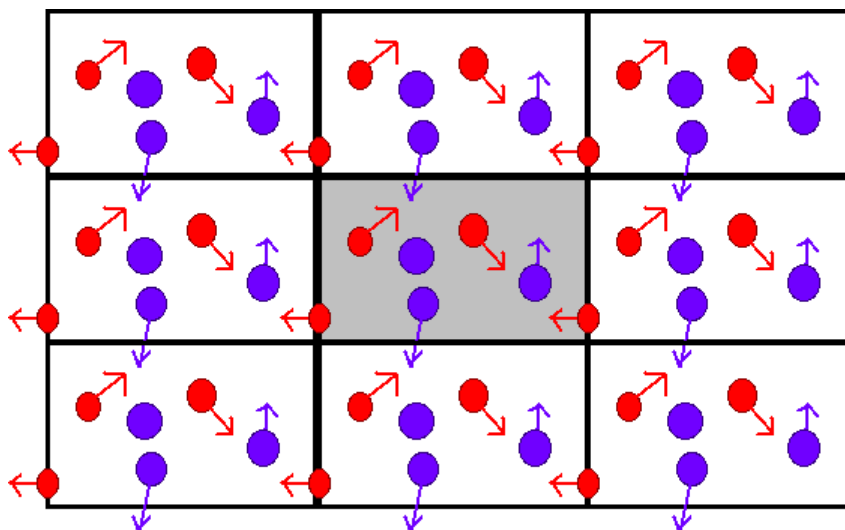
Após todo o processo de minimização, o sistema é levado de maneira gradual à uma temperatura previamente estabelecida e as velocidades iniciais são atribuídas para as partículas por meio de uma distribuição de Maxwell-Boltzmann [68].

### **Condições Periódicas de Contorno (PBC)**

Mesmo com o avanço do “poder” computacional ao longo dos últimos anos, uma simulação de DM, em geral, é aplicada a sistemas microscópicos, i.e., o número de átomos do sistema é muito menor que o número de átomos de uma amostra macroscópica. Esse maior número de partículas na superfície causam efeitos de superfícies indesejáveis. Com PBC as partículas sofrem o efeito das forças como se estivessem no interior do sistema.

Neste modelo são criadas réplicas da caixa cúbica central, usada para realizar a simulação, em todas as direções, gerando uma rede cúbica infinita. Deste modo, cada partícula localizada na região de simulação possui infinitas cópias. Além disso, o movimento da imagem é idêntico ao da partícula original, fazendo com que o número de partículas (densidade) seja conservado. Isso é possível, pois se uma partícula sair da região de simulação, uma de suas imagens irá entrar nesta região pela face oposta. Uma representação do algoritmo é apresentada na figura 13.

**Figura 13:** Representação da rede cúbica infinita utilizada nas simulações de MD. A caixa central de simulação está em destaque ao centro da imagem, seguida por suas réplicas ao longo de todo o espaço.




Fonte: Figura extraída do tutorial do GROMACS.

## ANEXO A - Publicações referentes ao presente curso de mestrado

Dados publicados referentes à primeira proposta do trabalho

Open Access
Article

### Oxidative Alteration of Trp-214 and Lys-199 in Human Serum Albumin Increases Binding Affinity with Phenylbutazone: A Combined Experimental and Computational Investigation

by  Luiza De Carvalho Bertozo <sup>1</sup>,  Ernesto Tavares Neto <sup>2</sup>,  Leandro Cristante de Oliveira <sup>2</sup> and  Valdecir Farias Ximenes <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Sciences, UNESP–São Paulo State University, Bauru, SP 17033-360, Brazil  
<sup>2</sup> Department of Physics–Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, UNESP–São Paulo State University, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil  
<sup>\*</sup> Author to whom correspondence should be addressed.

*Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*(10), 2868; <https://doi.org/10.3390/ijms19102868>

Received: 8 September 2018 / Revised: 17 September 2018 / Accepted: 19 September 2018 / Published: 21 September 2018

(This article belongs to the Special Issue Computational Studies of Structure-Dynamics-Function Relationships in Biomolecules)

View Full-Text

Download PDF

Browse Figures

#### Abstract

Human serum albumin (HSA) is a target for reactive oxygen species (ROS), and alterations of its physiological functions caused by oxidation is a current issue. In this work, the amino-acid residues Trp-214 and Lys-199, which are located at site I of HSA, were experimentally and computationally oxidized, and the effect on the binding constant with phenylbutazone was measured. HSA was submitted to two mild oxidizing reagents, taurine monochloramine (Tau-NHCl) and taurine dibromamine (Tau-NBr<sub>2</sub>). The oxidation of Trp-214 provoked spectroscopic alterations in the protein which were consistent with the formation of *N*-formylkynurenine. It was found that the oxidation of HSA by Tau-NBr<sub>2</sub>, but not by Tau-NHCl, provoked a significant increase in the association constant with phenylbutazone. The alterations of Trp-214 and Lys-199 were modeled and simulated by changing these residues using the putative oxidation products. Based on the Amber score function, the interaction energy was measured, and it showed that, while native HSA presented an interaction energy of −21.3 kJ/mol, HSA with Trp-214 altered to *N*-formylkynurenine resulted in an energy of −28.4 kJ/mol, and HSA with Lys-199 altered to its carbonylated form resulted in an energy of −33.9 kJ/mol. In summary, these experimental and theoretical findings show that oxidative alterations of amino-acid residues at site I of HSA affect its binding efficacy. [View Full-Text](#)

**Keywords:** albumin; oxidative stress; taurine dibromamine; tryptophan; *N*-formylkynurenine; phenylbutazone

[▼ Show Figures](#)

Fonte: Artigo disponível em <https://doi.org/10.3390/ijms19102868>.

Capítulo de livro publicado (durante o curso de mestrado)

## CAPÍTULO 2

### AVALIAÇÃO COMPUTACIONAL DE INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS M E M2-1 DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO (HRSV) E RIBAVIRINA

**Ernesto Tavares Neto**  
Departamento de Física-Instituto de Biociências,  
Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual  
Paulista-UNESP, São José do Rio Preto-SP

**Leandro Cristante de Oliveira**  
Departamento de Física-Instituto de Biociências,  
Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual  
Paulista-UNESP, São José do Rio Preto-SP

**RESUMO:** A abordagem computacional utilizada neste trabalho envolve simulações de docking e dinâmica molecular para caracterizar interações entre as proteínas M e M2-1 do hRSV. Essas proteínas estão relacionadas diretamente com o processo de infecção do vírus sincicial respiratório humano (no inglês *human respiratory syncytial virus*, hRSV), agente causador de infecções do trato respiratório em cerca de 12 milhões de pessoas a cada ano em diversos países, atacando principalmente crianças e idosos. Foram avaliadas interações envolvendo o composto Ribavirina e a proteína M, num processo de busca que partiu da análise das 1500 orientações possíveis para cada uma das 500 conformações geradas (um total de 750.000 estruturas avaliadas) por meio do software UCSF Dock, usando para tal o critério de mais baixa energia. Após a seleção do mais provável candidato, simulações de dinâmica molecular foram realizadas, sugerindo que este

composto interage com a interface do dímero da proteína M e que o mesmo permanece estável nesta região, possibilitando a desestabilização da forma dimerica e, com isso, interferindo na ação desta proteína. Por fim, as interações para o complexo M/M2-1 em suas formas monoméricas foram avaliadas, onde gerou-se 2000 complexos com o programa zDock, dentre os quais foi selecionado o arranjo de menor energia. Esses resultados sugerem que a presença da molécula de Ribavirina influencia na interação entre as proteínas M e M2-1, podendo desestabilizar este complexo, crucial durante o ciclo de infecção por hRSV, sugerindo assim seu emprego em possíveis tratamentos com o objetivo de inibir ou prevenir a infecção viral.

**PALAVRAS-CHAVE:** Docking e Dinâmica molecular, hRSV, Proteínas M e M2-1, Ribavirina.

COMPUTATIONAL EVALUATION OF  
INTERACTIONS BETWEEN M AND M2-1  
PROTEINS OF HUMAN RESPIRATORY  
SYNCYTIAL VIRUS (HRSV) AND RIBAVIRIN

**ABSTRACT:** The computational approach used in this work involves docking and molecular dynamics simulations to characterize interactions between M and M2-1 proteins of hRSV. These proteins are directly related to the

Ciências Exatas e da Terra e a Dimensão Adquirida através da Evolução Tecnológica 4 Capítulo 2

15

Fonte: Artigo disponível como capítulo de livro em DOI: 10.22533/at.ed.757191107.