

Fernando César Lopes Filho

Estudo por Dinâmica Molecular da estabilidade
conformacional de dímeros do peptídeo Eumenine
mastoparan-AF em água e mistura TFE-água

Fernando César Lopes Filho

Estudo por Dinâmica Molecular da estabilidade
conformacional de dímeros do peptídeo Eumenine
mastoparan-AF em água e mistura TFE-água

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Física para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ruggiero

Lopes Filho, Fernando César.

Estudo por Dinâmica Molecular da estabilidade conformacional de dímeros do peptídeo Eumenine mastoparan-AF em água e mistura TFE-água / Fernando César Lopes Filho. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2007.

52 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Roberto Ruggiero

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Dinâmica molecular. 3. Peptídios. 4. Peptídios antimicrobianos. 5. Misturas de trifluoroetanol (TFE)-água. 6. Estabilidade de estrutura secundária (Peptídios). I. Ruggiero, José Roberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROGRAMA: BIOFÍSICA MOLECULAR

Estudo por Dinâmica Molecular da estabilidade conformacional de dímeros do
peptídeo Eumenine mastoparan-AF em água e mistura TFE-água

Candidato: FERNANDO CÉSAR LOPES FILHO

Comissão
Examinadora

1. Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO RUGGIERO (Orientador)
Depto. de Física / IBILCE

2. Prof. Dr. MÁRIO SÉRGIO PALMA
Depto. de Biologia / IB/UNESP – Campus de Rio Claro

3. Dr. ANDRÉ FARIAS DE MOURA
Depto. de Química / UFSCAR

Dedico este trabalho a dois grandes exemplos de seres humanos...

*Minha mãe, Lílíana Lopes e
Meu orientador científico, José Roberto Ruggiero*

*pelo posicionamento sempre ponderado e justo,
pela coerência de seus atos,
e acima de tudo, de tudo mesmo,
são exemplos de que podemos ser melhores!*

José:

"A aprendizagem é um simples apêndice de nós mesmos; onde quer que estejamos, está também nossa aprendizagem." (William Shakespeare).

Bô:

*"Talvez você seja igual a mim,
nós vemos coisas que eles nunca verão;
você e eu viveremos para sempre." (Noel Gallagher).*

Agradecimentos

No decorrer do desenvolvimento do projeto até a redação desta dissertação, eu perturbei, interrompi e interroguei a um grande número de pessoas, mas jamais encontrei uma reação que não fosse de paciência e polidez. Não posso agradecer a todos nominalmente, mas gostaria de registrar a grande dívida de gratidão que tenho com as seguintes pessoas.

Ao meu orientador científico, Prof. Dr. **José Roberto Ruggiero**, com quem aprendi tanto e que tão generosamente compartilhou comigo seus conhecimentos e idéias. Suas palavras forneceram críticas, informações e conselhos imensuravelmente úteis, seu interesse diário e seu apoio em todas as questões foram imprescindíveis para o desenvolvimento do projeto. Minha convivência com você foi uma experiência informativa e reveladora.

Meu mais profundo débito é com minha mãe, **Liliana “Bô” Lopes**, pelo apoio, investimento e paciência incondicionais, pelos momentos de felicidade e as experiências nos momentos de dificuldades em nossas vidas. Pelo seu amor e dedicação, o meu amor e reconhecimento de toda a minha alma.

Ao Prof. Dr. **Jorge Chahine**, pelo engajamento na coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular. Seu empenho coloca em destaque as grandes qualidades desse Programa. Por oportuno, não poderia deixar de agradecer, suas sugestões para o melhoramento deste trabalho e pela convivência e trocas de experiências durante as Reuniões Científicas.

Ao Prof. Dr. **Valmir Fadel**, pelas sugestões e correções que ajudaram a guiar este trabalho e, junto com o Prof. Dr. Jorge Chahine, tornaram minha qualificação um momento de discussão profícua e agradável.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Andrés Fossey**, pelos conselhos e ensinamentos dedicados durante meu Estágio Docência. O estágio sob sua orientação foi uma experiência reveladora e empolgante.

Ao Prof. Dr. **Elói da Silva Feitosa** e ao Prof. Dr. **Elsó Drigo Filho**, que nos momentos difíceis, me ouviram e me aconselharam de forma extremamente generosa e inteligente.

Aos meus caros amigos da Pós-Graduação, em especial, **Ricardo Pazianotto**, pela longa jornada de amizade e companheirismo que vem desde os primórdios da nossa graduação e pelas longas discussões sobre idéias abstratas e quase sempre inaplicáveis; **Carlos Emídio**, por sua amizade, desprendimento de idéias e pelas longas discussões sobre Ciências, Música e Linux; as Dras. **Sabrina Broggio** e **Márcia Cabrera**, pelas discussões envolvendo os peptídeos antimicrobianos e pela maneira com que sempre estão prontas a ajudar o próximo.

Ao meu irmão **Fabrício “R´ Kid”**, pela forte amizade e companheirismo que nos une. Pelas palavras certas nas horas certas!

Aos funcionários do Departamento de Física, Ilva, Rose, Paulinho, Barbosa e Marcelino pela eficiência, disposição e ajuda em todos os momentos.

A CAPES, FAPESP e MEC pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Que **DEUS** nos ilumine nos próximos desafios!

RESUMO

Mastoparanos são peptídeos helicoidais, anfipáticos e catiônicos que apresentam diversas funções biológicas, entre elas temos a ação antimicrobiana, que está relacionada à sua afinidade por membranas aniônicas de bactérias e sua capacidade lítica. Recentes estudos têm mostrado que a formação de poros em membranas é facilitada pela agregação de peptídeos carregados. Esta situação favoreceria a hipótese de que a formação de poro é essencialmente similar a eletroporação molecular. Neste trabalho investigamos a estabilidade de um dímero do Eumenine Mastoparan-AF, um membro catiônico (+4) da família dos mastoparanos, em água e mistura TFE-água, mimetizando meio aquoso e meio membranar, respectivamente. Particular atenção foi colocada nas interações eletrostáticas de grupos carregados e polares, principalmente naqueles que participam de ligações de hidrogênio entre os dois peptídeos e na hidratação da cadeia principal e cadeias laterais apolares. Uma estrutura dimérica representativa foi inicialmente obtida por um método de *docking* rígido e submetida às simulações de dinâmica molecular usando o pacote GROMACS. Resultados de 50 ns de simulação em água mostram uma perda parcial do conteúdo helicoidal dos peptídeos e a estrutura dimérica se desestrutura devido às interações desfavoráveis dos resíduos hidrofóbicos com a água. Por outro lado, simulações em mistura TFE-água mostram que o dímero é estável durante o tempo observado, porque as moléculas de TFE se agrupam ao redor de resíduos hidrofóbicos criando um meio apropriado que protege as ligações de hidrogênio intra- e inter-peptídeos. Surpreendentemente, parece que a repulsão eletrostática não é a principal razão para a desagregação do dímero, o que reforça a importância da agregação e o mecanismo de eletroporação molecular para a formação de poros.

Palavras chave: Dinâmica molecular, peptídeos antimicrobianos, misturas 2,2,2-trifluoroetanol (TFE)-água, estabilidade de estrutura secundária.

ABSTRACT

Mastoparans are helical, amphipathic and cationic peptides that display many biological functions, among which is the antimicrobial activity, which is related to its affinity for anionic membranes of bacteria and its lytic capacity. Recent studies have shown that pore formation on membranes is facilitated by the aggregation of charged peptides. This situation would favor the hypothesis that pore formation is essentially similar to the molecular electroporation. In this work, we investigate the stability of a dimer of the Eumenine Mastoparan-AF, a cationic (+4) member of the Mastoparan family, in water and TFE-water mixture, mimicking aqueous and membrane environments, respectively. Particular attention have been put on the electrostatic interactions of charged and polar groups, mainly those participating of hydrogen bonds between the two peptides and on the hydration of the backbone and apolar side chains. A representative dimer conformation was initially obtained by a rigid docking procedure and submitted to molecular dynamics simulations using the GROMACS package. Results of 50 ns of simulation in water show a partial loose of the helical content of the peptides and the dimer structure breaks down due to unfavorable interactions of hydrophobic residues with water. On the other hand, simulations in TFE-water mixture show the dimer is stable in the running time, because TFE molecules assemble around hydrophobic residues creating a suitable environment that protect the intra- and inter-peptides hydrogen bonds. Surprisingly, it seems that electrostatic repulsion is not the main reason for disaggregation of the dimer what reinforces both the importance of aggregation and the molecular electroporation mechanism for pore formation.

Key words: Molecular dynamics, antimicrobial peptides, 2,2,2-trifluoroethanol (TFE)-water mixtures, secondary-structure stability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
	1.1 Características estruturais	11
	1.2 Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos	13
2	OBJETIVOS	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
4	RESULTADOS	22
	4.1 <i>Docking</i>	22
	4.2 Dímero em água	22
	4.3 Dímero em mistura TFE-água	38
5	DISCUSSÃO	47
6	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Mastoparanos são tetradecapeptídeos, constituídos de 10 a 14 resíduos de aminoácidos, catiônicos, apresentam estrutura helicoidal anfipática e alguns exemplares possuem C-terminal amidado. Esses peptídeos são extraídos do veneno de vespas da ordem *Hymenoptera* (NAKAJIMA et al., 1986) e apresentam diversas funções biológicas, entre elas: a ação antimicrobiana (TOSSI et al., 2000) e ação hemolítica (ARGIOLAS; PISANO, 1983; NAKAJIMA et al., 1986; KONNO et al., 2000; MENDES et al., 2004, 2005). Dentre os mastoparanos, salientamos a existência do peptídeo Eumenine mastoparan-AF, EMP-AF, extraído da vespa *Anterhynchium flavomarginatum micado*, peptídeo objeto de nossos estudos.

O alvo destes peptídeos bioativos são as membranas biológicas, constituídas por bicamadas fosfolipídicas, que são estruturas anfipáticas por apresentarem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A região hidrofílica compõe a superfície externa da membrana que, em células eucarióticas, são compostas pelas cabeças polares da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, conferindo-lhes caráter zwitteriônico. Em células procarióticas, como por exemplo, bactérias, são compostas pelas cabeças polares da fosfatidilglicerol e fosfatidilserina, conferindo-lhes caráter aniônico. A região hidrofóbica é constituída pelas cadeias de hidrocarbonetos, conhecidas cadeias alifáticas, e ficam escondidas no miolo da bicamada para não interagirem com o solvente, pois são incapazes de formar ligações de hidrogênio com moléculas polares como a água.

O caráter zwitteriônico ou aniônico das membranas é um dos fatores que modulam o espectro de seletividade dos peptídeos bioativos mastoparanos. As funções biológicas do EMP-AF sobre suas moléculas alvo, assim como de todos os peptídeos antimicrobianos, estão correlacionadas as suas características estruturais, e suas análises contribuem para o melhor entendimento dessas funções, com particular atenção na ação antimicrobiana.

1.1 Características estruturais

1.1.1 Estrutura primária

O EMP-AF possui 14 resíduos de aminoácidos, que são:

Ile – Asn – Leu – Leu – Lys – Ile – Ala – Lys – Gly – Ile – Ile – Lys – Ser – Leu - NH₂
(KONNO et al., 2000).

Observa-se que o peptídeo é rico em resíduos hidrofóbicos, escritos em preto, possui três resíduos polares positivamente carregados, as lisinas, escritos em azul e, possui ainda, dois resíduos polares neutros, asparagina e serina, escritos em verde.

Os resíduos isoleucina, leucina, alanina e lisina, quando unidos em uma cadeia peptídica, são conhecidos como resíduos que se estruturam em conformação helicoidal, contudo, essa estruturação fica condicionada ao meio em que o peptídeo se encontra. As lisinas são responsáveis pelo caráter catiônico do peptídeo, conferindo-lhe seletividade de interação por membranas aniônicas de bactérias. Este processo envolve mecanismos de formação de poros que provocam vazamento da membrana, causando a morte da bactéria, daí a ação antimicrobiana (TOSSI et al., 2000). Os resíduos polares neutros são resíduos frequentemente envolvidos em ligações de hidrogênio, que contribuem para a manutenção da estrutura helicoidal do peptídeo.

A amidação do C-terminal permite a acomodação do peptídeo em ambientes não polares (ANDREU; RIVAS, 1998). Além de oferecer mais uma ligação de hidrogênio entre o grupo CO da isoleucina 11 e o grupo NH₂ da leucina 14, quando o peptídeo está estruturado em conformação helicoidal (SFORÇA et al., 2004). Estudos com a forma desamidada do EMP-AF mostram potência antimicrobiana reduzida (dos SANTOS CABRERA et al., 2004).

1.1.2 Estrutura secundária

O EMP-AF possui resíduos que favorecem a conformação helicoidal (isoleucinas, leucinas, alanina, lisinas), entretanto, em meio aquoso, essa conformação é desestruturada devido à competição das moléculas de água com os grupos polares da cadeia principal pelas ligações de hidrogênio (BROGGIO COSTA, 2006).

Na interface de meios hidrofílico-hidrofóbico, como a interface do ambiente membranar, o peptídeo enovela em conformação helicoidal que é favorecida termodinamicamente, pois o ambiente permite a formação de ligações de hidrogênio da cadeia principal, ou seja, entre os grupos amida e carbonila dos resíduos $i-i+4$ (dos SANTOS CABRERA et al., 2004; SFORÇA et al., 2004). Uma característica peculiar aos mastoparanos é a de distribuir os resíduos em duas regiões bem definidas da hélice. Uma região é a face hidrofóbica, onde ficam estruturados os resíduos apolares e a outra é a face hidrofílica, onde ficam estruturados os resíduos polares neutros e carregados. Essas regiões ocupam lados opostos do ponto de vista do eixo da hélice e essa característica estrutural faz dela uma hélice anfipática. A anfipaticidade não é tão importante para a ação antimicrobiana (YEAMAN; YOUNT, 2003), entretanto, propõe-se que é necessário que a face hidrofílica do peptídeo

interaja com a face hidrofílica da membrana e a face hidrofóbica dele fique adsorvida entre as cadeias alifáticas. É a partir dessa conformação peptídeo-membrana que se inicia a perturbação da estrutura membranar, que culminará, dependendo de vários fatores, na formação de poros transmembrânicos.

1.1.3 Carga

O EMP-AF exibe carga +4, das quais três cargas são das lisinas e uma do N-terminal. Essa carga líquida faz com que o peptídeo tenha uma região altamente catiônica, devido à estrutura anfipática, importante para a interação com membranas aniônicas de bactérias. Em geral, com mastoparans, o aumento da cationicidade está associado ao aumento da ação antimicrobiana.

1.1.4 Macro-dipolo da hélice

A cadeia polipeptídica ou cadeia principal é formada pela polimerização de vários aminoácidos, unidos pela ligação peptídica. A ligação peptídica fica no plano do grupo amida definida pelos átomos $C\alpha-O_{\text{carbox}}-C\alpha-H_{\text{amídico}}$. Em cada plano está contido um pequeno dipolo ($\vec{p}$ é definido por $O=C \rightarrow N-H$) e quando a cadeia está estruturada em hélice- α ocorre o alinhamento desses planos ao longo da hélice, ocorrendo, também, o alinhamento desses pequenos dipolos, dando origem ao dipolo global ou macro-dipolo da hélice. Do ponto de vista eletrostático, é interessante e importante destacarmos que a interação entre dois dipolos dispostos de forma antiparalela é o arranjo de energia mais baixa, por isso mais estável. Como exemplo de interação entre dipolos, poderíamos tomar a interação entre dois peptídeos EMP-AF que interagem diretamente em uma disposição antiparalela.

1.2 Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos

Dados de Dicroísmo Circular Orientado obtidos para vários peptídeos helicoidais exibem dois espectros distintos, dependentes da concentração de peptídeos, expressado como fração molar peptídeo-lipídeo, P/L (HUANG, 2000). Em baixo P/L, o espectro corresponde à orientação helicoidal paralela ao plano da bicamada (HUANG; WU, 1991; LUDTKE et al., 1994; HELLER et al., 1997). A partir de uma concentração crítica P/L^* , cujo valor depende da composição da bicamada, o espectro corresponde à orientação helicoidal perpendicular ao plano da bicamada (HUANG, 2000).

Estes estados físicos distintos são chamados de estado “S”, quando a orientação é paralela ao plano da bicamada e estado “T”, quando a orientação é perpendicular.

Correspondendo ao estado “S”, os peptídeos em conformação aleatória, quando estão em solução aquosa, se aproximam da interface membranar e são adsorvidos na região hidrofóbica dos lipídeos. Nessa situação eles enovelam em estrutura helicoidal anfipática e permanecem com os eixos das hélices paralelos ao plano da bicamada, intercalando entre os lipídeos, enquanto a fração $P/L < P/L^*$ (MÜNSTER et al., 2002). As faces hidrofóbicas dos peptídeos ficam em contato com a região hidrofóbica da bicamada e as faces hidrofílicas interagem com as cabeças polares. Esta conformação cria uma tensão interna na membrana, causando perturbações na mesma, ou seja, desorganizando as cadeias de hidrocarbonetos, com conseqüente afinamento na espessura da bicamada (Figura 1). Este estado é funcionalmente inativo, uma vez que não provoca vazamento.

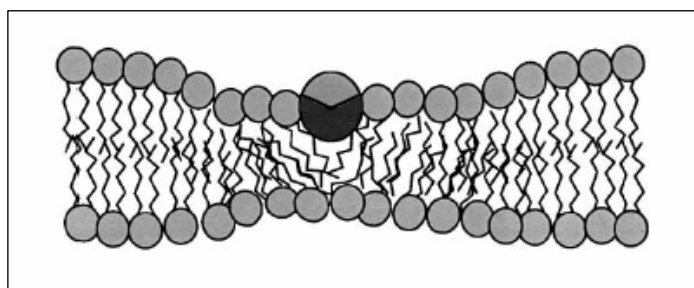


Figura 1. Peptídeo adsorvido entre os lipídeos, desorganizando as cadeias de hidrocarbonetos e causando afinamento na espessura da bicamada. Em detalhe, temos a face hidrofóbica do peptídeo em preto e a face hidrofílica em cinza. Representação esquemática modificada de Münster et al. (2002).

Um fenômeno que pode ocorrer neste estado é a translocação de peptídeos. Isto acontece quando peptídeos adsorvidos criam um desbalanço de massa, causando curvatura local da bicamada e aumento no movimento *flip-flop*. Alguns peptídeos se agregam, passam para a superfície interior dela e ao entrarem à espessura da membrana volta ao normal (Figura 2).

Em alta concentração, ou seja, $P/L > P/L^*$, estado “T”, os peptídeos encontram-se enterrados na bicamada, organizados em estruturas de poros. Atualmente existem três modelos que descrevem essas estruturas, denominadas de modelos de poro barril, tapete e toroidal.

Estudos realizados por dos Santos Cabrera (2006), com o EMP-AF, concluiu que dentre aqueles modelos, o que melhor se adequou às evidências experimentais é o modelo de poro toroidal.

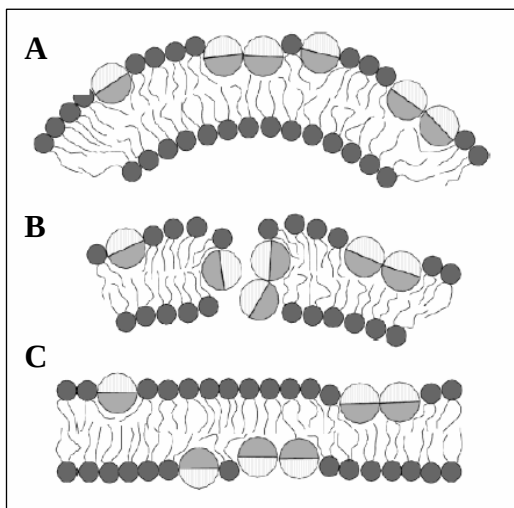


Figura 2. Translocação de peptídeos. **A)** os peptídeos estão adsorvidos, provocando o afinamento na espessura da bicamada; **B)** os peptídeos entram pela membrana através de um poro transitório e chegam ao interior; **C)** após entrarem a espessura é recuperada. Representação esquemática de Pokorny e Almeida (2004).

Estudos realizados por Huang (2000), Münster et al. (2002) e Duclohier (2006) propõem que no modelo de poro toroidal, modelo dedicado à formação de poros por peptídeos catiônicos, ocorre à agregação dos peptídeos às cabeças polares dos lipídeos, ou seja, as faces hidrofílicas (catiônicas) ficam interagindo com as cabeças aniônicas (Figura 3). Estas agregações seriam possíveis devido à curvatura que a membrana sofre, pois seu interior que tem a forma de toro é revestido pelos peptídeos (Figura 3A). Considera-se que essa conformação do poro é exigida, para impedir a interação direta entre os monômeros, promovendo o balanço eletrostático entre as cargas dos grupos carregados dos peptídeos. O efeito da repulsão eletrostática entre estes grupos inviabilizaria a formação de poros.

Como descrito acima, o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos, conhecido como Modelo de dois estados compreende os estados “S” e “I”. O estado “S” abrange a adsorção e a translocação de peptídeos. O estado “I” abrange outro modelo, o de poro toroidal. Neste mecanismo cinético os monômeros do peptídeo em conformação aleatória em solução aquosa se aproximam, são adsorvidos na região hidrofóbica da bicamada e se enovelam em conformação helicoidal anfipática. Acima da concentração crítica de peptídeo-lipídeo ocorre a agregação de vários peptídeos às cabeças polares dos lipídeos, o que culmina na formação do poro toroidal.

Perante este tipo de interação peptídeo-membrana, como o descrito pelo modelo de poro toroidal, outros estudos fazem propostas que divergem em vários aspectos das apresentadas pelo modelo tradicional.

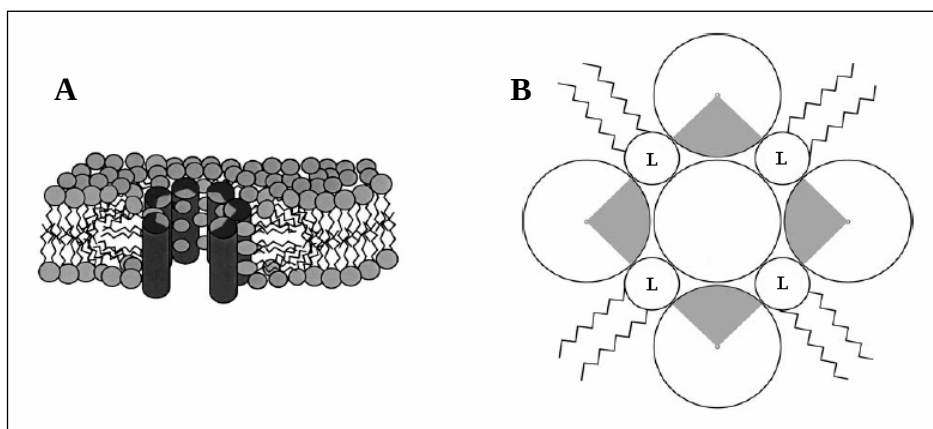


Figura 3. Conformação de poro proposta por Huang (2000), Münster et al. (2002) e Duclohier (2006), baseado em estudos de peptídeos catiônicos. **A)** visão da forma toroidal do poro e da interação das cabeças polares dos lipídeos (esferas cinzas) com as faces hidrofílicas dos peptídeos; **B)** visão no eixo das hélices anfipáticas. Em detalhe, as cabeças polares dos lipídeos (L) que ficam entre os peptídeos interagindo com suas faces hidrofílicas, e no centro, o canal transmembrânico. Representações esquemáticas modificadas de Münster et al. (2002); Duclohier (2006), respectivamente.

Contra a necessidade da agregação dos peptídeos às cabeças polares, Miteva et al. (1999) e Gurtovenko e Vattulainen (2005) propõem a agregação dos peptídeos, sem o intercalamento das cabeças polares. Essa situação favoreceria a formação de poros de forma essencialmente similar a um processo que os autores denominaram “eletroporação molecular”. De acordo com os autores, o forte campo eletrostático local induzido por um grupo de peptídeos agregados bastaria para disparar a formação do poro. Para corroborar a tese, resultados experimentais têm mostrado que a formação do poro é menos favorável em ambientes com alta concentração de sal.

De qualquer modo, estudos de Dempsey et al. (2003) com magaininas dimerizadas mostram que ocorre aumento na atividade de permeabilização de membranas se comparado com a forma monomérica, exigindo uma concentração de peptídeo-lipídeo de 1/5000, valor abaixo do observado por Huang (2000), que é de 1/100 para os monômeros.

Recentemente, Leontiadou et al. (2006) simulando por dinâmica molecular a interação de 4 magaininas MG-H2 (um análogo da magainina2 que possui 4 lisinas, 1 N-terminal carregado, 1 C-terminal carregado e 1 ácido glutâmico, exibindo carga líquida +3) com uma membrana fosfolipídica, obtiveram resultados que indicam que a agregação dos peptídeos aumenta a ocorrência de formação do poro.

A formação do poro para magaininas é um processo cooperativo, ou seja, uma concentração crítica é requerida para criar estresse suficiente na membrana e a formação do poro é facilitada pela agregação dos peptídeos na interface da membrana (LEONTIADOU et

al., 2006). Além disso, os autores observaram fortes contrastes na estrutura do poro obtido pelas simulações em relação ao que é proposto pelo modelo de poro toroidal tradicional.

Nas simulações observaram que após a adsorção dos peptídeos a indução cooperativa na formação do poro não ocorreu com os peptídeos enterrados perpendicularmente ao plano da membrana, mas enterrados em diversas orientações, inclusive no miolo da bicamada com orientação paralela ao plano da membrana. Os peptídeos formaram um poro cujas aberturas (abertura para o meio externo e abertura para o interior da bicamada) eram maiores que a circunferência do centro. Observaram, também, que o movimento de *flip-flop* ocorreu de forma espontânea a cada 100 ns de simulação.

Destas observações, estes autores concluem que dois aspectos do modelo tradicional devem ser reconsiderados:

- a) a do poro toroidal cilíndrico, pois o poro obtido apresenta abertura duas vezes maior nas superfícies da bicamada do que na região central;
- b) os peptídeos adotam uma variedade de orientações, podendo caracterizá-los desordenados, em desacordo com o modelo tradicional, que define a formação de poros como uma estrutura organizada com os peptídeos enterrados em orientação perpendicular ao plano da bicamada.

O alinhamento dos resultados obtidos por Miteva et al. (1999), Dempsey et al. (2003), Gurtovenko e Vattulainen (2005) e Leontiadou et al. (2006) indicam que a agregação, ou seja, interação direta entre os peptídeos, não prejudica a função biológica de peptídeos catiônicos, aliás, se mostra necessária.

Diante deste cenário, no tocante da agregação ou não dos peptídeos, das características estruturais dos mastoparanos, em particular do EMP-AF, fizemos duas perguntas que exprimem a relevância deste trabalho.

O EMP-AF é o principal constituinte do veneno da vespa solitária *A. flavomarginatum micado* (KONNO et al., 2000). Supondo que existam formas agregadas, é a característica catiônica que não os permitem permanecerem nessa conformação quando são submetidos à solução aquosa?

Observada a agregação de peptídeos no miolo da bicamada (LEONTIADOU et al., 2006), qual a influência que as interações eletrostáticas repulsivas impelem sobre a estrutura de um agregado em uma simulação com solvente que mimetize o ambiente membranar?

2 OBJETIVOS

Neste trabalho foram realizadas simulações por dinâmica molecular de dímeros do peptídeo EMP-AF em diferentes soluções, para estudar seus comportamentos estruturais com os objetivos de investigar:

- a) os fatores que desencadeiam a desestruturação do dímero em solução aquosa;
- b) a estabilidade do dímero em mistura TFE-água, para compreender as interações entre peptídeos em um ambiente hidrofóbico-hidrofílico que mimetiza o ambiente de membranas neutras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Usamos o arquivo de coordenadas atômicas da 1ª estrutura tridimensional do peptídeo Eumenine mastoparan-AF-NH₂, dentre as 27 estruturas obtidas por Ressonância Magnética Nuclear, em mistura TFE-água em proporção 30:70 (v:v)(SFORÇA et al., 2004). O peptídeo estava estruturado em hélice- α anfipática canônica.

3.2 Métodos

Com duas cópias do arquivo de coordenadas atômicas realizamos um *docking* que produziu a estrutura tridimensional dimérica com a qual foram corridas as dinâmicas de produção.

O *docking* foi realizado com o software *Hex* versão 4.2 (RITCHIE; KEMP, 2000) e consistiu de uma busca otimizada do encaixe geométrico entre corpos rígidos, sem restrições de rotação, translação e distâncias. Todas as possibilidades de encaixe foram penalizadas pelas análises das interações eletrostáticas definidas pelos potenciais de Coulomb e Lennard-Jones, com permitividade relativa referente a vácuo. Após as avaliações de encaixe e interações eletrostáticas a coleção de soluções foi organizada em ordem crescente de energia intermolecular.

A estrutura dimérica de menor energia obtida de acordo com o campo de forças do *Hex*, programa de *docking*, foi submetida à minimização de energia implementada pelo campo de forças do GROMACS. Tratamos o N-terminal e grupos laterais das lisinas como cargas e o C-terminal sem carga por causa da carboxiamidação.

Todas as simulações foram equilibradas por 300 ps para as caixas com água e 1 ns para as caixas com mistura TFE-água, restringindo as posições atômicas dos peptídeos. Para as simulações com a mistura TFE-água, caixa cúbica de 4,5 nm de aresta foi previamente criada e termalizada com proporção de 30:70 (v:v) de TFE e água (FIORONI et al., 2000; BROGGIO COSTA, 2006). Os contra-íons Cl⁻ foram inseridos nas posições eletrostaticamente mais favoráveis para neutralizar o sistema.

As dinâmicas moleculares de produção foram realizadas conforme amostra isotérmica-isobárica em temperatura de 300 K. Todas as simulações foram corridas com o pacote de *softwares* GROMACS versão 3.3 (LINDAHL et al., 2001), usando o campo de força GROMOS-96 (43a1)(VAN GUNSTEREN et al., 1996), com modificações para os átomos

que compõem a molécula de TFE (FIORONI et al., 2000). Empregamos constantes de tempo de 0,1 ps (τ_t) para o acoplamento Berendsen de temperatura e 1,0 ps (τ_p) para o acoplamento Berendsen de pressão, ambos ao sistema (BERENDSEN et al., 1984). O algoritmo LINCS (HESS et al., 1997) foi usado para restringir ligações covalentes da proteína e o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992) foi usado para restringir a geometria das moléculas de água. O algoritmo *leap-frog* (HOCKNEY et al., 1974) foi usado para integrar as equações de movimento com um passo de 2,0 fs, sobre um total de 50 e 30 ns (para caixa com água e mistura TFE-água, respectivamente). Velocidades iniciais foram obtidas a partir da distribuição de Maxwell em 300 K, e as interações de longo alcance foram tratadas usando o método Particle-mesh Ewald sum (PME)(DARDEN et al., 1993), com um raio de corte de 1,4 nm. As listas de vizinhos foram atualizadas a cada 10 fs para o cálculo das contribuições eletrostáticas de curto alcance e, nas interações de van der Waals, empregamos raio de corte de 1,4 nm.

As arestas da caixa cúbica para a simulação do dímero foram inicialmente fixadas em 5,0 nm, contendo 3974 moléculas de água modelo SPC (*Simple Point Charge*)(BERENDSEN et al., 1981), quando simulando somente água como solvente. Quando simulando em mistura TFE-água, a caixa continha 276 moléculas de TFE e 2666 moléculas de água.

As tabelas que apresentam as médias de energia de interação coulombiana calculadas em intervalos de tempo, foram obtidas somando-se a energia correspondente a cada frame dividido pelo número de frames equivalente a 5 e 10 ns. Como nossa trajetória foi salva a cada 2,5 ps, um intervalo de 5 ns corresponde a 2000 frames e 10 ns a 4000 frames. Assim

temos que a média $m = \frac{\left(\sum_{i=1}^n E_{coulomb}(i) \right)}{n}$, onde: $E_{coulomb}(i)$ é igual a energia de interação

coulombiana entre dois dados grupos no i -ésimo frame; n é igual ao número total de frames considerados para se compor um intervalo de tempo.

Para o cálculo das energias de interação de Coulomb foram considerados os átomos N, H1, H2, H3, CA, para a carga do grupo NH_3^+ dos N-terminais dos peptídeos; CE, NZ, HZ1, HZ2, HZ3, para a carga do grupo NH_3^+ das cadeias laterais das lisinas; CO e NH para os grupos polares da cadeia principal.

As tabelas que apresentam os percentuais de tempo para cada intervalo em que uma dada ligação de hidrogênio está formada, foram obtidas somando-se o número de frames para os quais uma determinada ligação estava formada, (1), em um determinado intervalo, dividido

pelo número total de frames considerados para se compor um intervalo de tempo de 5 ou 10 ns.

Para o cálculo da existência de ligação hidrogênio foram considerados os átomos CO e NH dos grupos polares da cadeia principal.

Os gráficos de solvatação em água, tanto ao redor de grupos polares da cadeia principal quanto ao redor de grupos CH₂ mais externos das cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos, foram obtidos calculando-se a integral da função de distribuição radial centrada no centro de massa desses grupos considerando apenas raios de 0,4 nm (para grupos polares da cadeia principal) ou 0,5 nm (para grupos das cadeias laterais) em intervalos de 1 ns. Portanto, os gráficos foram plotados com 50 intervalos de 1 ns contra 50 valores de números moléculas de água ao redor de um determinado grupo.

Os gráficos de solvatação em mistura TFE-água foram calculados de maneira análoga. Entretanto, consideramos um único intervalo (de 50 ns), obtendo assim, gráficos do número de grupos flúor e oxigênio da água como função do raio.

4 RESULTADOS

Neste trabalho foram realizadas análises dos perfis eletrostático e de solvatação das simulações com o peptídeo EMP-AF em diferentes soluções, para investigarmos a estabilidade da estrutura dimérica.

4.1 Docking

Com duas cópias do arquivo de coordenadas atômicas do peptídeo EMP-AF e, por meio de um *docking* rígido e em vácuo, obtivemos 117 estruturas diméricas que foram escalonadas em ordem crescente de energia. A melhor solução, ou seja, aquela que apresentava menor energia intermolecular exibia $-257,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, enquanto a segunda melhor na escala exibia $-237,7 \text{ kJ mol}^{-1}$, conferindo a primeira, energia 8,5% menor do que a segunda.

As 117 estruturas apresentam as hélices dispostas de forma antiparalela. Essa disposição, favorecida pela interação entre os macro-dipolos das hélices, ganha, adicionalmente, estabilidade pelas interações eletrostáticas entre os grupos das extremidades, ou seja, grupos NH_3^+ do N-terminal de uma hélice com os grupos polares do C-terminal da outra.

A submissão da estrutura de menor energia a minimização de energia pelo campo de forças implementado no GROMACS, viabilizou 2 ligações de hidrogênio além das 4 que já existiam. As ligações que existiam são as marcadas com *a*, *d*, *e* e *b*, e as que foram viabilizadas, *c* e *f* (Figura 5). Devido ao antiparalelismo das hélices as ligações são simétricas e pinçam os peptídeos em suas extremidades.

Na Figura 5 estão mostrados a estrutura inicial do monômero e a estrutura de menor energia para o dímero obtido pelo *docking* rígido, após a minimização de energia.

4.2 Dímero em água

Os resultados da simulação do dímero em água mostram que as cadeias do conjunto se desestruturam a partir dos C-terminais. Isso também ocorre para o monômero em água (SFORÇA et al., 2004; dos SANTOS CABRERA et al., 2004; BROGGIO COSTA, 2006). Na Figura 6 estão mostrados os padrões de estrutura secundária por resíduo como função do tempo de simulação, obtido usando a ferramenta *DSSP (Database of Secondary Structure in Proteins)* (KABSCH; SANDER, 1983). Dele pode-se notar que no intervalo entre 5 e 10 ns,

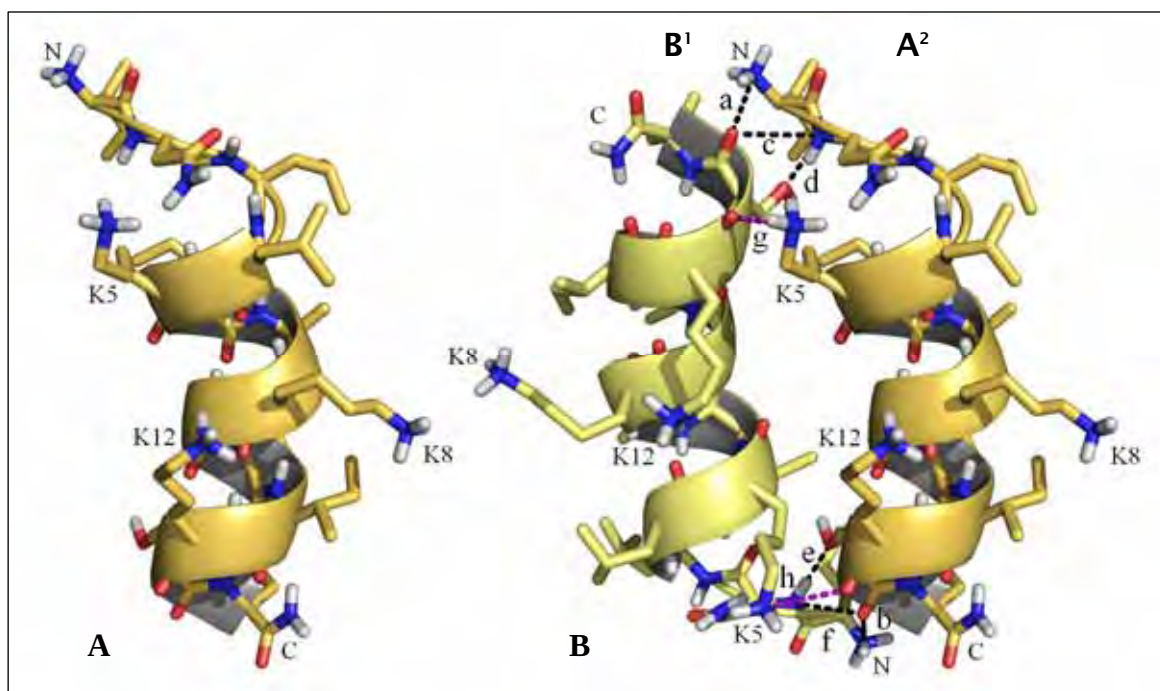


Figura 5. Estruturas usadas no *docking* e dinâmica molecular. **A)** monômero usado como entrada para o processo de *docking*; **B)** dímero após a minimização de energia. Essa estrutura foi inicialmente obtida pelo *docking* e apresentava menor energia na escala das 117 soluções. As linhas tracejadas pretas e roxas são ligações de hidrogênio entre grupos polares de cadeias distintas, **a** (NH_3^+ (I1-A)-CO (S13-B)), **c** (NH (N2-A)-CO (S13-B)), **d** (NH (N2-A)-COH (S13-B)), **e** (COH (S13-A)-NH (N2-B)), **f** (CO (S13-A)-NH (N2-B)), **b** (CO (S13-A)- NH_3^+ (I1-B)), **g** (NH_3^+ (K5-A)-CO (K12-B)), **h** (CO (K12-A)- NH_3^+ (K5-B)). Temos as lisinas 5, 8 e 12 e terminais denominados por K5, K8 e K12 e N-, C-terminais, respectivamente.

¹ Cadeia B

² Cadeia A

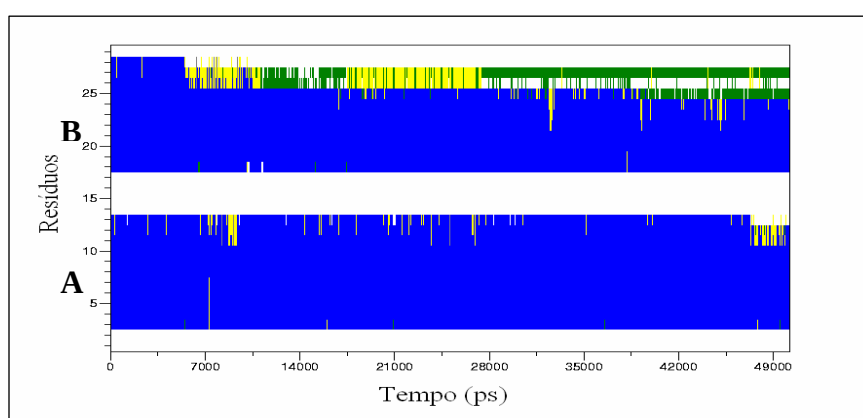


Figura 6. Padrões de estrutura secundária por resíduo como função do tempo de simulação. **A)** cadeia A; **B)** cadeia B. Em branco, resíduos em *random coil*; verde, resíduos em curvas; amarelo, resíduos em voltas; azul, resíduos em hélice- α .

os resíduos de aminoácidos 11 a 14 da cadeia B alternam suas conformações entre hélice- α , *random coil* e voltas. Entre 47 e 52 ns, o mesmo fenômeno ocorre para os resíduos 11 a 14 da cadeia A. Depois desses intervalos de tempo até o final do período observado, a estrutura helicoidal para esses resíduos não é mais obtida (conforme extensão da simulação de 50 para 60 ns não exposta neste trabalho). Além disso, pode-se notar que a partir de 38 ns o resíduo 10 da cadeia B também deixa de apresentar estruturação helicoidal.

Considerando que o peptídeo é catiônico, com carga líquida +4, devida aos grupos NH_3^+ do N-terminal e das lisinas 5, 8 e 12 e que a estrutura helicoidal não é estável em simulações do monômero em água (BROGGIO COSTA, 2006), fizemos uma análise do perfil das interações eletrostáticas inter-cadeias e a análise do perfil de solvatação sobre as regiões estruturada e desestruturada, buscando compreender as razões para a desestruturação observada para a estrutura dimérica.

4.2.1 Perfil eletrostático

A análise do perfil eletrostático foi dividida em partes como: efeito repulsivo entre grupos carregados positivamente de cadeias distintas, efeito atrativo entre grupos polares que participam das ligações de hidrogênio inter-cadeias e entre grupos carregados e grupos polares de cadeias distintas e, por fim, efeito global das interações eletrostáticas.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios das energias das interações de Coulomb entre grupos carregados de cadeias distintas. As médias foram tomadas em 6 intervalos, dois de 5 ns e quatro de 10 ns.

Tabela 1. Valores médios das energias de interações de Coulomb entre grupos NH_3^+ das lisinas e N-terminal da cadeia B e grupos NH_3^+ das lisinas e N-terminal da cadeia A, calculados em intervalos de 5 e 10 ns.

B ¹	A ²	0-5 ns	5-10 ns	10-20 ns	20-30 ns	30-40 ns	40-50 ns
kJ mol ⁻¹							
5	12	7,12	5,96	3,33	1,72	2,12	3,02
8	12	1,68	1,13	4,10	3,93	5,30	4,28
12	12	3,48	3,41	0,03	---	---	---
5	8	0,01	0,05	---	---	---	---
8	8	0,02	---	0,02	0,01	0,05	0,01
12	8	1,55	3,55	0,07	---	0,06	---
5	5	---	---	---	---	---	---
8	5	0,01	---	---	---	---	---
12	5	7,49	5,37	1,50	0,75	1,73	1,55
1	12	---	---	---	---	---	---
12	1	---	---	0,01	0,19	0,01	---

¹ Cadeia B; ² Cadeia A; 5, 8, 12, 1, referem-se as cargas das lisinas 5, 8 e 12 e a carga do N-terminal; ---: energias menores que 10⁻² kJ mol⁻¹.

Observa-se que, com a evolução do sistema, os grupos carregados se movimentam, juntamente com o resto da estrutura, de modo a diminuir a intensidade da repulsão entre estes grupos. A única exceção são os grupos associados às lisinas 8 (cadeia B) e 12 (cadeia A) para os quais a interação cresce, ou seja, eles se aproximam ao longo da simulação. A intensidade da interação entre os grupos não mostrados (1 da cadeia B com 5 e 8 da cadeia A e 1 da cadeia A com 5 e 8 da cadeia B) é ainda menor do que as apresentadas.

Esse conjunto de interações repulsivas tem, ao menos inicialmente, que ser compensadas por interações atrativas. Os candidatos naturais são os grupos que fazem parte das ligações de hidrogênio indicadas anteriormente (Figura 5, p. 23). Considerando, ainda, que no período observado somente parte das extremidades se desestruturam, estudamos o tempo de existência das ligações de hidrogênio que, em vácuo (durante o processo de *docking*) e na minimização de energia contribuem para a estabilidade do dímero.

Na Tabela 2 estão dispostos os percentuais de tempo para cada intervalo em que a ligação de hidrogênio entre os grupos polares da cadeia B e A estão formados.

Tabela 2. Percentual de tempo que estão formadas ligações de hidrogênio entre grupos polares da cadeia B e grupos polares da cadeia A, calculados em intervalos de 5 e 10 ns.

Ligações ¹	B ²	A ³	0-5 ns	5-10 ns	10-20 ns	20-30 ns	30-40 ns	40-50 ns
			%					
<i>a</i>	CO (S13)	NH ₃ ⁺ (I1)	0,3	0	0,20	0,08	0	0
<i>c</i>	CO (S13)	NH (N2)	29,79	3,35	19,45	0	0	0
<i>d</i>	COH (S13)	NH (N2)	58,22	78,50	10,75	7,18	0	0
<i>g</i>	CO (K12)	NH ₃ ⁺ (K5)	1,55	3,60	8,45	5,53	35,55	47,05
<i>b</i>	NH ₃ ⁺ (I1)	CO (S13)	0,45	0,05	0,48	0,13	0	0
<i>e</i>	NH (N2)	COH (S13)	58,42	56,25	57,63	74,28	85,58	83,3
<i>f</i>	NH (N2)	CO (S13)	30,38	15,3	8,58	1,20	0	1,28
<i>h</i>	NH ₃ ⁺ (K5)	CO (K12)	1,90	4,10	5,03	3,68	2,53	2,55

¹ Ligações de hidrogênio inter-cadeias mostradas na Figura 5, p. 23; ² Cadeia B; ³ Cadeia A.

Estes dados evidenciam que a estrutura dimérica, na primeira parte da simulação (0 a 10 ns), é estabilizada pelo conjunto de interações que mantém as ligações de hidrogênio envolvidos com o grupo NH da asparagina 2 de cada cadeia. Nesse intervalo de tempo esse grupo está mais de 80% do tempo formando ligação de hidrogênio com o grupo CO ou COH (cadeia lateral) da serina 13 da outra cadeia. Com a evolução do sistema constata-se que as duas ligações nas quais está envolvida a asparagina 2 da cadeia A são perdidas em função da desestruturação dessa extremidade do dímero (tratada neste trabalho como o C-terminal da cadeia B). Ao mesmo tempo, as ligações que envolvem a asparagina 2 da cadeia B apresentam um comportamento diferente, enquanto a ligação *f* cai de 30,38% do tempo para

1,28%, a ligação *e* cresce de 58,42% para 83,3%. Isto acontece porque conforme a cadeia B se desestrutura, ela se movimenta de modo a desviar da disposição antiparalela entre os peptídeos, provocando uma maior aproximação dos grupos envolvidos nessa ligação. Mesmo com a desestruturação do C-terminal da cadeia A, esses grupos permaneceram próximos permitindo a formação da ligação de hidrogênio.

A ligação *g*, como mostrada pela Tabela 2, ocorre com maior frequência a partir dos 30 ns, isso também é efeito da desestruturação observada no C-terminal da cadeia B, que provocou a aproximação entre os grupos envolvidos nessa ligação.

Considerando a simetria evidenciada pela Tabela 2 é no mínimo curioso compreender porque é o C-terminal da cadeia B que se desestrutura primeiro.

Como parte significativa das interações envolvidas nas ligações de hidrogênio é de natureza eletrostática, procedemos à análise da contribuição coulombiana envolvida nas interações dos grupos polares que tomam parte nas ligações indicadas.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios das energias de interações de Coulomb entre grupos polares das cadeias A e B envolvidos nas ligações de hidrogênio inter-cadeias nos intervalos temporais correspondentes.

Tabela 3. Valores médios das energias de interações de Coulomb entre grupos polares da cadeia B e grupos polares da cadeia A envolvidos em ligações de hidrogênio inter-cadeias. Os valores foram calculados em intervalos de 5 e 10 ns.

Ligações ¹	0-5 ns	5-10 ns	10-20 ns	20-30 ns	30-40 ns	40-50 ns
	kJ mol ⁻¹					
<i>a</i>	-14,16	-1,67	-3,39	-0,54	-0,40	-0,04
<i>c</i>	-3,82	-0,13	-2,84	0,03	-0,25	-0,27
<i>d</i>	-11,55	-13,56	-1,93	-1,23	-0,03	-0,03
<i>g</i>	-12,19	-11,70	-10,16	-2,55	-28,24	-29,88
<i>b</i>	-13,50	-9,45	-4,13	-1,75	-0,38	-1,00
<i>e</i>	-11,94	-11,00	-9,50	-12,65	-13,82	-13,77
<i>f</i>	-3,87	-1,81	-1,23	-0,15	0,04	-0,11
<i>h</i>	-12,66	-13,22	-15,04	-14,47	-12,48	-12,42

¹ Ligações de hidrogênio inter-cadeias mostradas na Figura 5, p. 23.

Algumas análises são possíveis da observação dessa tabela e também da Tabela 2. Avaliadas individualmente há uma clara correlação entre o percentual de existência das pontes com a energia eletrostática dos grupos nelas envolvidas. Porém, uma energia alta (em valor absoluto) não implica, necessariamente e de forma direta, em um percentual maior de permanência da ligação. Por exemplo, a ligação *c*, no intervalo de 0 a 5 ns, está formada 30% do tempo e tem uma energia média de, aproximadamente, 4,0 kJ mol⁻¹, enquanto a ligação *h*,

nesse mesmo intervalo, está formada somente, cerca de 2% do tempo, mas tem energia média de, aproximadamente, -13 kJ mol^{-1} .

A razão é que a ligação de hidrogênio não é puramente eletrostática, está relacionada também a direcionalidade dos grupos envolvidos (D-H...A), além disso, na tabela acima, apresentamos a interação coulombiana entre os grupos polares diretamente envolvidos na ligação, deixando de analisar a contribuição de outros átomos ou grupos aos quais eles estão ligados.

Como consequência da aproximação entre os grupos polares envolvidos na ligação de hidrogênio *g*, observamos a maior frequência na sua formação, além disso, podemos notar agora, que também ocorreu o aumento na energia de interação entre eles.

Do ponto de vista eletrostático, limitando-nos as interações entre os grupos destacados, o efeito conjunto deles evidencia que a estabilização da estrutura inicial é proporcionada pela interação entre estes grupos, pois as contribuições negativas (favoráveis) superam as positivas (repulsivas).

Para entendermos melhor isso e a rede de interações analisadas, construímos uma representação esquemática do perfil eletrostático das interações entre os peptídeos (Figura 7). Neste perfil consideramos apenas as interações não desprezíveis, ou seja, aquelas maiores que $|1| \text{ kJ mol}^{-1}$. Os valores correspondem às médias energéticas obtidas em cada intervalo de tempo, conforme mostramos nas Tabelas 1 e 3.

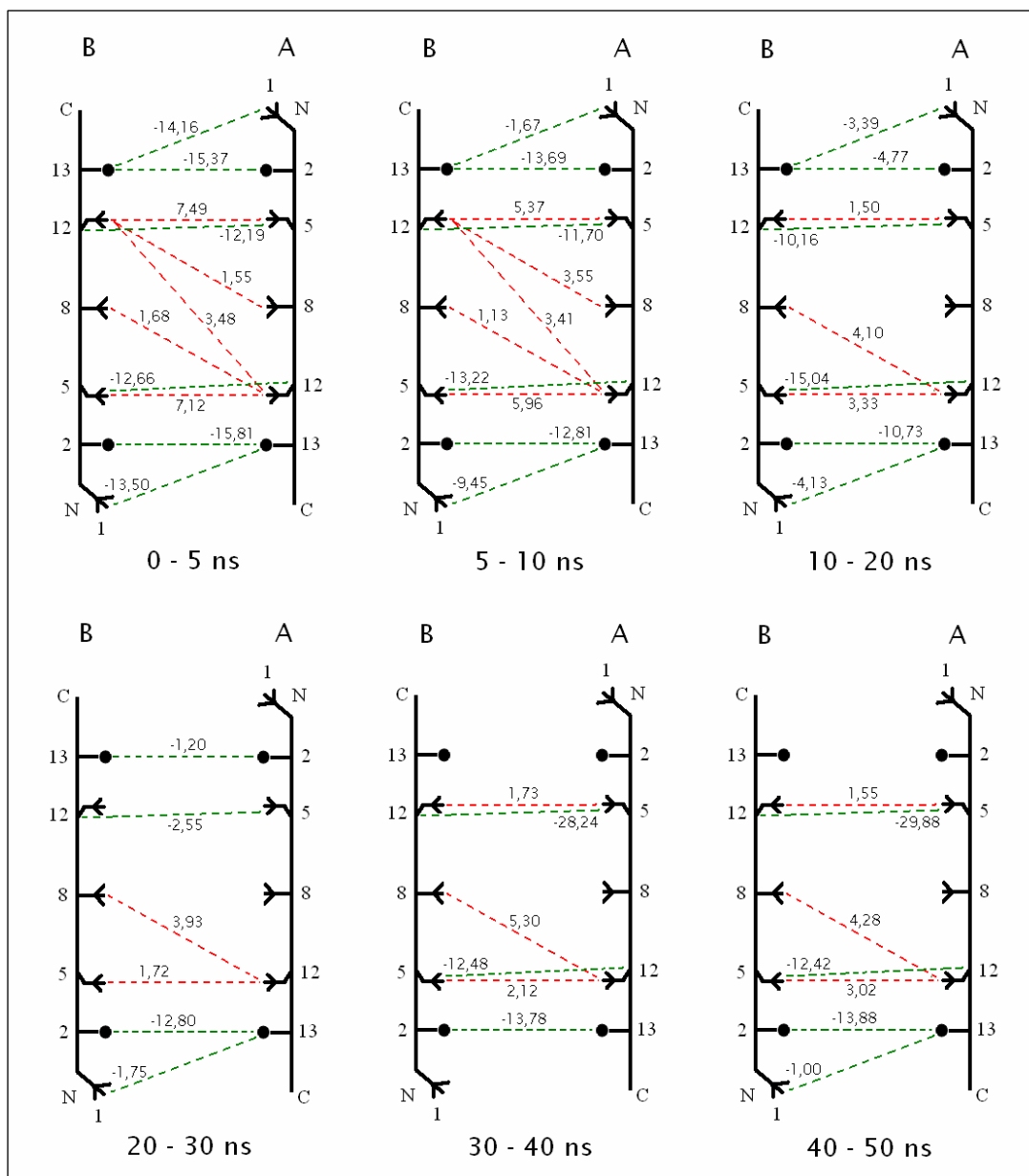


Figura 7. Representação esquemática do perfil eletrostático das interações entre os peptídeos. Nela estão representados os valores médios apresentados nas Tabelas 1 e 3, considerando apenas os valores maiores que 1 kJ mol^{-1} . As linhas tracejadas vermelhas referem-se às interações repulsivas entre grupos NH_3^+ das lisinas, e as linhas verdes referem-se às interações atrativas entre grupos polares ou carregados da cadeia B e grupos polares ou carregados da cadeia A. 1, 2, 5, 8, 12, 13, representam o N-terminal, asparagina 2, lisina 5, lisina 8, lisina 12, serina 13, respectivamente, para ambas as cadeias.

Observa-se, no intervalo de 0 a 5 ns, que as energias das interações atrativas na região do C-terminal da cadeia B, superam as interações repulsivas em $21,98 \text{ kJ mol}^{-1}$. Na outra extremidade, ainda neste intervalo, observamos que as energias das interações atrativas superam as repulsivas em $27,33 \text{ kJ mol}^{-1}$.

No intervalo de 5 a 10 ns, observamos que as energias das interações atrativas superam as repulsivas em $14,73 \text{ kJ mol}^{-1}$, para a região do C-terminal da cadeia B. Neste

período constatamos a desestruturação dos resíduos dessa região. Para o N-terminal, observamos a superação em $24,98 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Estendendo essa análise aos outros três intervalos, verificamos, também, que as interações atrativas superam as repulsivas em ambas as extremidades em todos os intervalos.

Além da análise das interações de grupos específicos das cadeias que compõem o dímero, fizemos análises globais sobre as interações eletrostáticas.

Na Figura 8 estão apresentados os gráficos de energia como função do tempo. Neles efetuamos o ajuste linear sobre todo o período de simulação para obtermos a variação global do sistema.

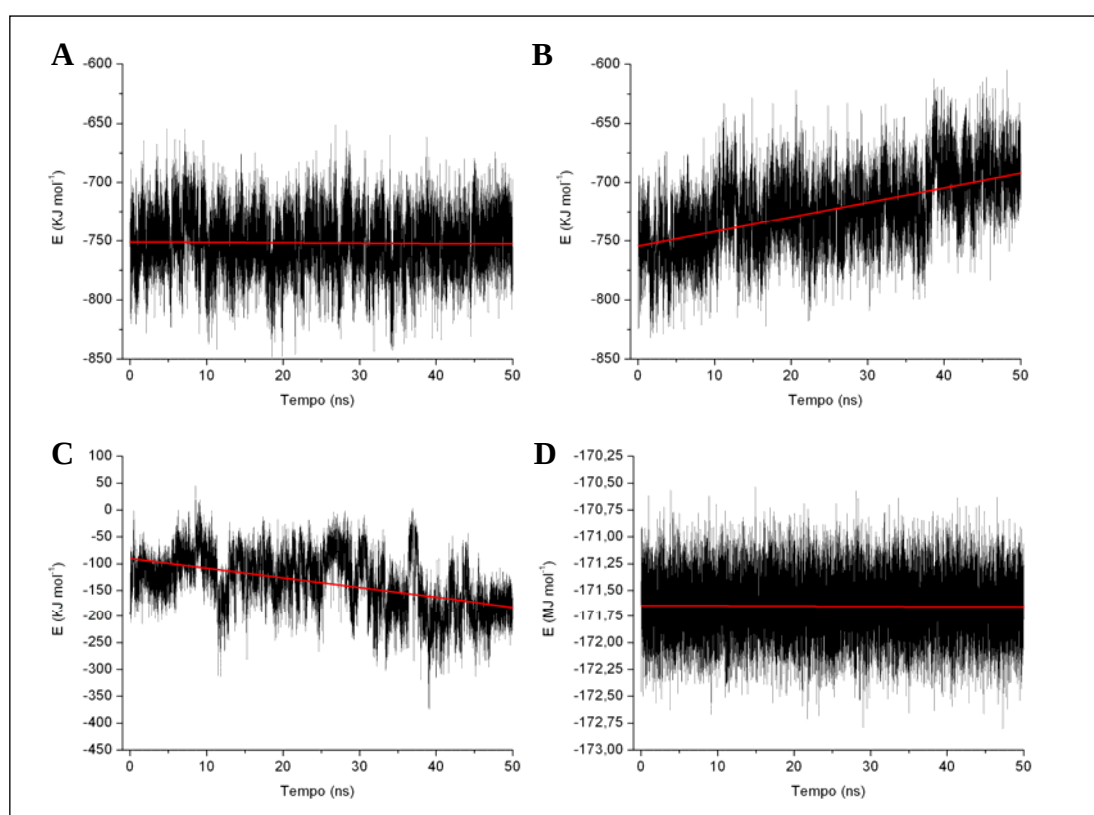


Figura 8. Gráficos de energia como função do tempo. **A)** energia coulombiana da cadeia A; **B)** energia coulombiana da cadeia B; **C)** energia coulombiana da interação entre as cadeias A e B; **D)** energia potencial total. Linha vermelha: ajuste linear sobre todo o período.

Analisando o gráfico da energia coulombiana da cadeia A e considerando o ajuste linear, verificamos que a variação global de energia é muito pequena diante da ordem de grandeza que a energia toma durante o tempo e sua dispersão de $\pm 50 \text{ kJ mol}^{-1}$. As variações da energia ao longo do tempo são efeitos das mudanças conformacionais que o peptídeo sofre, devido sua interação com a outra cadeia e o solvente. Entretanto, observando os últimos 5 ns, podemos notar a ascendência da curva. Isto indica que conforme ocorre à desestruturação do

C-terminal dessa cadeia neste intervalo de tempo, observamos simultaneamente, o decréscimo na energia de interação coulombiana entre os átomos da cadeia A.

Avaliando o gráfico correspondente a energia de interação coulombiana da cadeia B, verificamos que esta cadeia fica menos estável em 62 kJ mol^{-1} . Esta variação de energia deve-se a desestruturação, a perda das ligações entre os grupos polares e as flutuações conformacionais pertinentes a estrutura. Podemos notar do gráfico que a energia aumenta entre 5 e 10 ns, período em que se inicia a desestruturação dessa cadeia. A energia fica estável até 40 ns, quando a partir daí, outro resíduo saiu da conformação helicoidal e observamos outro aumento na energia de interações entre os átomos da cadeia B.

A partir do gráfico da energia de interação coulombiana entre as cadeias A e B, verificamos que durante o tempo a energia de interação eletrostática toma valores negativos, provando que a interação dominante entre os peptídeos é atrativa, uma vez que aqui temos somadas as contribuições de todos os átomos, não somente de grupos específicos. A variação global de energia eletrostática do dímero é de -89 kJ mol^{-1} .

A energia potencial total do sistema, por outro lado, tem uma variação muito pequena diante da ordem de grandeza que a energia toma durante o tempo e sua dispersão de $\pm 600 \text{ kJ mol}^{-1}$.

4.2.2 Perfil de solvatação

Esse perfil de solvatação está relacionado ao número de moléculas de água vizinhas aos grupos de interesse e será realizado por meio da integração (RIN, *Run integration number*) da função de distribuição radial de pares centrada em um dos grupos polares (NH ou CO) envolvidos em uma dada ligação de hidrogênio ou centrada sobre o carbono mais externo de grupos laterais apolares.

Nas Figuras 9 e 10 estão apresentados os gráficos de existência de ligação de hidrogênio do tipo $i-i+4$, típica de hélice- α em proteínas, entre os grupos polares CO (i)-NH ($i+4$) e o respectivo perfil de solvatação centrado em um dos grupos do par (considerando-se uma esfera de 0,4 nm) envolvidos na respectiva ligação de hidrogênio como função do tempo. As ligações mostradas estão entre os resíduos: 6-10, 7-11, 8-12, 9-13, 10-14, para o C-terminal da cadeia B (Figura 9) e o C-terminal da cadeia A (Figura 10). Deve-se lembrar que esse tipo de gráfico mede a existência, (1), se no instante testado as condições para a formação da ligação de hidrogênio são satisfeitas ou a inexistência, (0), em caso contrário. Portanto, quando ele se mostra todo pintado significa que as ligações se fazem e

desfazem em uma dinâmica relativamente rápida (o tempo entre duas observações é de 2,5 ps).

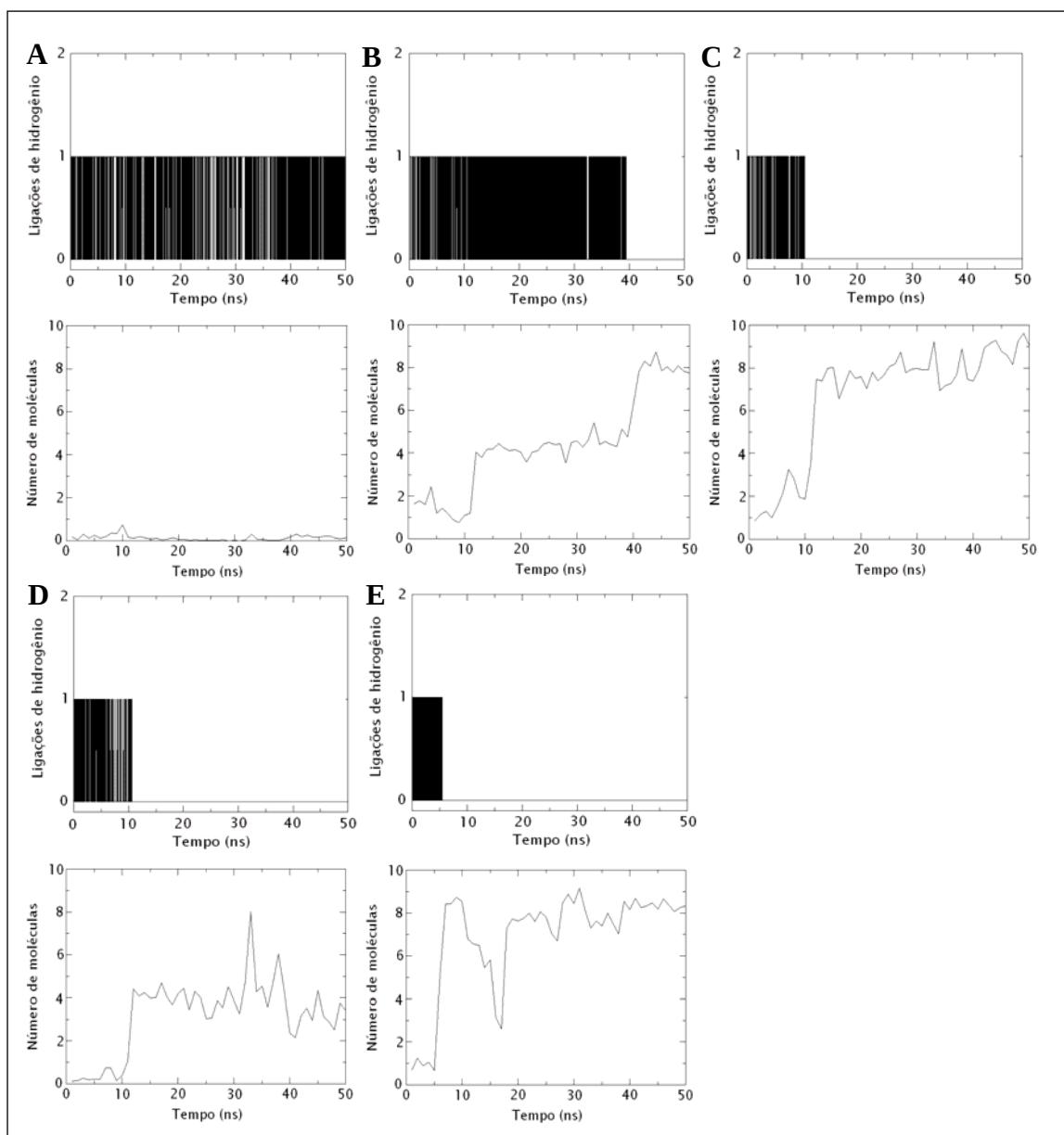


Figura 9. Análise da solvatação das ligações de hidrogênio da cadeia principal pertencentes a região do C-terminal da cadeia B. A análise é baseada no estudo dos gráficos da existência de ligação de hidrogênio como função do tempo e do número de moléculas de água ao redor dos grupos polares envolvidos na respectiva ligação em um raio de 0,4 nm como função do tempo. **A)** resíduos 6-10; **B)** 7-11; **C)** 8-12; **D)** 9-13; **E)** 10-14.

Da Figura 9 observa-se que a ligação entre os resíduos 10-14 quebra-se após 5 ns, entre os resíduos 9-13 e 8-12 após 10 ns e entre os resíduos 7-11 após 40 ns. Simultaneamente a essas quebras ocorre um aumento significativo no número de moléculas de água ao redor dos grupos polares que participam dessas ligações.

Como estes grupos formam ligações de hidrogênio com a água, usualmente se interpreta a competição entre os grupos polares e a água como um fator de instabilidade para as ligações de hidrogênio intra-cadeia e um fator desestruante para a estrutura secundária em forma de hélice- α . De fato, como apontado anteriormente, a partir de 10 ns ocorre a desestruturação do C-terminal da cadeia B.

As ligações 2-6, 3-7, 4-8 e 5-9, também foram avaliadas e observamos que elas estavam formadas com alta frequência durante todo o período (mais de 55% do tempo) e o número de moléculas de água ao redor dos seus respectivos grupos polares não alcançou 3 moléculas em média durante toda a simulação.

Considerando o centro de massa dos dois grupos polares da ligação de hidrogênio CO (Lys 8)-NH (Lys 12) da cadeia B (Figura 9 C), calculamos o percentual de tempo por intervalo que esses grupos formaram ligações de hidrogênio com o solvente (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de tempo que os grupos polares da ligação 9-13 da cadeia B mantém ligações de hidrogênio com o solvente, calculados em intervalos de 5 e 10 ns.

Nº. de ligações	0-5 ns	5-10 ns	10-20 ns	20-30 ns
	%			
1	9,80	25,75	79,55	87,10
2	0,15	1,50	34,40	43,16
3	0	0	4,85	5,57

Verificamos que no intervalo de 5 a 10 ns, intervalo que o dímero começa a se desestruturar pelo C-terminal da cadeia B, durante 25,75% do tempo ocorreu uma ligação de hidrogênio entre os grupos polares e o solvente, e somente em 1,5% do tempo que ocorre uma ligação ocorreu simultaneamente a 2ª ligação. Entretanto, o percentual de tempo que ocorreu pelo menos uma ligação é 2,5 vezes maior que no 1º intervalo, de 0 a 5 ns. A partir dos 10 até 20 ns, o percentual de tempo de existência de uma ligação aumentou para 79,55% (percentual 3 vezes maior que no intervalo anterior) e o percentual de tempo que ocorria 2 ligações simultaneamente aumentou para 34,4%. Neste intervalo, em 4,85% do tempo que ocorreram 2 ligações ao mesmo tempo, também ocorreu uma 3ª ligação. No 4º intervalo, de 20 a 30 ns, constatamos que a ocorrência de uma ligação é um comportamento muito estável (87,1% do tempo), ocorrendo duas ligações simultaneamente em quase metade deste tempo.

Estes dados confirmam (para o caso da ligação de hidrogênio 8-12 e para as outras que também foram perdidas) que ao mesmo tempo em que verificamos a desestruturação da

cadeia principal, efeito da instabilidade da ligação de hidrogênio, ocorriam com frequência cada vez maior ligações entre os grupos polares e as moléculas de água.

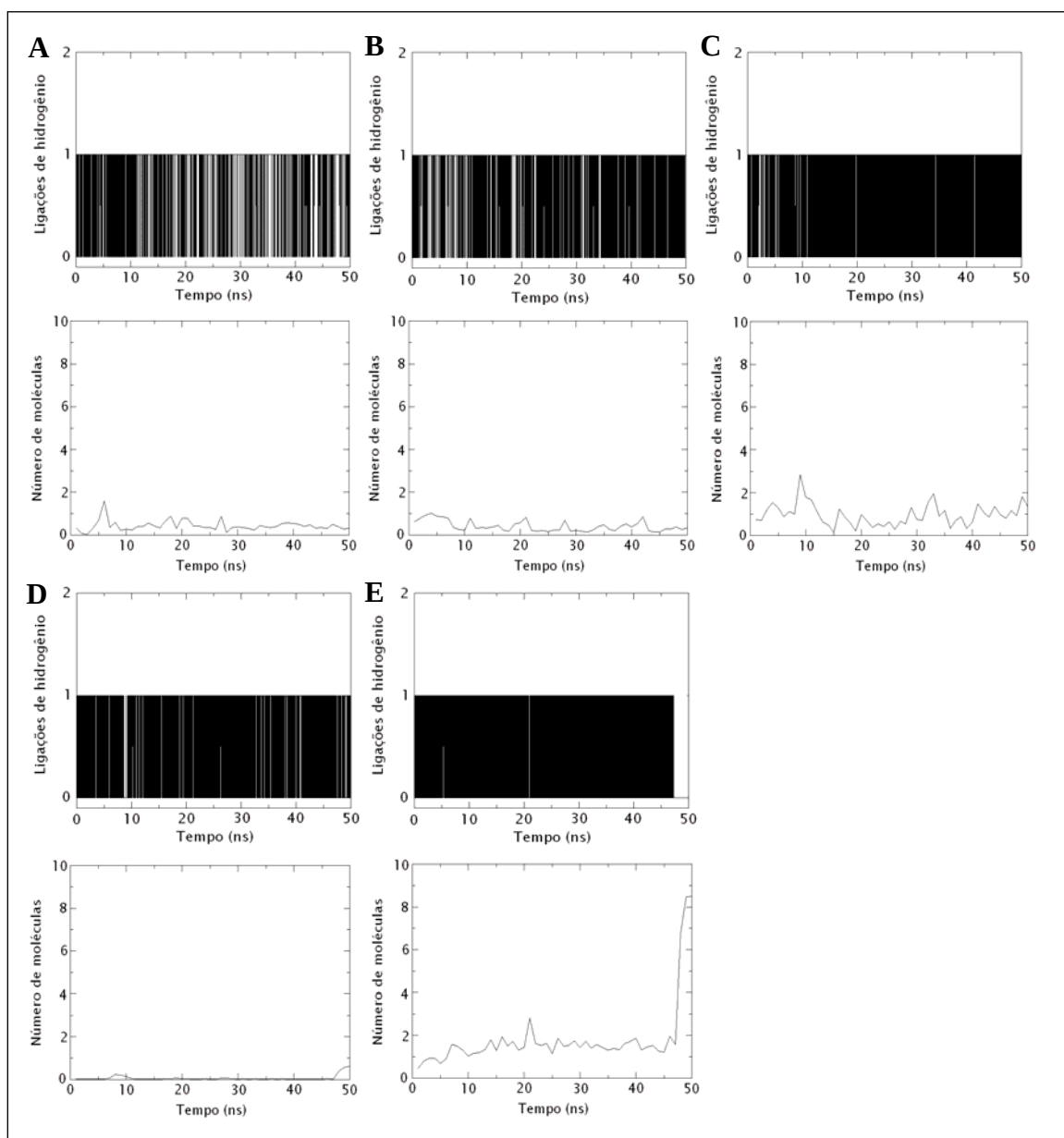


Figura 10. Análise da solvatação das ligações de hidrogênio da cadeia principal pertencentes a região do C-terminal da cadeia A. A análise é baseada no estudo dos gráficos da existência de ligação de hidrogênio como função do tempo e do número de moléculas de água ao redor dos grupos polares envolvidos na respectiva ligação em um raio de 0,4 nm como função do tempo. **A)** resíduos 6-10; **B)** 7-11; **C)** 8-12; **D)** 9-13; **E)** 10-14.

Da Figura 10 observa-se que a ligação entre os resíduos 10-14 quebra-se após 47 ns. Simultaneamente a essa quebra ocorre um aumento significativo no número de moléculas de água ao redor dos grupos polares que participam dessa ligação. Nota-se, também, que há um aumento discreto no número de moléculas de água na ligação de hidrogênio dos resíduos 8-12

e que essa ligação apresenta uma grande intermitência a partir dos 15 ns, quando ocorre o aumento no número de moléculas de água.

As ligações 2-6, 3-7, 4-8 e 5-9 dessa mesma cadeia, também foram avaliadas e observamos que elas se formavam durante todo o período de simulação e o número de moléculas de água ao redor dos seus respectivos grupos polares não ultrapassou 2 moléculas durante toda a simulação.

Para avaliarmos o efeito da desestruturação sobre a solvatação dos grupos laterais, verificamos o número de moléculas de água, em um raio de 0,5 nm, ao redor dos grupos mais externos das cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos da cadeia B (Figura 11) e da cadeia A (Figura 12).

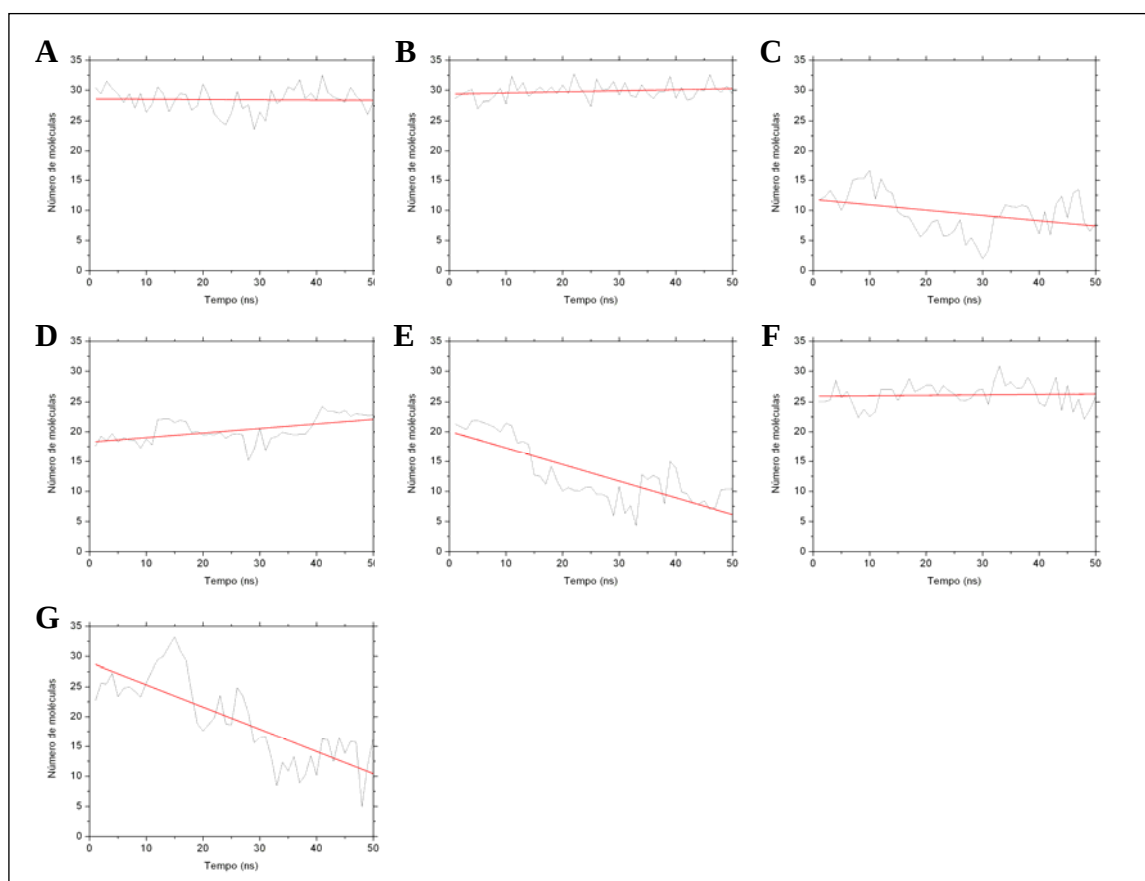


Figura 11. Análise da solvatação das cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos da cadeia B. A análise é baseada no estudo dos gráficos do número de moléculas de água ao redor do carbono mais externo das cadeias laterais como função do tempo, em um raio de 0,5 nm. **A)** Leucina 3; **B)** Leucina 4; **C)** Isoleucina 6; **D)** Alanina 7; **E)** Isoleucina 10; **F)** Isoleucina 11; **G)** Leucina 14.

Os dados da Figura 11 mostram um decréscimo significativo (em média maior do que 10) no número de moléculas de água ao redor da isoleucina 10 e leucina 14. Para a isoleucina 6 há também um decréscimo, embora mais discreto (aproximadamente 5), enquanto para a

alanina 7 há um acréscimo nesse número de moléculas da ordem de 2 moléculas. Para os demais grupos avaliados esse número, na média, mostra-se inalterado.

Leucina e isoleucina têm cadeias laterais relativamente longas e compostas por grupos apolares, que não interagem favoravelmente com a água. Estas perdem liberdade translacional, pois devem compor uma cavidade capaz de abrigar os grupos com as quais interagem muito fracamente. Essa perda entrópica, que é essência do efeito hidrofóbico, induz tais grupos a “esconderem-se” das moléculas de água. A respeito disso, a tendência de queda no número de moléculas de água ao redor de cadeias laterais hidrofóbicas induz a interpretação de que as mudanças conformacionais ocorridas conduzem as, ou são conduzidas pelas, alterações de solvatação dos grupos hidrofóbicos.

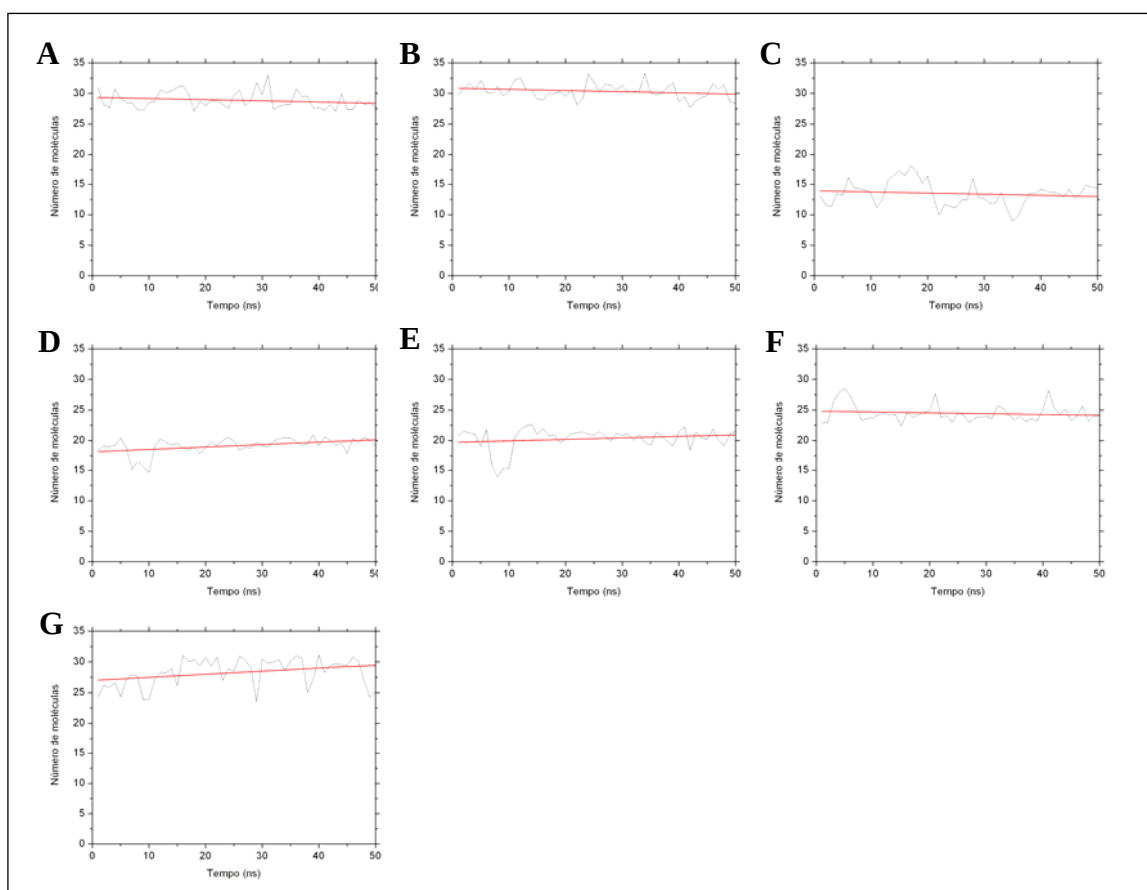


Figura 12. Análise da solvatação das cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos da cadeia A. A análise é baseada no estudo dos gráficos do número de moléculas de água ao redor do carbono mais externo das cadeias laterais como função do tempo, em um raio de 0,5 nm. **A)** Leucina 3; **B)** Leucina 4; **C)** Isoleucina 6; **D)** Alanina 7; **E)** Isoleucina 10; **F)** Isoleucina 11; **G)** Leucina 14.

Verifica-se da Figura 12, que para todos os grupos hidrofóbicos das cadeias laterais da cadeia A ocorre uma variação discreta no número de moléculas de água no raio avaliado, reflexo da estabilidade da cadeia até os 47 ns de simulação.

Na Figura 13 estão ilustradas seis passagens conformacionais do dímero em intervalos de 10 ns, desde o instante inicial até 50 ns, ilustrando a dinâmica do mesmo. Vê-se que simultaneamente as desestruturações relatadas, e principalmente devido a elas, a partir de 20 ns (Figura 13 III) a disposição antiparalela das hélices começa a se perder e a evolução no tempo só faz crescer essa separação. Isso pode ser relacionado às variações nos momentos de macro-dipolo que diminuem de intensidade com a desestruturação das hélices e ao efeito hidrofóbico que induz a esconder do solvente (água) os grupos laterais hidrofóbicos. A continuação dessa dinâmica (de 50 até 60 ns, não exposta neste trabalho) mostra a continuação desse processo, tanto no aspecto da desestruturação dos peptídeos, como do seu afastamento da disposição antiparalela inicial.

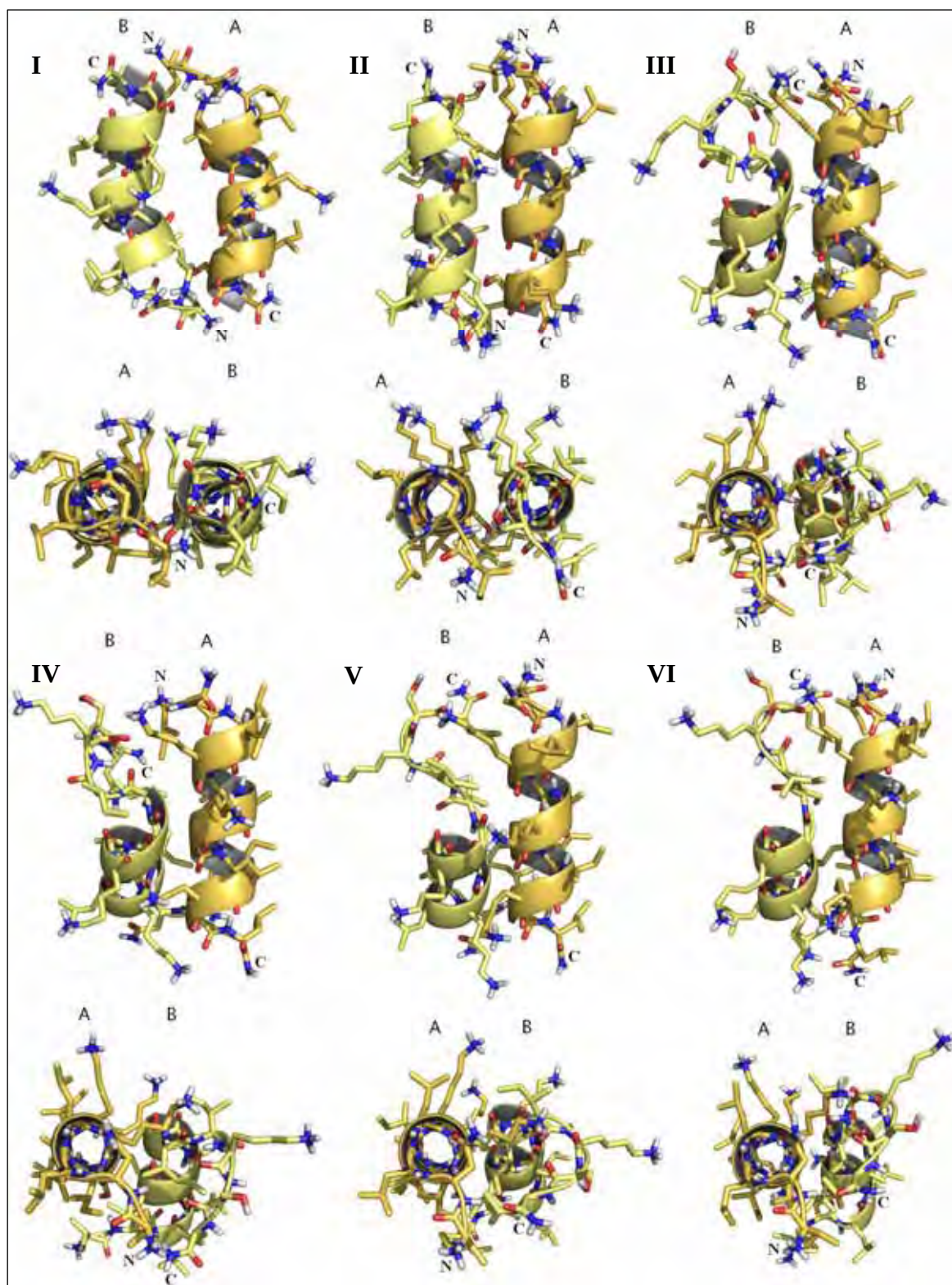


Figura 13. Representações das mudanças conformacionais do dímero em água apresentadas em intervalos de 10 ns e suas respectivas visões no eixo da hélice B. **I)** dímero no estado inicial da simulação, apresentando estrutura anfipática; **II)** após 10 ns; **III)** 20 ns, observa-se a desestruturação do C-terminal da cadeia B e o desvio da disposição antiparalela; **IV)** 30 ns, **V)** 40 ns; **VI)** 50 ns.

4.3 Dímero em mistura TFE-água

Os resultados da simulação do dímero de EMP-AF em mistura TFE-água mostram que não houve desestruturações nos peptídeos, exceto por pequenas perturbações passageiras nos terminais. Na Figura 14 estão mostrados os padrões de estrutura secundária por resíduo como função do tempo de simulação. Dele observa-se que durante todo o período observado os peptídeos permaneceram em conformação helicoidal.

Verificamos as 18 ligações de hidrogênio das cadeias principais (9 ligações de cada cadeia) e constatamos que elas estavam formadas com alta frequência (mais de 55% do tempo) durante todo o período de simulação observado.

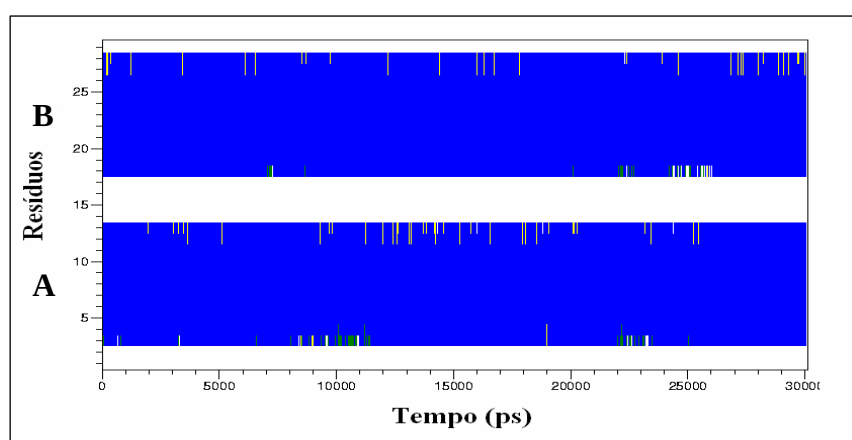


Figura 14. Padrões de estrutura secundária por resíduo como função do tempo de simulação. **A)** cadeia A; **B)** cadeia B. Em branco, resíduos em *random coil*; verde, resíduos em curvas; amarelo, resíduos em voltas; azul, resíduos em hélice- α . Pela predominância da cor azul constata-se a estabilidade da estrutura helicoidal para as duas cadeias.

Considerando que neste ambiente reproduzido pela mistura TFE-água, observamos a estabilidade da estrutura dimérica, fizemos uma análise das interações eletrostáticas inter-cadeias e a análise do perfil de solvatação sobre os grupos polares da cadeia principal e os grupos mais externos das cadeias laterais hidrofóbicas, buscando compreender as razões para a estabilidade observada.

4.3.1 Perfil eletrostático

Realizamos as análises eletrostáticas para o dímero em mistura TFE-água da mesma maneira que realizamos para o dímero em água. Dividimo-nas em efeito repulsivo entre grupos carregados positivamente de cadeias distintas, efeito atrativo entre grupos polares que participam das ligações de hidrogênio inter-cadeias e, por fim, efeito global das interações eletrostáticas.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios das energias das interações de Coulomb entre grupos NH_3^+ de cadeias distintas. As médias foram tomadas em intervalos de 10 ns.

Tabela 5. Valores médios das energias de interações de Coulomb entre grupos NH_3^+ das lisinas e N-terminal da cadeia B e grupos NH_3^+ das lisinas e N-terminal da cadeia A, calculados em intervalos de 5 e 10 ns.

B ¹	A ²	0-10 ns	10-20 ns	20-30 ns
kJ mol ⁻¹				
5	12	11,12	11,62	10,54
8	12	4,00	3,31	2,66
12	12	0,38	0,59	0,41
5	8	0,11	0,10	0,02
8	8	0,18	0,13	0,04
12	8	1,67	1,81	1,43
5	5	---	---	---
8	5	0,06	0,04	0,11
12	5	12,24	11,35	9,14
1	12	---	---	---
12	1	---	---	---

¹ Cadeia B; ² Cadeia A; 5, 8, 12, 1, referem-se as cargas das lisinas 5, 8 e 12 e a carga do N-terminal.
---: energias menores que 10^{-2} kJ mol⁻¹.

Observa-se que, com a evolução do sistema, a intensidade da repulsão entre estes grupos varia pouco. Além disso, observa-se que estas interações estão mais intensas se comparadas às mesmas interações da simulação do dímero em água (em relação aos primeiros 10 ns, intervalo em que o dímero em água ainda estava estruturado), apresentadas na Tabela 1, p. 23. Uma possível racionalização para isso envolve dois aspectos. O primeiro, refletindo a estabilidade conformacional, revela uma dinâmica de movimentos mais suaves, próximos a uma estrutura em equilíbrio e, o segundo, devido ao fato que a mistura TFE-água reproduz um ambiente de constante dielétrica de, aproximadamente, 60, que é menor que a constante da água, cerca de 80, permitindo interações mais intensas entre os grupos carregados e grupos polares.

Por outro lado temos que avaliar as interações favoráveis, aquelas envolvidas nas ligações de hidrogênio inter-cadeias, afinal, da mesma forma que as interações repulsivas apresentam energias de mesma intensidade durante todo o período observado, as energias das interações atrativas devem estar também, e elas estão relaxando as tensões.

Na Tabela 6 estão dispostos os percentuais de tempo para cada intervalo em que as ligações de hidrogênio entre os grupos polares da cadeia B e A estão formados.

Tabela 6. Percentual de tempo que estão formadas ligações de hidrogênio entre grupos polares da cadeia B e grupos polares da cadeia A, calculados em intervalos de 10 ns.

Ligações ¹	B ²	A ³	0-10 ns	10-20 ns	20-30 ns
			%		
<i>a</i>	CO (S13)	NH (I1)	0,60	0,33	0,35
<i>c</i>	CO (S13)	NH (N2)	34,82	25,55	21,03
<i>d</i>	COH (S13)	NH (N2)	40,59	59,10	53,78
<i>g</i>	CO (K12)	NH ₃ ⁺ (K5)	2,80	3,33	7,00
<i>b</i>	NH (I1)	CO (S13)	0,20	3,30	1,45
<i>e</i>	NH (N2)	COH (S13)	39,17	79,48	51,65
<i>f</i>	NH (N2)	CO (S13)	43,24	11,30	23,43
<i>h</i>	NH ₃ ⁺ (K5)	CO (K12)	2,62	6,35	4,70

¹ Ligações de hidrogênio inter-cadeias mostradas na Figura 5, p.23; ² Cadeia B; ³ Cadeia A.

Para as ligações *d* e *e*, que são ligações entre a asparagina de uma cadeia com a serina da outra (são ligações simétricas), verificamos um comportamento semelhante. Ambas têm um percentual de existência de aproximadamente 40% do tempo no intervalo de 0 a 10 ns e variam até ficarem em média 52% do tempo formadas no intervalo de 20 a 30 ns. Ao mesmo tempo, as ligações *c* e *f*, que também são simétricas, apresentam nos últimos 10 ns de simulação, aproximadamente 22% de tempo de existência. Uma vez que em mistura TFE-água as ligações das extremidades estão estáveis, ou seja, se formam com alta frequência durante a simulação, enquanto que na simulação em água elas não estão, podemos correlacionar esses resultados de forma que do ponto de vista fenomenológico esses eventos são efeito de solvente, indicando uma contribuição marginal delas para a estabilidade do dímero.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores médios das energias de interações de Coulomb entre grupos polares das cadeias A e B envolvidos nas ligações de hidrogênio inter-cadeias, indicadas na Tabela 6, nos intervalos temporais correspondentes.

Tabela 7. Valores médios das energias de interações de Coulomb entre grupos polares da cadeia B e grupos polares da cadeia A envolvidos em ligações de hidrogênio inter-cadeias. Os valores foram calculados em intervalos de 10 ns.

Ligações ¹	0-10 ns	10-20 ns	20-30 ns
	kJ mol ⁻¹		
<i>a</i>	-7,20	-15,36	-11,15
<i>c</i>	-5,00	-3,24	-2,99
<i>d</i>	-7,87	-11,54	-10,80
<i>g</i>	-12,57	-12,99	-15,94
<i>b</i>	-14,36	-16,34	-16,20
<i>e</i>	-8,00	-14,75	-9,76
<i>f</i>	-5,57	-1,05	-3,38
<i>h</i>	-12,13	-13,43	-15,58

¹ Ligações de hidrogênio inter-cadeias mostradas na Figura 5, p. 23.

Da análise conjunta das Tabelas 6 e 7 notamos que, uma grande energia negativa, não implica, necessariamente, em um percentual grande de existência da ligação de hidrogênio. Tome-se como exemplo, a energia coulombiana dos grupos envolvidos na ligação *h* que é menor que -12,1 kJ mol⁻¹ ao longo de toda a simulação, enquanto a ligação é considerada formada em menos de 6% de tempo. A ligação *e*, por outro lado, é considerada formada em mais do que 40% de tempo de simulação, enquanto a energia de interação coulombiana entre os grupos envolvidos é da mesma ordem. A razão para isso, como aventado anteriormente, é a direcionalidade das ligações de hidrogênio, ou seja, uma distância pequena entre doador e aceitador não implica por si só na existência da ligação, há uma dependência na posição do hidrogênio. Se o ângulo A-H...D for menor do que 120° a ligação não é considerada formada.

Verifica-se, ainda, que a evolução temporal do sistema não produz variações drásticas nas energias eletrostáticas destes grupos e quando a fazem de modo mais significativo é no sentido de estabilizar (tornar mais negativa) a interação. Essas interações minimizam as tensões causadas pelas interações dos grupos carregados positivamente e, do ponto de vista eletrostático, promovem a estabilidade da estrutura dimérica, pois as contribuições negativas superam as contribuições positivas.

Para entendermos melhor isso e a rede de interações analisadas, construímos uma representação esquemática do perfil eletrostático das interações entre os peptídeos (Figura 15). Neste perfil consideramos apenas as interações não desprezíveis, ou seja, aquelas que, em módulo, são maiores que 1 kJ mol⁻¹. Os valores correspondem às médias energéticas obtidas em cada intervalo de tempo, conforme mostramos nas Tabelas 5 e 7.

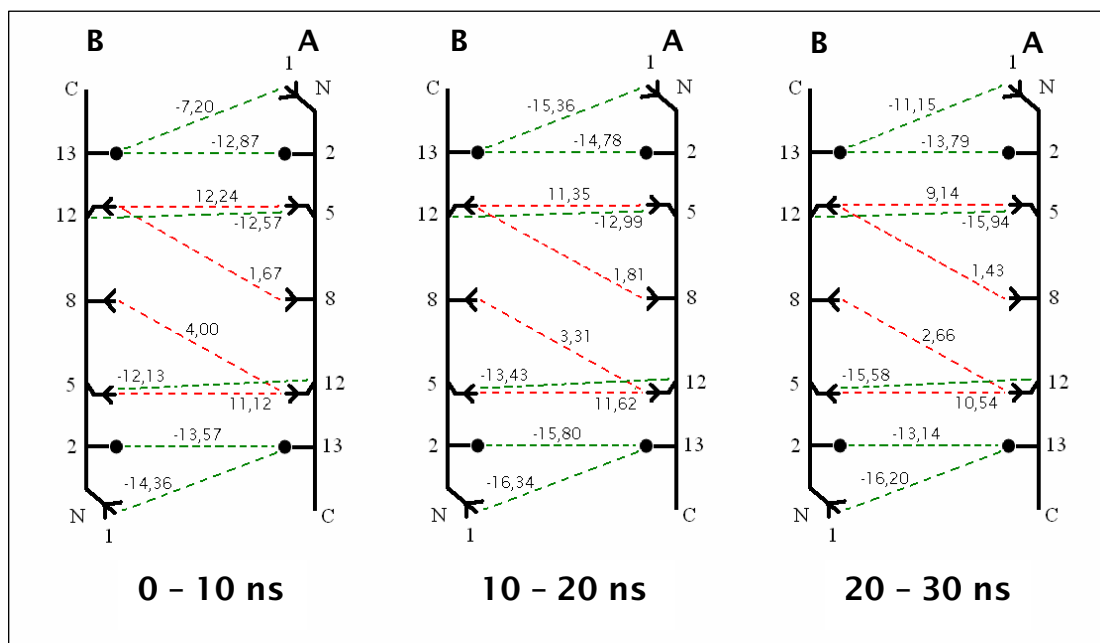


Figura 15. Representação esquemática do perfil eletrostático das interações entre os peptídeos. Nela estão representados os valores médios apresentados nas Tabelas 5 e 7, considerando apenas os valores que, em módulo, são maiores que 1 kJ mol^{-1} . As linhas tracejadas vermelhas referem-se às interações repulsivas entre grupos NH_3^+ das lisinas, e as linhas verdes referem-se às interações atrativas entre grupos polares ou carregados da cadeia B e grupos polares ou carregados da cadeia A. 1, 2, 5, 8, 12, 13, representam o N-terminal, asparagina 2, lisina 5, lisina 8, lisina 12, serina 13, respectivamente, para ambas as cadeias.

Observa-se que as interações não variam significativamente ao longo da simulação. Além disso, se avaliarmos as interações por terminais, constata-se que no 1º intervalo, de 0 a 10 ns, a interação atrativa é dominante, pois supera a repulsiva em $18,73 \text{ kJ mol}^{-1}$ para o C-terminal da cadeia B e em $24,94 \text{ kJ mol}^{-1}$ para o N-terminal. No 2º intervalo, constata-se que a soma das energias de interações atrativas superam as repulsivas em $29,97 \text{ kJ mol}^{-1}$ para o C-terminal (cadeia B) e em $30,64 \text{ kJ mol}^{-1}$ para o N-terminal e, finalmente, para o último intervalo, temos que a soma das interações atrativas superam as repulsivas em $30,31 \text{ kJ mol}^{-1}$ no C-terminal e $31,72 \text{ kJ mol}^{-1}$ no N-terminal.

Estes resultados indicam que os grupos polares e carregados criam uma rede de interações promovendo uma situação eletrostaticamente favorável, mas como aventado anteriormente, a estabilidade se deve, principalmente, a um efeito de solvente, cujo ambiente reproduzido por ele preserva as ligações de hidrogênio intra e inter-cadeias.

Na Figura 16 estão apresentados os gráficos de energias eletrostáticas internas as cadeias A, B e entre as cadeias A e B e a energia potencial total do sistema como funções do tempo. Neles efetuamos o ajuste linear sobre todo o período de simulação para obtermos a tendência média das suas variações.

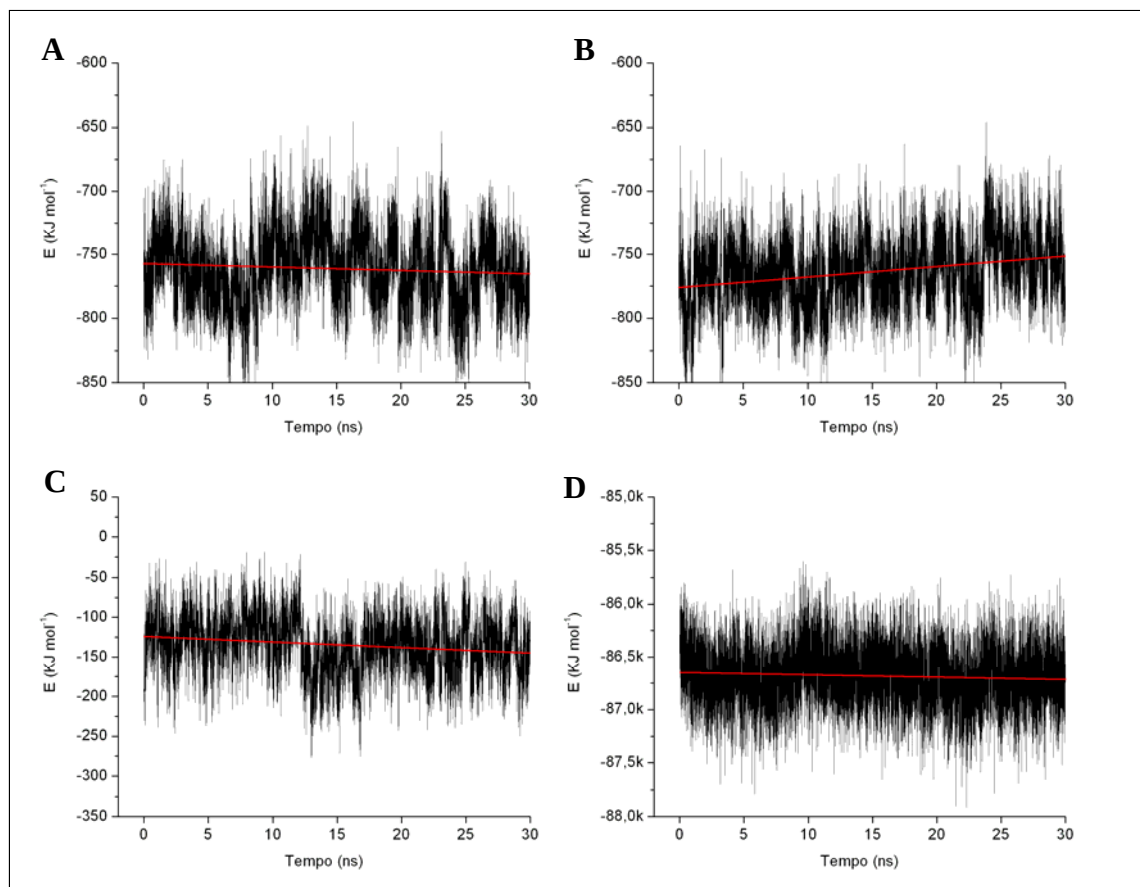


Figura 16. Gráficos de energia como função do tempo. **A)** energia coulombiana da cadeia A; **B)** energia coulombiana da cadeia B; **C)** energia coulombiana da interação entre as cadeias A e B; **D)** energia potencial total. Linha vermelha: ajuste linear sobre todo o período.

A partir dos gráficos da Figura 16 calculamos as variações globais médias destas energias. Os dados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8. Valores das variações globais médias das energias de interações eletrostáticas internas as cadeias A e B e da interação entre as cadeias A e B e valor da variação da energia potencial total do sistema.

Energia de interação do tipo:	ΔE (kJ mol ⁻¹)
Eletrostática cadeia A	-7
Eletrostática cadeia B	+24
Eletrostática entre as cadeias A e B	-22
Energia potencial total do sistema	-63

Estes dados evidenciam que as pequenas alterações conformacionais que ocorrem no dímero conduzem a uma situação de menor energia, portanto mais estável, quer analisemos a

energia potencial total, ou as energias eletrostáticas diretas entre os peptídeos ($A + B + AB \approx -5 \text{ kJ mol}^{-1}$).

4.3.2 Perfil de solvatação

Os perfis que serão apresentados a seguir, também foram realizados por meio da integração (RIN, *Run integration number*) da função de distribuição radial de pares centrada em um dos grupos polares (NH ou CO) envolvidos em uma dada ligação de hidrogênio ou centrada sobre o carbono mais externo de grupos laterais apolares. Contudo, além do número de moléculas de água, verificou-se também o número de grupos Flúor (com referência ao centro de massa desse grupo) e o número de grupos OH do TFE. Deve-se lembrar que pela presença desses grupos o TFE tem caráter anfipático.

Na Figura 17 estão apresentados os perfis de solvatação calculados sobre um dos grupos polares envolvidos em uma dada ligação de hidrogênio. As ligações mostradas estão entre os resíduos: 6-10, 8-12, 10-14, para o C-terminal da cadeia B e 5-9, 7-11, 9-13, para o C-terminal da cadeia A.

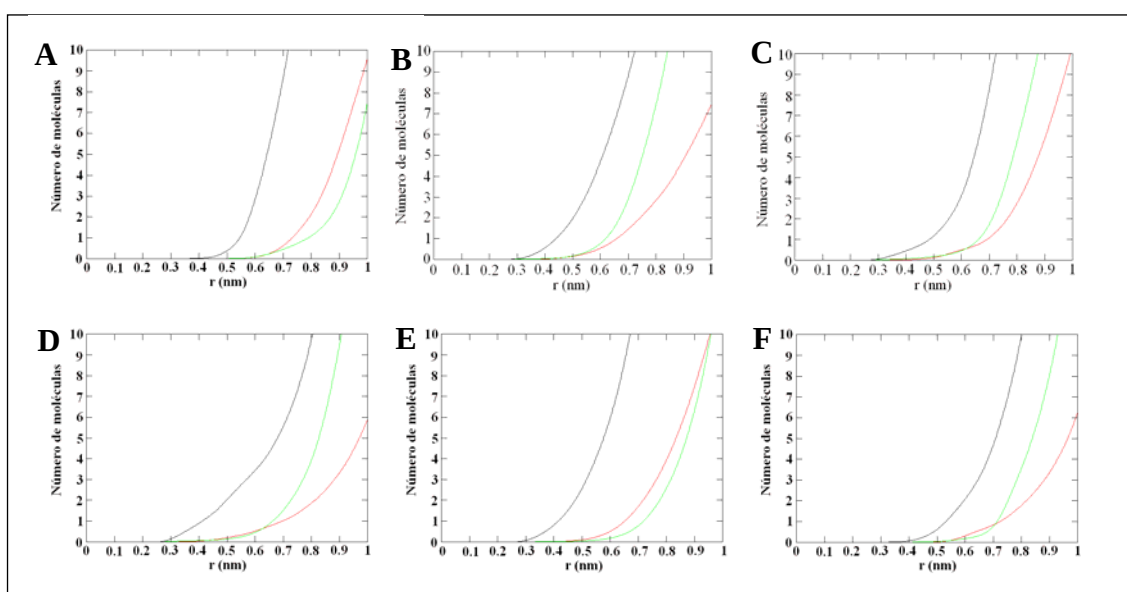


Figura 17. Análise da solvatação das ligações de hidrogênio da cadeia principal. A análise é baseada no estudo dos gráficos do número de moléculas ao redor de grupos polares envolvidos em uma dada ligação de hidrogênio como função do raio. **A)** 6-10; **B)** 8-12; **C)** 10-14 (resíduos da cadeia B). **D)** 5-9; **E)** 7-11; **F)** 9-13 (resíduos da cadeia A). Curva preta: grupo Flúor do TFE; curva vermelha: oxigênio do TFE, curva verde: oxigênio da água.

Verifica-se que os grupos flúor das moléculas de TFE são encontrados em maior quantidade em relação aos grupos polares (água e OH do TFE do solvente), a partir de 0,3 nm de raio. Os perfis de solvatação das ligações de hidrogênio não apresentados apresentam

comportamento semelhante a estes. Simultaneamente as observações da existência de nenhuma ou poucas moléculas de água dentro de um grande raio, verificamos que as ligações de hidrogênio são preservadas durante a simulação (gráficos de existência de todas as ligações de hidrogênio foram avaliados, mas não apresentados).

Na Figura 18 estão apresentados os perfis de solvatação calculados sobre os carbonos mais externos de cadeias laterais dos resíduos apolares. Os resíduos apolares apresentados são: 6, 7 e 10 para a cadeia A e 3, 11 e 14 para a cadeia B.

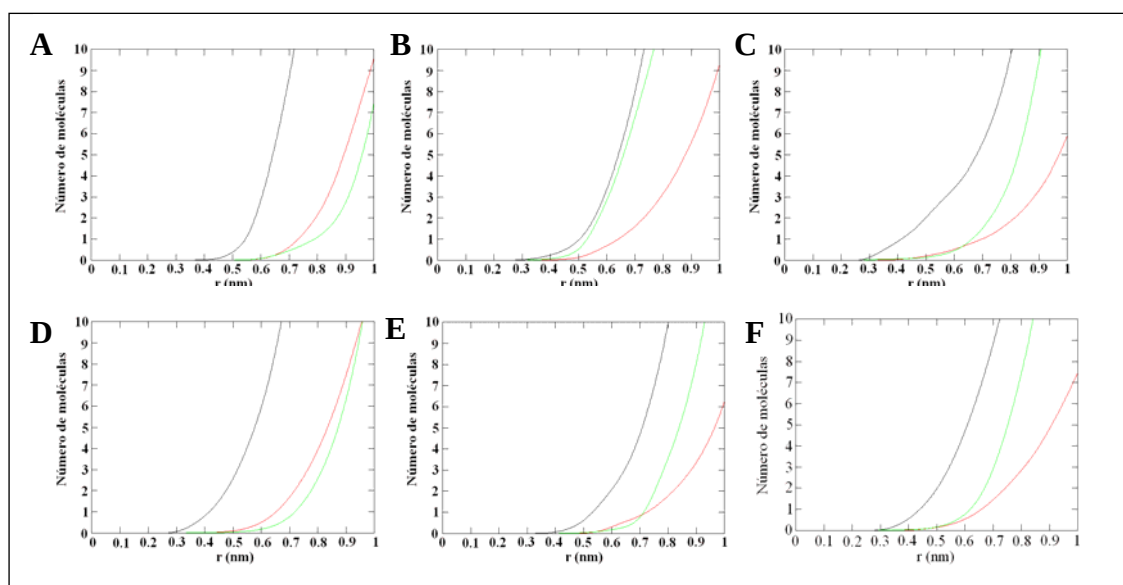


Figura 18. Análise da solvatação das cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos. A análise é baseada no estudo dos gráficos do número de moléculas ao redor do carbono mais externo das cadeias laterais como função do raio. **A)** Isoleucina 6; **B)** Alanina 7; **C)** Isoleucina 10 (resíduos da cadeia A). **D)** Leucina 3; **E)** Isoleucina 11; **F)** Leucina 14 (resíduos da cadeia B). Curva preta: grupo Flúor do TFE; curva vermelha: Oxigênio do TFE; curva verde: Oxigênio da água.

Notamos que os carbonos mais externos estão solvatados por maior número de grupos flúor do TFE que de grupos oxigênio da água. Exceto para o carbono da alanina 7 da cadeia A, para o qual as curvas referentes ao número de grupos flúor e de grupos oxigênio da água são próximas, a partir de 0,6 nm de raio.

Para os grupos das cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos 3, 4, 11 e 14 da cadeia A e dos resíduos 4, 6, 7 e 10 da cadeia B, calculamos os perfis e o comportamento observado é semelhante a esses apresentados. Também verificamos os perfis sobre as cargas das lisinas 5, 8 e 12 de cada cadeia e observamos que elas são altamente hidratadas, ou seja, existem muito mais moléculas de água ao redor dos grupos carregados do que grupos flúor ou oxigênio do TFE.

Avaliando as Figuras 17 e 18 juntas, constatamos o mesmo tipo de comportamento descrito por Fioroni et al. (2000) e Broggio Costa (2006) para simulações de monômeros de peptídeos em mistura TFE-água e experimentos como CD e RMN (SFORÇA et al., 2004). Entre os resultados descritos por aqueles trabalhos e os nossos, observamos o agrupamento de grupos flúor do TFE ao redor dos grupos de interesse, impedindo a aproximação de moléculas de água. O grupo flúor é hidrofóbico, ou seja, é incapaz de formar ligações de hidrogênio com grupos polares, por isso, se interpreta que não ocorre competição com os grupos protegidos por ligações de hidrogênio, estabilizando as ligações de hidrogênio que conferem à estrutura em hélice- α para os peptídeos.

Na Figura 19 estão ilustradas três passagens conformacionais do dímero em intervalos de 10 ns, desde o instante inicial até 30 ns, ilustrando a dinâmica do mesmo. Vê-se a estabilidade da estrutura helicoidal e dimérica dos peptídeos.

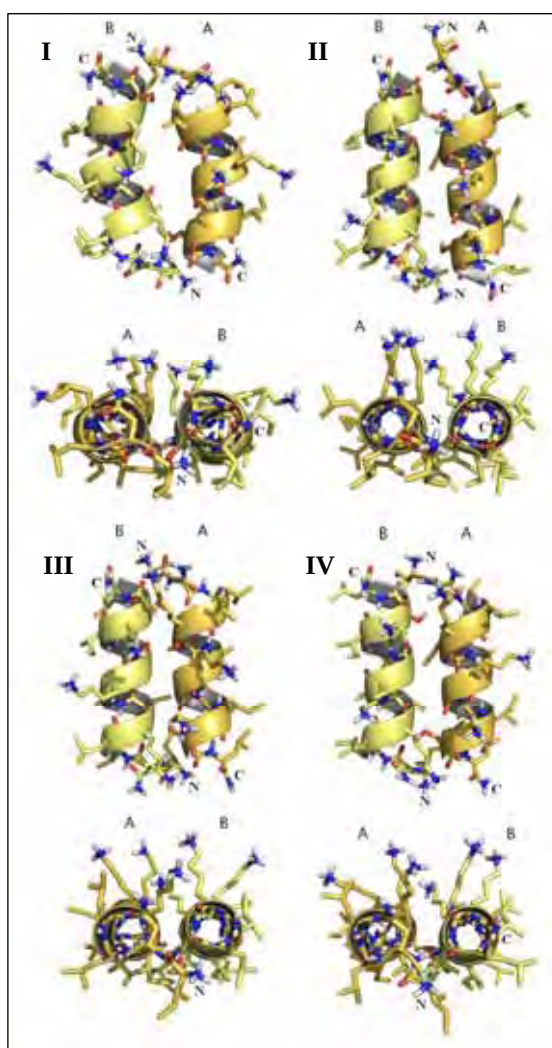


Figura 19. Representações das mudanças conformacionais do dímero em TFE-água apresentadas em intervalos de 10 ns e suas respectivas visões no eixo da hélice B. **I)** dímero no estado inicial da simulação; **II)** após 10 ns; **III)** 20 ns; **IV)** 30 ns.

5 DISCUSSÃO

Os resultados, discutidos na introdução, sobre estudos da interação entre magaininas e dermaseptinas, que são peptídeos helicoidais catiônicos e anfipáticos, com membranas fosfolipídicas, são racionalizados com base em dois modelos. Um no qual a agregação dos peptídeos só se dá na membrana e com colaboração explícita das cabeças polares ou aniônicas para sua estabilização e outro defende a agregação direta dos peptídeos, o que promoveria um campo elétrico molecular culminando na formação do poro transmembrânico, em um processo denominado eletroporação molecular (MITEVA et al., 1999).

Assim como magaininas e dermaseptinas, o peptídeo EMP-AF é helicoidal anfipático, possui alta cationicidade e apresenta atividade antimicrobiana, diferindo no número significativamente menor de resíduos, 14 contra 23 das magaininas. Neste trabalho, considerando as semelhanças estruturais entre os peptídeos, supusemos a existência de um dímero de EMP-AF e discutimos a sua estabilidade em solução aquosa e em mistura TFE-água. Embora resultados de CD e RMN não indiquem a formação de agregados moleculares, fica aí a especulação da ocorrência de agregados de dois ou três peptídeos presentes em pequena escala, evento pela qual não foi verificado porque não era o objetivo de quem empregou tais técnicas, SFORÇA et al. (2004) e dos SANTOS CABRERA et al. (2004).

Considerando que uma das linhas indicadas para explicar os resultados defende que a agregação só é possível no ambiente membranar, por causa da “blindagem” eletrostática produzido pelas cabeças polares, ou seja, sem esse efeito não seria possível obter agregados estáveis, discutimos a estabilidade do dímero em função das interações eletrostáticas, atento especialmente, as interações entre os grupos carregados e polares e também aos efeitos da solvatação. Para mimetizar o ambiente hidrofóbico representado pelo interior da bicamada lipídica, simulamos o dímero em uma mistura de TFE-água, porque o TFE forma *clusters* de ambientes hidrofóbicos.

Partindo de um monômero do peptídeo EMP-AF obtivemos, através de um *docking* rígido e em vácuo, uma estrutura dimérica com características interessantes. O dímero apresenta estrutura anfipática, assim como observamos para o monômero, de modo que sugere que ele pode ficar adsorvido na membrana da mesma maneira que para o monômero é proposto (Figura 13 I, p. 37). Além disso, os macro-dipolos das hélices que estão dispostos de forma antiparalela e, as ligações de hidrogênio inter-cadeias promovidas pelo processo de *docking* entre as asparaginas e serinas, sugeriam que eram fatores que colaborariam para a

estabilidade da estrutura, mesmo que com contribuição marginal e, antes da simulação em mistura TFE-água, sinalizavam a possibilidade de interação direta entre os peptídeos sem que houvesse instabilidade da estrutura helicoidal em um ambiente que mimetize a interface membranar.

Os resultados da simulação em água mostram que os peptídeos, inicialmente em conformação helicoidal, colocados antiparalelamente, perdem paulatinamente essa estrutura, assim como a disposição antiparalela. Isso ocorre, a despeito do balanço favorável da soma das energias eletrostáticas intra- e inter-cadeias. Dos resultados apresentados não é possível afirmar com certeza que a interação condutora do processo de desestruturação da estrutura inicial do dímero sejam as interações hidrofóbicas, porém o fato dela ser acompanhada pela variação no número de moléculas vizinhas a alguns resíduos hidrofóbicos sugere que esse seja o caso.

Essa afirmação é corroborada pelos resultados em mistura TFE-água. Nesse caso, mostramos que, no tempo de simulação o dímero mostra-se estável. O balanço energético das interações eletrostáticas inter-cadeias é, qualitativamente, muito semelhante ao caso em solução aquosa. A diferença mais significativa parece estar exatamente no ambiente hidrofóbico propiciado pelos átomos de flúor do TFE que se voltam para os grupos apolares das cadeias laterais, enquanto a parte hidrofílica do TFE (grupo OH) proporciona bons “contatos” com a água. Adicionalmente, pelo fato das lisinas serem resíduos de aminoácidos com grupos laterais grandes, com 4 grupos hidrocarbônicos entre a cadeia principal e o grupo NH_3^+ carregado, o TFE da mesma forma proporciona um ambiente adequado (hidrofóbico) para estes grupos e em consequência disso protegem as ligações de hidrogênio da cadeia principal dos peptídeos e, em consequência, a estrutura helicoidal. O dímero, nesta solução, é adicionalmente estabilizado pelas ligações de hidrogênio inter-cadeias que estão dispostas simetricamente na estrutura, devido ao antiparalelismo dos peptídeos.

6 REFERÊNCIAS

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, v. 47, p. 415-433, 1998.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A₂ activity by Mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 13697-13702, 1983.

BERENDSEN, H. J. C. et al. *Interaction models for water in relation to protein hydration, in Intermolecular Forces*. Dordrecht: Pullman B., 1981. p. 331-342.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, v. 81, p. 3684-3690, 1984.

BROGGIO COSTA, S. T. *Estudos conformacionais por Dinâmica Molecular de peptídeos antimicrobianos da família dos mastoparanos em mistura de TFE-água*. 2006. 133 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSON, L. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, v. 98, p. 10089–10092, 1993.

DEMPSEY, C. E.; UENO, S.; AVISON, M. B. Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. *Biochemistry*, v. 42, p. 402-409, 2003.

dos SANTOS CABRERA, M. P. et al. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. *J. Peptide Res.*, v. 64, p. 95-103, 2004.

dos SANTOS CABRERA, M. P. *Estudo da conformação e atividade lítica de peptídeos antimicrobianos de vespas*. 2006. 89 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

DUCLOHIER, H. Bilayer lipid composition modulates the activity of dermaseptins, polycationic antimicrobial peptides. *Eur. Biophys. J.*, v. 35, p. 401-409, 2006.

FIORONI, M. et al. A New 2,2,2-Trifluoroethanol Model for Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem.*, v. 104, p. 12347- 12354, 2000.

GURTOVENKO, A. A.; VATTULAINEN, I. Pore formation coupled to ion transport through lipid membranes as induced by transmembrane ionic charge imbalance: Atomistic molecular dynamics study. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 127, p. 17570-17571, 2005.

HELLER, W. T. et al. Effect of changing the size of lipid headgroup on peptide insertion into membranes. *Biophys. J.*, v. 73, p. 239-244, 1997.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.*, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HOCKNEY, R. W.; GOEL, S. P.; EASTWOOD, J. Quiet high resolution computer models of a plasma. *J. Comp. Phys.*, v. 14 p. 148–158, 1974.

HUANG, H. W.; WU, Y. Lipid-alamethicin interactions influence alamethicin orientation. *Biophys. J.*, v. 60, p. 1079-1087, 1991.

HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*, v. 39, p. 8347-8352, 2000.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, v. 22, p. 2577-2637, 1983.

KONNO, K. et al. Structure and biological activities of Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*, v.38, p. 1505-1515, 2000.

LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S. J. Antimicrobial peptides in action. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 128, p. 12156-12161, 2006.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.*, v. 7 p. 306–317, 2001.

LUDTKE, S. J. et al. Cooperative membrane insertion of magainin correlated with its cytolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1190, p. 181-184, 1994.

MENDES, M. A. et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon*, v. 44, p. 67-74, 2004.

MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Toxicon*, v.45, p. 101-106, 2005.

MITEVA, M. et al. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antimicrobial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett.*, v. 462, p. 155-158, 1999.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, v. 13, p. 952-962, 1992.

MÜNSTER, C. et al. Magainin 2 in phospholipids bilayers: peptide orientation and lipid chain ordering studied by X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1562, p. 37-44, 2002.

NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. *Biopolymers*, v. 25, p. S115-S121, 1986.

POKORNY, A.; ALMEIDA, P. F. F. Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by δ -lysin in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, α -helical peptides. *Biochemistry*, v. 43, p. 8846-8857, 2004.

RITCHIE, D. W.; KEMP, G. J. L. Protein docking using spherical polar Fourier correlations. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, v. 39, p. 178-194, 2000.

SFORÇA, M. L. et al. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the Eumenine solitary wasp. *Biochemistry*, v. 43, p. 5608-5617, 2004.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANCASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, v. 55, p. 4-30, 2000.

VAN GUNSTEREN, W. F. et al. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide*. Zurich: Hochschulverlag AG an der ETH Zurich, 1996. 335 p.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, v. 55, p. 27-55, 2003.