

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Doutorado em Química

Bruna Luana Marcial

**TETRACICLINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS COMO INIBIDORES DE  
METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs): UM ESTUDO DE ESTRUTURA,  
REATIVIDADE, DINÂMICA E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS**

Juiz de Fora

2013

BRUNA LUANA MARCIAL

**TETRACICLINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS COMO INIBIDORES DE  
METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPS): UM ESTUDO DE ESTRUTURA,  
REATIVIDADE, DINÂMICA E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Juiz de Fora  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Ferreira Dos Santos (UFJF)

Co-Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria João Ramos (U. Porto)

Juiz de Fora

2013

*À minha família, que é minha referência na ciência da vida*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por estar sempre à frente dos meus caminhos.

Ao meu orientador Prof. Hélio pela orientação dinâmica e precisa, sobretudo, agradeço pela confiança e paciência que teve comigo ao longo desses anos de convivência e de aprendizagem.

À Professora Maria João pela gentileza e boa vontade com que me recebeu em seu grupo na U. do Porto. Agradeço imensamente pela orientação direta e eficiente, é imensurável o meu aprendizado e crescimento como estudante e como pessoa durante o meu estágio no grupo da professora.

Ao Prof. Sergio F. Sousa pela efetiva contribuição no desenvolvimento desse trabalho e no meu desenvolvimento científico.

Aos professores Luiz Antônio e Cléber Andrade pela colaboração e orientação sempre que necessária.

Aos professores do departamento de química que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica

A todos os meus amigos dos laboratórios de química, principalmente os meus amigos do NEQC: Lucas, Diego, Willian, Gilson, Arthur, Nathália, Eduardo, Pedro, Júlio, Raissa e Tiago, e em especial a Ingrid pela participação na realização deste trabalho.

Às minhas amigas Elizabeth e Aline pela acolhida e pelos passeios que tantas vezes aliviaram o stress do trabalho e principalmente a saudade de casa.

Aos meus amigos Roseli e Emílio que tanto acrescentaram na minha vida pessoal e científica.

Aos meus amigos queridos Leo, Elgte, Tati e Antônio. São 10 anos de uma parceria feliz.

Ao Vytor Pinheiro que fez esse último ano único na minha vida. Obrigada pela troca científica tão produtiva.

Um agradecimento mais que especial aos meus pais Elza e Geraldo, que mesmo na ausência de um diploma souberam ser meus maiores mestres e incentivadores. Obrigada pela confiança, e, sobretudo, pelo exemplo de vida que sempre representaram para mim, saibam que tudo que sou e tudo que conquistei devo a vocês.

Aos meus irmãos, Mateus e Marcos que são meus melhores amigos, inclusive na ciência. Obrigada por estarem sempre do meu lado nos momentos mais tristes e felizes da minha caminhada.

Agradeço a agência de fomento à pesquisa CAPES pela bolsa concedida durante a realização desse trabalho. E ao Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE) pela Bolsa de estágio sanduiche na Universidade do Porto - Portugal 2011/2012 (Capes – Proc. N°6560-105).

Ao CNPQ e a FAPEMIG pelos recursos concedidos ao NEQC, necessários para a manutenção da infraestrutura computacional utilizada na execução desse trabalho.

*“Conhece-te, aceita-te, supera-te”*

(St. Agostinho)

## RESUMO

As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) desempenham um papel crucial nos processos fisiológicos e condições patológicas tais como progressão tumoral e metástases. Nos últimos anos, tem sido proposto uma série de inibidores de MMPs (IMMPs), incluindo as Tetraciclinas Quimicamente Modificadas (CMTs), as quais têm apresentado resultados promissores em ensaios com modelos pré-clínicos de câncer. No entanto, até o presente não havia nenhum estudo da estrutura-atividade desses compostos. Neste sentido, na presente tese foram combinadas as metodologias teóricas da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), Docking molecular e simulação de Dinâmica Molecular (DM) para elucidar o mecanismo de interação das CMTs com o sítio ativo das MMPs. Primeiramente a estrutura e estabilidade dos modelos moleculares miméticos do sítio ativo da MMP-2 representados por:  $[Zn(LH_n)(H_2O)_2]^{2+x}$  ( $n = 0, 1, 2$  e  $x = -2, -1, 0$ ) e  $[Zn(L)(His)_3]$ , onde L representa CMT-1, -3, -4, -7 e -8, foram calculados usando DFT. O efeito do solvente e do pH foram também avaliados. Os resultados sugerem que a coordenação com o zinco ocorra no sítio VI(O11-O12), o qual é igualmente favorável para a CMT-3 ( $\log \beta = 15,9$ ) e CMT-8 ( $\log \beta = 21,3$ ). Esta análise inicial evidenciou que a atividade das CMTs como inibidoras de MMP estaria diretamente relacionada à sua estrutura. Na segunda fase do trabalho foi investigada a interação das CMTs diretamente com o sítio ativo da MMP-2 (1QIB) combinando os métodos de docking molecular, simulações de DM e cálculos de energia livre. Um novo conjunto de parâmetros para os átomos de Zn(II) estrutural e catalítico da enzima foi calculado, validado e depositado dentro do campo de forças AMBER. As CMTs foram otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d) e “docadas” dentro do sítio ativo da MMP-2. As melhores soluções foram minimizadas e submetidas a 12ns de simulação de DM. A energia livre de ligação foi calculada usando as metodologias de integração termodinâmica e MM-PBSA. Os principais resultados mostram que as CMTs coordenam-se ao Zn(II) através do sítio VI(O11-O12), como proposto experimentalmente. Com exceção do análogo CMT-3 que está envolvido em contatos hidrofóbicos e interações de van der Waals com aminoácidos do bolso S1' da enzima e ainda interage com o Zn(II) pelo O11. A análise da energia livre de ligação revela uma maior afinidade entre o análogo CMT-3 com o sítio ativo da MMP-2, seguido pela CMT-7 e CMT-8, sendo que a diferença de energia varia apenas de 3 kcal mol<sup>-1</sup>. De acordo com os resultados, é possível inferir que a ocupação do canal S1' seria um fator fundamental para a resposta biológica da CMT-3, enquanto que as demais CMTs, por impedimento estérico, não entram no túnel hidrofóbico da enzima. Os resultados apresentados nesta tese tratam do primeiro estudo em nível molecular da interação de CMTs com metaloproteínas, como contribuição para a compreensão das observações experimentais, sobretudo dos testes biológicos, e ainda uma referência direta para o desenho de novos análogos das CMTs com maior potencial biológico.

Palavras-chave: Metaloproteinase da matriz. Tetraciclinas quimicamente modificadas. Campo de forças AMBER.

## ABSTRACT

Matrix Metalloproteinases (MMPs) play a critical role in physiological processes and pathological conditions such as tumor progression and metastasis. In recent years, a number of MMP inhibitors (MMPIs) have been proposed, including the chemically modified tetracyclines (CMTs), which have been evaluated in preclinical cancer models showing promising results. However, until present there were no studies on the structure-activity relationship for these compounds. In this sense, the present thesis focuses on the direct interaction of CMTs with the active site of the MMPs. Density Functional Theory (DFT), molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations were accomplished for seven CMT derivatives. Firstly the structure and stability of mimetic molecular models of active site of MMP-2 represented by:  $[\text{Zn}(\text{LH}_n)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+x}$  ( $n = 0, 1, 2$  and  $x = -2, -1, 0$ ) and  $[\text{Zn}(\text{L})(\text{His})_3]$ , where  $\text{L}=\text{CMT-1, CMT-3, CMT-4, CMT-7}$  and  $\text{CMT-8}$ , were calculated at DFT level. The solvent and pH effects were also evaluated. The results suggested that the coordination at the O11-O12 site (site VI) was quite favorable to CMT-3 ( $\log \beta = 15,9$ ) and CMT-8 ( $\log \beta = 21,3$ ). This initial analysis showed that the activity of CMTs as inhibitors of MMP is directly related to its structure. In the second stage of the study, we investigated the interaction of CMTs directly with the active site of MMP-2 (1QIB). New sets of parameters were proposed for structural and catalytic zinc atoms in order to study MMPs and their complexes by means of the AMBER force field. The CMTs ligands were optimized at the B3LYP/6-31G(d) and docked onto the active site of MMP-2. The best solutions were minimized and subjected to 12ns MD simulation. The binding free energy was calculated using the methods of thermodynamic integration and MM-PBSA. The main results showed that the CMTs bind to the catalytic zinc of the MMP-2 enzyme through the O11-O12 moiety (site VI) as proposed experimentally. The exception was the CMT-3 analogue which is involved in hydrophobic contacts and van der Waals interactions with amino acids of the S1' pocket in the MMP-2 enzyme and also interacts with the Zn (II) by O11. The binding energy calculated in solution predicts the CMT-3 complexes as the most favorable, followed by the CMT-7 and CMT-8 analogues, whose energy difference is within  $3 \text{ kcal mol}^{-1}$ . These results suggest that the occupancy of S1' pocket is an important molecular feature for biological response of CMT-3, while the other CMTs do not enter the hydrophobic tunnel of the enzyme due to the steric hindrance. The results presented in this thesis are the first step towards understanding the mechanism of CMTs as MMP inhibitors at a molecular level and could be a significant contribution to the understanding of experimental observations, especially the biological tests and the CMTs action mechanism as MMP inhibitors, allowing the design of new analogues with enhanced biological potency.

Key-words: Matrix metalloproteinase. Chemically modified tetracycline. AMBER force field.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Nomenclatura e alguns substratos específicos dos principais grupos das metaloproteinases da matriz.....	19
Tabela 1.2 Inibidores de MMP atualmente em testes clínicos para o câncer.....	23
Tabela 2.1 Escala de cálculo como uma função do número de funções de base (N) para vários métodos estrutura eletrônica (Cramer, 2006).....	40
Tabela 2.2 Comparação entre os campos de força mais comuns.....	52
Tabela 3.1 Principais ângulos diedros ( $^{\circ}$ ) para os complexos das CMTs com Zn(II).....	85
Tabela 3.2 Energia livre de Gibbs relativa ( $\delta\Delta G_R$ valores em kcal mol $^{-1}$ ) em fase gasosa e em solução aquosa (valores em colchetes) calculados no nível B3LYP/6-31G(d) para os distintos sítios de coordenação da CMT-1 e CMT-3.....	88
Tabela 3.3 Parâmetros estruturais (distancias em Å e ângulos em $^{\circ}$ ) calculados no nível B3LYP/6-31G(d) para os complexos [Zn(L)(His) $_3$ ], onde L corresponde as distintas CMTs.....	93
Tabela 3.4 Energia livre de Gibbs (em kcal mol $^{-1}$ ) para a formação do complexo [Zn(L)(His) $_3$ ] com L = CMT-1, -3, -4, -7 e -8.....	96
Tabela 3.5 Parâmetros de ligação e ângulos para enzima MMP-9:hidroxamato-reverso.....	117
Tabela 3.6 Os valores médios e desvios-padrão obtidos da simulação de MD para as ligações e ângulos parametrizados.....	119
Tabela 3.7 Dados estruturais para os Complexos MMP-2:CMT-n obtidos da simulação de DM.....	127
Tabela 3.8 Parâmetros estruturais para os complexos MMP-2:CMT-n obtidos da simulação de DM.....	128

Tabela 3.9 Os valores das flutuações do desvio quadrático médio (RMSF) calculados nos últimos 6 ns da simulação de DM realizada para os complexos MMP-2:CMT-n e a enzima MMP-2 livre.....	134
Tabela 3.10 Valores do SASA calculados para as moléculas de CMT-n nos complexos MMP-2:CMT-n e os coeficientes de partição experimental (octanol/água) para as CMT-n.....	137
Tabela 3.11 Análise dos contatos das CMT-n com os 31 resíduos de aminoácidos da MMP-2, com a indicação da porcentagem média de superfície de contacto com a CMT-n para cada resíduo durante a simulação MD e o grau de conservação para cada resíduo.....	138
Tabela 3.12 Contribuições para a energia de ligação calculadas usando a metodologia MM-PBSA para os complexos MMP-2:CMT-n.....	152

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Estrutura tridimensional da pro-MMP-2 coordenada ao TIMP-2. O íons Zn(II) são representados por esferas verdes e os íons Ca(II) azuis. Depositada no *Protein Data Bank* sob o código 1GXD(PDB, 2013).....20
- Figura 1.2 Cascata metastática. Adaptada de Kumar *et al.*(Kumar *et al.*, 2008)....21
- Figura 1.3 Representação esquemática dos possíveis intervenções terapêuticas para inibir MMPs. A maioria dos compostos em desenvolvimento clínico visa inibir a atividade enzimática da MMP.....22
- Figura 1.4 Tetraciclina e alguns dos seus derivados.....25
- Figura 1.5 Estrutura das principais tetraciclinas quimicamente modificadas. 4-dedimetil-amino-tetraciclina (CMT-1), 6-deoxi-6-demetil-4-dedimetil-amino-tetraciclina (CMT-3), 7-cloro-4-dedimeti-lamino-tetraciclina (CMT-4), pirazoltetraciclina(CMT-5), 12a-deoxi-4-dedimetil-amino-tetraciclina (CMT-7), 6-deoxi-5-hidroxi-4-dedimetil-amino-tetraciclina (CMT-8).....26
- Figura 2.1 Alguns termos da equação de MM.....51
- Figura 2.2 Exemplo de um ciclo termodinâmico usado nos métodos FEP eTI para o cálculo da energia livre de ligação relativa entre L1 e L2 com a proteína receptora R.....63
- Figure 2.3 Esquema de docking típico. O fluxograma mostra os passos comuns a todos os protocolos de docking.....70
- Figura 2.4 Modelo de grade gerado pelo *Autogrid*, uma sub-rotina do AutoDock73
- Figura 3.1 Distintos modos de coordenação apresentados pelas CMTs (ilustrados para CMT-3).....76
- Figura 3.2 Estrutura primária da região do zinco catalítico das MMP-2 -9. A região alinhada corresponde aos resíduos 393-423 da MMP-9 humana.....78

Figura 3.3 Processo considerado no estudo da reação com o modelo do sítio ativo da MMP-9.....	78
Figura 3.4 Estruturas dos complexos CMT-Zn(II) otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d). (a) Complexos com ligantes na forma L <sup>2-</sup> . (b) Complexos com o ligante LH <sup>-</sup> . (c) Complexos com ligante LH <sub>2</sub> .....	82
Figura 3.5 Energia de complexação relativa calculada em fase gasosa para os complexos [Zn(LH <sub>n</sub> )(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>2+x</sup> , onde n= 0, 1, 2 e x= -2, -1, 0.....	87
Figura 3.6 Representação da mudança na conformação estendida (a)→dobrada (c) prevista para o complexo [Zn(CMT-3)(His) <sub>3</sub> ] e a variação ângulo diedro O12a-C12a-C4a-H4a (ω <sub>1</sub> ). A estrutura intermediária mostrada em (b) foi obtida após 72 etapas da otimização.....	90
Figura 3.7 Interações importantes ao longo da otimização da geometria para o complexo [Zn(CMT-L)(His) <sub>3</sub> ] que favorecem a mudança conformacional, calculados no nível B3LYP/6-31G(d).....	91
Esquema 3.1. Esquema usado para o cálculo do grau de trigonalidade (τ).....	92
Figura 3.8 Geometrias otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d) para o complexo [Zn(L)(His) <sub>3</sub> ], sendo L CMT-1/II(O1-Oam) (a), CMT-3/VI(O12-O11) (b), CMT-4/II(O1-Oam) (c), CMT-8/VI(O12-O11) (d) e CMT-7/ V(O12-O1) (e).....	94
Figura 3.9 Parâmetros da grade versus RMSD entre as estruturas do docking e de Raios X para diferentes cargas no átomo de zinco. Os valores entre parênteses referem-se ao espaçamento da grade.....	102
Figura 3.10 Sobreposição do inibidor hidroxamato-reverso ancorado dentro do sítio ativo da MMP-9 (1GKC)(RowSELL <i>et al.</i> , 2002). A conformação experimental está mostrada na cor amarela, e a conformação obtida com o docking está mostrada na cor azul.....	103
Figura 3.11 Estruturas das tetraciclinas quimicamente modificadas e o mapa de potencial eletrostático gerado no nível de teoria B3LYP/6-31G(d).....	104

Figura 3.12 Isossuperfície da MMP-2 com as CMT-n ancorados dentro do sítio ativo da enzima.....	105
Figura 3.13 Principais interações proteína-ligante nas melhores soluções do docking.....	107
Figura 3.14 Energia de ligação do AutoDock ( <i>Lowest Docked binding Energy, LDBE</i> ) para as CMT-n com a MMP-2.....	108
Figura 3.15 Esfera de coordenação dos íons Zn(II) das MMPs.....	111
Esquema 3.2 Etapas realizadas na parametrização dos íons Zn das MMPs.....	111
Figura 3.16 Modelos moleculares para o zinco catalítico e estrutural da MMP e as cargas atômicas (u.a.). Para o cálculo dos parâmetros relativos às ligações e aos ângulos R=CH3 e para o cálculo das cargas R completa o aminoácido histidina e ácido glutâmico.....	112
Figura 3.17 Curvas usadas na parametrização das ligações e ângulos para o zinco catalítico (Z1) e estrutural (Z2) (valores de energia calculados no nível B3LYP/SDD).....	116
Figura 3.18 Variação do desvio quadrático médio (RMSD) para os carbonos alfa e a esfera de coordenação dos íons Zn catalítico e estrutural (definida de acordo com a Figura 3.16) ao longo da simulação de MD para o complexo MMP-9:hidroxamato-reverso.....	119
Figura 3.19 Os valores médios acumulados da simulação de MD para as ligações e ângulos parametrizados para as esferas de coordenação dos Zn catalítico (Z1) e estrutural (Z2) na MMP-9 calculado após 1ns de simulação.....	120
Figura 3.20 Estrutura de 1GKC após 12ns de simulação de dinâmica molecular utilizando o conjunto de parâmetros desenvolvidos no presente trabalho.....	121
Figura 3.21 Validação de parâmetros por comparação dos resultados obtidos por simulação de MD (usando o novo conjunto de parâmetros desenvolvido) com resultados de cálculos quânticos (B3LYP/6-	

31G(d)) e de seis estruturas cristalográficas de Raios X (código PDB com resolução indicadas entre parênteses).....	122
Figura 3.22 Representação gráfica do desvio quadrático médio (RMSD) nas simulações de DM realizadas para os sete complexos MMP-2: CMT-n.....	126
Figura 3.23 Estrutura final da DM para (a) CMT-7 e (b) CMT-3 e (c) CMT-8 complexados com o sítio ativo da MMP-2.....	129
Figura 3.24 Complexos da MMP-2:CMT-n (n=CMT-1, -2, -4 e -6) obtidos da simulação de DM.....	130
Figura 3.25 Principais interações para os complexos da MMP-2 com CMT1, CMT-6 e CMT-7 após 12 ns de simulação de DM.....	131
Figura 3.26 Representação gráfica do RMSF para todos os resíduos de aminoácidos ao longo da sequencia de aminoácidos do domínio catalítico da MMP-2 calculados nos últimos 6 ns das simulações de DM realizadas para os complexos MMP-2:CMT-n.....	133
Figura 3.27 (a) Diferença da média do RMSF da MMP-2 ligada aos ligantes CMT-n e a enzima MMP-2 livre. O losango em verde destaca os aminoácidos coordenados ao centro metálico de zinco. (b) Variações nos RMSFs estão representadas na estrutura da MMP-2, mostrando as regiões em que os RMSFs são mais afetados pela coordenação.....	135
Figura 3.28 Representação gráfica da função de distribuição radial $g(r)$ e do número de moléculas de água em função da distância de interação entre Zn...Ow (oxigênio da água) calculado para o zinco catalítico e estrutural em todos os complexos MMP-2:CMT-n.....	140
Figura 3.29 Esfera de coordenação para os complexos MMP-2:CMT1 e MMP-2:CMT7 após 12 ns de simulação de DM.....	140

- Figura 3.30 Potencial de força média,  $w(r)$ , calculado para os pares Zn...Ow em função da distância R. Apenas o Zn catalítico, ou seja, Zn1, foi considerado.....141
- Figura 3.31 (a) Porcentagem de moléculas de água ao redor do átomo Zn1 calculada a cada 500ps nos últimos 6ns de simulação de DM. (b) Percentual médio de água a partir dos últimos 6ns de simulação e Ow de resíduos distintos (átomo de oxigênio de diferentes resíduos de água) que visitam a esfera do zinco.....142
- Esquema 3.3 Ciclo termodinâmico usado para calcular a diferença de energia livre entre os ligantes CMT-3 e CMT-8 na enzima MMP-2. O  $\Delta G_{lig}^{CMT-3}$  e  $\Delta G_{lig}^{CMT-8}$  são as energias livre de ligação para os ligantes CMT-3 e CMT-8, respectivamente. O  $\Delta G_{solv}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  e  $\Delta G_{prt}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  são as energias livre de transformação da CMT-3 em CMT-8 em solução e ligado dentro da enzima MMP-2, respectivamente.....146
- Figura 3.32 Mutação estrutural do ligante CMT-3 para o ligante CMT-8.....149
- Figura 3.33 Valores de  $\partial V(\lambda)/\partial \lambda$  (kcal mol<sup>-1</sup>) como uma função de  $\lambda$  para cada transformação no sentido direto e reverso. (a) Subetapas 1, 2 e 3 para a transformação dos ligantes livre em solução (b) Subetapas 1, 2 e 3 para a transformação dos ligantes no ambiente da proteína.....150
- Figura 3.34 Contribuições relativas (calculada tomando o análogo CMT-3 como referência) para a energia livre de Gibbs para a MMP-2 e CMT-n obtidas com cálculos MM-PBSA após calibração com TI.....153

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MMP	Matrix Metalloproteinase
TC	Tetraciclina
CMT	Chemically Modified Tetracycline
MEC	Matriz Extracelular
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinase
IMMP	Inibidores de metaloproteinase
FDA	Food and Drug Administration
PDB	Protein Data Bank
HF	Hartree-Fock
DFT	Density of Functional Theory
LCAO	Linear Combination of Atomic Orbitals
STO's	Slater Type Atomic Orbitals
GTO's	Gaussian Type Atomic Orbitals
CGTO	Contracted Gaussian-Type Function
ECP	Effective Core Potentials
RECP	Relativistic Effective Core Potentials
MBPT	Many Body Perturbed Theory
CI	Configuration Integration
SCF	Self Consistent Field
LDA	Local Density Approximatio
GGA	Generalized Gradient Approximation

MM	Mecânica Molecular
DM	Dinâmica Molecular
AMBER	Assisted Model Building and Energy Refinement
RESP	Restrained Electrostatic Potential Method
PME	Particule Mesh Ewald
TI	Thermodynamic Integration
FEP	Free Energy Perturbation
MM-PBSA	Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area Method
MEP	Mapa de Potencial Eletrostático
AGL	Algoritmo Genético Lamarckiano
RMSD	Root Mean Square deviation
LDBE	Lowest Docked binding Energy
RMSF	Root Mean Square Fluctuation
SASA	Solvent Accessible Surface Area
RDF	Radial Distribution Functions

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	METALOPROTEINASES DA MATRIZ: ESTRUTURA, REGULAÇÃO E FUNÇÃO BIOLÓGICA.....	17
1.2	O PAPEL DAS MMPS NO CRESCIMENTO, INVASÃO E METÁSTASE TUMORAL.....	20
1.3	INIBIÇÃO DAS MMPS COMO TERAPIA DO CÂNCER.....	22
1.4	INIBIÇÃO DE MMPS POR TETRACICLINAS.....	23
1.5	TETRACICLINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS (CMTS).....	25
1.6	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	27
<b>2</b>	<b>MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....</b>	<b>28</b>
2.1	FUNDAMENTOS TEÓRICOS DOS MÉTODOS <i>AB INITIO</i> .....	28
2.1.1	Aproximação de Born-Oppenheimer.....	30
2.1.2	Aproximação de Hartree-Fock.....	32
2.1.3	Aproximação do conjunto de funções de base.....	34
2.1.3.1	Inclusão de funções de polarização.....	37
2.1.3.2	Inclusão de função difusa .....	38
2.1.3.3	Potencial efetivo de “caroço” .....	38
2.1.3	Limitação da teoria de Hartree-Fock e correlação eletrônica.....	39
2.2	TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE.....	41
2.2.1	O teorema de Hohenberg-Kohn.....	41
2.2.2	O formalismo de Kohn e Sham .....	42
2.2.3	Aproximação da densidade local .....	44
2.2.4	Aproximação do gradiente generalizado .....	45
2.2.5	Funcionais de densidade híbridos.....	46
2.3	MECÂNICA MOLECULAR.....	47
2.3.1	Mecânica Clássica .....	47
2.3.2	Aspectos gerais dos campos de força da mecânica molecular .....	48
2.3.2.1	Estiramento da ligação.....	48
2.3.2.2	Deformação angular .....	48
2.3.2.3	Termo de torção.....	49
2.3.2.4	Interações eletrostáticas .....	49
2.3.2.5	Interação de van der Waals.....	50

2.3.3 Campos de força da mecânica molecular .....	51
2.3.3.1 Campo de força AMBER .....	53
2.4 DINÂMICA MOLECULAR.....	55
2.4.1 Princípios Básicos da DM .....	55
2.4.2 Passo de integração e a manutenção da geometria .....	57
2.4.3 Condições periódicas de contorno e raio de corte .....	58
2.4.4 Tratamento das interações de longo alcance .....	58
2.5 MÉTODOS PARA O CÁLCULO DA ENERGIA LIVRE DE ASSOCIAÇÃO.....	60
2.5.1 Os métodos FEP e TI.....	60
2.5.2 O método MM-PBSA.....	63
2.6 DOCKING MOLECULAR PROTEÍNA-LIGANTE.....	67
2.6.1 Princípios do docking molecular .....	67
2.6.2 O programa AutoDock .....	70
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
3.1 INTERAÇÃO DAS TETRACICLINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS COM O ÍON ZN(II) PRESENTE NO SÍTIO CATALÍTICO DAS MMPS: EVIDÊNCIAS PARA O SÍTIO DE COORDENAÇÃO DO METAL.....	74
3.1.1 Tratamento teórico.....	76
3.1.2 Estrutura e estabilidade dos complexos $[Zn(LH_n)(H_2O)_2]^{2+x}$ .....	79
3.1.3 Complexos das CMTs com modelo do zinco catalítico da MMP-9.....	87
3.2 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR NA MODELAGEM DOS COMPLEXOS DA METALOPROTEINASE MMP-2 COM OS LIGANTES CMTS.....	98
3.2.1 Tratamento teórico.....	99
3.2.2 Validação do protocolo de docking .....	100
3.2.3 Estrutura dos ligantes CMT-n.....	102
3.2.4 Modelagem molecular dos complexos MMP-2:CMT-n .....	104
3.3 DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO CONJUNTO DE PARÂMETROS PARA OS ÍONS ZN(II) DE ACORDO COM O CAMPO DE FORÇAS AMBER.....	108
3.3.1 Tratamento teórico.....	111
3.3.2 Determinação dos parâmetros do potencial.....	113
3.3.2.1 Parâmetros para ligações e ângulos .....	114
3.3.2.2 Parâmetros de van der Waals (vdW) e eletrostático.....	116
3.3.3 Validação dos parâmetros.....	117

3.4 ESTRUTURA E DINÂMICA DE INTERAÇÃO DAS TETRACICLINAS QUIMICAMENTE MODIFICADA COM A METALOPROTEINASE MMP-2.....	122
3.4.1 Tratamento teórico.....	123
3.4.2 Análise dos desvios quadráticos médios .....	124
3.4.3 Estrutura dos complexos MMP-2:CMT-n.....	125
3.4.4 Flutuações dos desvios quadráticos médios atômicos (RMSF) .....	131
3.4.5 Área da superfície molecular acessível ao solvente (SASA) .....	134
3.4.6 Funções de distribuição radial (RDF).....	138
3.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE RELATIVA DOS COMPLEXOS CMT-N COM A METALOPROTEINASE MMP-2.....	143
3.6.1 Tratamento teórico.....	143
3.6.2 Análise da energia Livre.....	148
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>153</b>
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	153
4.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS.....	156
4.3 ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS.....	157
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>158</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo de anos o ser humano com sua enorme capacidade de pensar e a necessidade de desvendar o oculto debruçou-se sobre a natureza buscando entendê-la. Primeiramente voltou-se para o que estava distante o “céu e os astros”, depois viu-se na necessidade de entender a si próprio e ao meio ao seu redor. Tudo isso foi fundamental para o desenvolvimento da ciência moderna, que notoriamente atingiu enorme credibilidade na sociedade atual devido aos avanços significativos nas áreas da física, química, biologia e medicina. Avanços esses que propiciaram o alto nível de desenvolvimento tecnológico.

De forma impressionante, nas ciências as diversas áreas de conhecimento estão fortemente entrelaçadas e, conseqüentemente, se complementam a fim de formar novos conhecimentos. Nesse sentido, podemos destacar os avanços extraordinários no estudo de mecanismos de doenças humanas, os quais foram notavelmente alavancados com o advento da chamada “biologia molecular”. Com o auxílio de ferramentas computacionais, instrumentos avançados de imagem, além de modernas técnicas de caracterização de moléculas foi possível desvendar importantes processos bioquímicos levando a descobertas biomédicas diárias que beneficiam boa parte da humanidade (Voet e Voet, 1995).

Dentre as mais diversas doenças que são temas de intensas pesquisas nas várias áreas da ciência, destacam-se as neoplasias conhecidas como câncer. Dentre outras particularidades, o câncer não se caracteriza por uma única doença, mas um conjunto de mais de cem delas que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos (caracterizando o tumor), podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (Inca, 2011). Conjunto esse que está entre as maiores causas de morte em todo o mundo. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (Inca), no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. Portanto, um dos grandes desafios da ciência nos últimos anos têm sido a compreensão e combate dos diversos tipos de câncer que atingem a população mundial.

Durante algumas décadas as pesquisas por novos antitumorais se baseavam no desenvolvimento de compostos que interferissem em processos intracelulares não específicos (por exemplo: replicação e síntese do DNA), sendo por isso que o uso de muitos desses compostos estão associados a severos efeitos colaterais (Clendeninn e Appelt, 2001). Mais recentemente, com o conhecimento da biologia de células tumorais, foi possível identificar processos celulares alterados especificamente em células cancerígenas e que são

responsáveis pelos mecanismos de crescimento e replicação, bem como a invasão dos tecidos adjacentes e formação de metástase dessas células (Clendeninn e Appelt, 2001). São justamente esses processos, na maioria das vezes anormais, os alvos de pesquisas por novas terapias de combate ao câncer. As drogas voltadas para esses processos atuariam especificamente interrompendo o crescimento de tumores malignos sem alterar tecidos normais, e, portanto, apresentariam toxicidade mínima.

Entre os potenciais alvos de novas terapias anticancerígenas estão as Metaloproteinasas da Matriz (MMPs), um grupo de enzimas que desempenham papel biológico importante na degradação e remodelagem da matriz extracelular (Clendeninn e Appelt, 2001). Foi observado uma alta expressão dessas enzimas associada a tumores agressivos e com potencial metastático (Islam *et al.*, 2003; Acharya *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2005). O conhecimento da participação das MMPs no mecanismo de metástase, que é um dos maiores problemas relacionados ao câncer complicando, o tratamento e o prognóstico, tem motivado o interesse pelo desenho de novos inibidores dessas enzimas como agentes antitumorais. Uma das categorias farmacológica de candidatos a inibidor de MMPs são os derivados de tetraciclina (TC), sobretudo as tetraciclinas quimicamente modificadas (CMTs) (Nelson, Hillen e Greenwald, 2001) que são abordadas no presente trabalho.

Muitos grupos de pesquisa e companhias farmacêuticas em todo mundo estão envolvidas no desenvolvimento de novos inibidores de MMPs (Tu *et al.*, 2008). Os pesquisadores alertam que é necessário combinar metodologias teóricas sofisticadas bem como métodos experimentais que permitam identificar fatores estruturais específicos de cada MMP (Nutti, Tuccinardi e Rossello, 2007; Murphy e Nagase, 2008). O grande desafio é obter novos inibidores com alta seletividade, nesse sentido torna-se extremamente relevante entender, em nível molecular, a interação desses possíveis inibidores com as MMPs e as implicações biológicas dessa interação.

## 1.1 METALOPROTEINASES DA MATRIZ: ESTRUTURA, REGULAÇÃO E FUNÇÃO BIOLÓGICA

Os tecidos humanos são organizados em uma série de compartimentos separados uns dos outros por dois tipos de matriz extracelular (MEC): a membrana basal e o tecido conjuntivo intersticial (Voet e Voet, 1995). A MEC é constituída por diferentes combinações de colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico e várias glicoproteínas como a fibronectina e a laminina, que preenchem a maioria dos espaços intercelulares. Essas macromoléculas

são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. Dessa forma, processos fisiológicos e patológicos, incluindo morfogênese, desenvolvimento embrionário, desenvolvimento e reparação de tecidos, artrite, doenças cardiovasculares, e câncer, envolvem precisamente a regulação e degradação da MEC (Voet e Voet, 1995). Dentre as enzimas degradadoras da MEC, destacam-se as MMPs. Essas podem agir em um ou mais componentes e juntas têm a capacidade de degradar todos os elementos protéicos conhecidos da MEC (Murphy e Nagase, 2008). As MMPs constituem uma família de metaloenzimas que dependem de zinco e cálcio para exercerem sua função catalítica. São conhecidas 24 MMPs diferentes, classificadas de acordo com seu domínio e organização estrutural, além do substrato específico para degradação (Roy, Yang e Moses, 2009). A nomenclatura e os substratos específicos de cada grupo das MMP estão resumidos na Tabela 1.1.

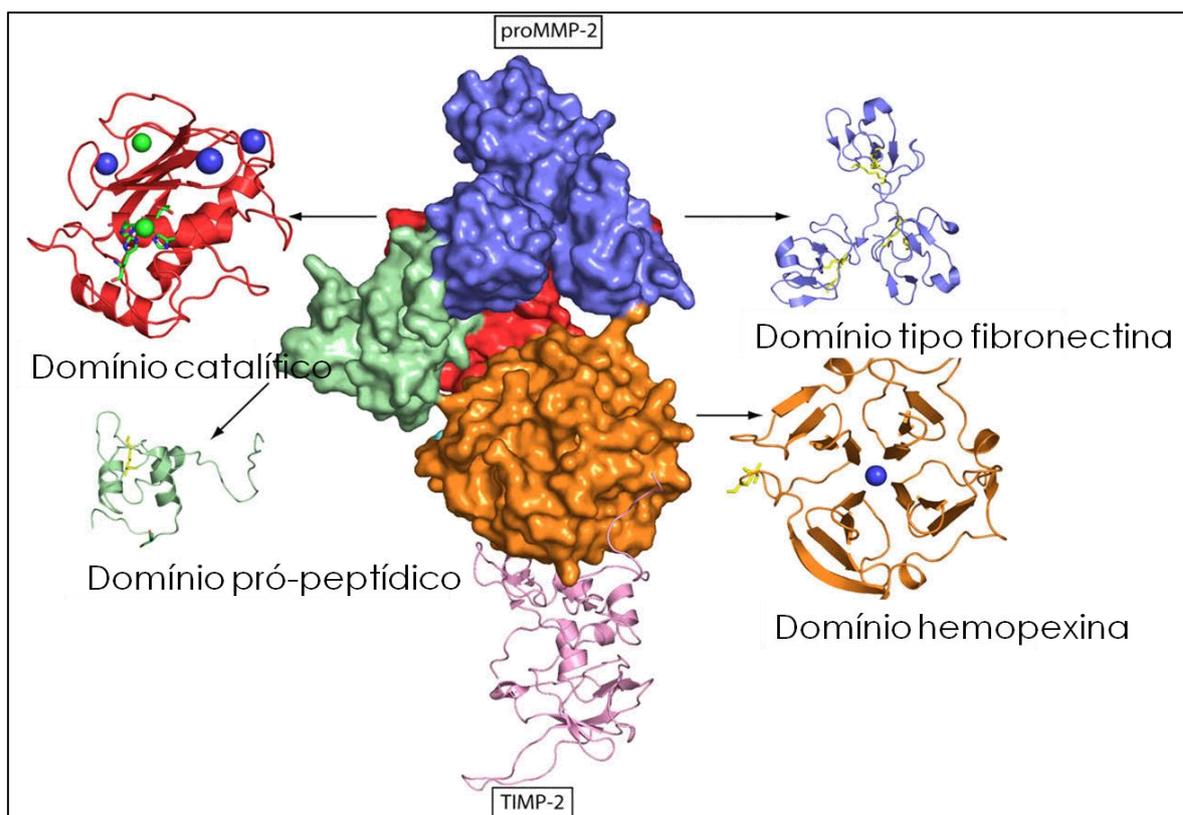
As MMPs são secretadas pelas células na forma de pró-enzima e são ativadas no meio extracelular pela ação de várias proteases (Nutti, Tuccinardi e Rossello, 2007; Murphy e Nagase, 2008). Tanto a ativação quanto a atividade enzimática das MMPs são reguladas por uma família específica de proteínas, denominados inibidores teciduais de MMP (TIMP), a Figura 1.1 mostra a estrutura da Pró-MMP-2 coordenada ao TIMP-2 (Murphy e Nagase, 2008). Atualmente são conhecidos quatro membros da família das TIMPs (numerados de TIMP-1 a TIMP-4 de acordo com a ordem de descoberta) capazes de se ligar e inibir a atividade de todos os membros da família das MMPs (Clendeninn e Appelt, 2001). Eles demonstram, entretanto, diferenças na sua distribuição nos tecidos e na habilidade de formar complexos com a forma inativa da MMP. Os grandes processos patológicos são causados pelo desbalanceamento entre as MMPs e os TIMPs, que levam ao aumento da atividade proteolítica das enzimas descontrolando a degradação da MEC (Jourden e Cohen).

Um grande número de estruturas tridimensionais das MMPs e dos TIMPs tem sido determinado tanto por cristalografia de Raios X como por espectroscopia de RMN (Clendeninn e Appelt, 2001). Todas as MMPs têm características em comum, incluindo, um domínio catalítico, que acomoda um íon de Zn(II) no sítio ativo; um domínio propeptídico, essencial para a manutenção de sua latência enzimática, e que é removido quando a enzima é ativada. A maioria das MMPs também possui um domínio C-terminal com uma sequência de homologia a hemopexina, que constitui um sítio de ligação para os inibidores teciduais (Clendeninn e Appelt, 2001; Murphy e Nagase, 2008).

As gelatinases A e B diferem das demais por apresentarem um domínio semelhante à fibronectina, essa sequência é necessária para ligação e clivagem do colágeno. As MT-MMPs são caracterizadas por um domínio transmembrana que é responsável pela ancoragem da enzima à membrana plasmática (Murphy e Nagase, 2008). Além do zinco catalítico todas as MMPs apresentam um segundo íon Zn(II) e geralmente três íons Ca(II), ambos com função estrutural (Figura 1.1).

**Tabela 1.1** Nomenclatura e alguns substratos específicos dos principais grupos das metaloproteinases da matriz

Proteína	MMP	Substrato específico
<b>Colagenases</b>		Colágeno tipo I, II e III
Colagenase 1	MMP-1	
Colagenase 2	MMP-8	
Colagenase 3	MMP-13	
Colagenase 4	MMP-18	
<b>Gelatinases</b>		Gelatina e Colágeno tipo IV
Gelatinase A	MMP-2	
Gelatinase B	MMP-9	
<b>Estromelisinases</b>		Fibronectina e proteoglicanas
Estromelisinases 1	MMP-3	
Estromelisinases 2	MMP-10	
Estromelisinases 3	MMP-11	
<b>Matrilisinases</b>		Fibronectina e colágeno IV
Matrilisinases 1	MMP-7	
Matrilisinases 2	MMP-26	
<b>MMP ligadas a membranas</b>		
MT1-MMP	MMP-14	Colágeno tipo I, II e IV
MT2-MMP	MMP-15	Fibronectina e laminina
MT3-MMP	MMP-16	Colágeno tipo III e fibronectina
MT4-MMP	MMP-17	Gelatina e fibronectina
MT5-MMP	MMP-24	Proteoglicanas
MT6-MMP	MMP-25	Gelatina
<b>Outras MMPs</b>		
RASI-1	MMP-18/19	Não conhecido
Enamesilina	MMP-20	Não conhecido



**Figura 1.1** Estrutura tridimensional da pro-MMP-2 coordenada ao TIMP-2. Os íons  $Zn(II)$  são representados por esferas verdes e os íons  $Ca(II)$  azuis. Depositada no *Protein Data Bank* sob o código 1GXD (PDB, 2013).

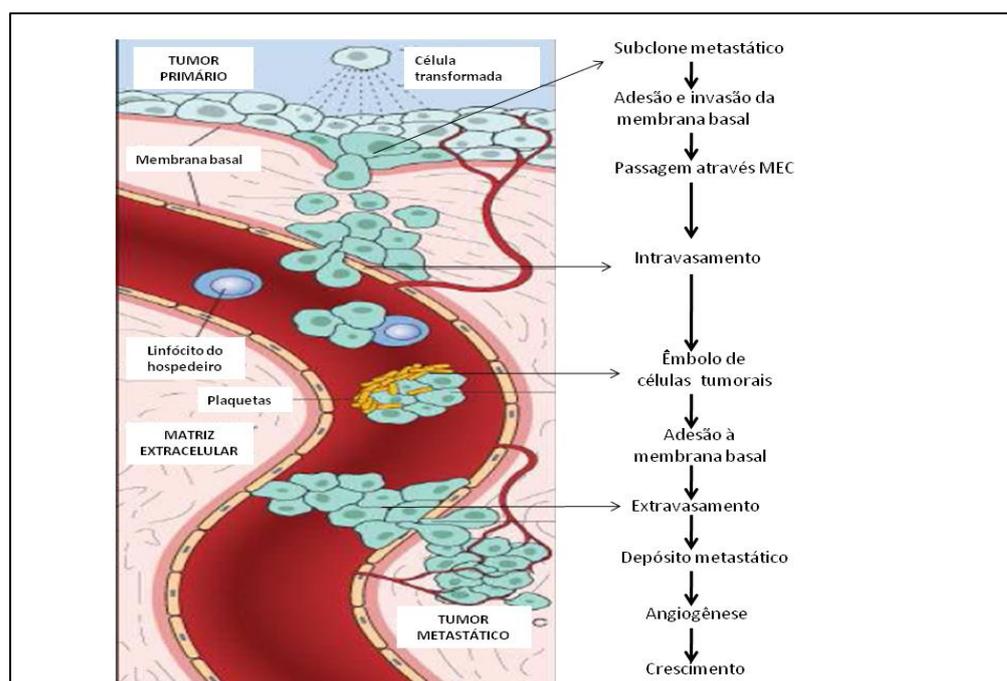
## 1.2 O PAPEL DAS MMPs NO CRESCIMENTO, INVASÃO E METÁSTASE TUMORAL

O crescimento, invasão e metástase tumoral são as várias etapas de um processo complexo, que envolve a divisão celular e proliferação, degradação proteolítica da MEC, migração celular através da membrana basal até alcançar o sistema circulatório, e a remigração e crescimento do tumor metastático em novos tecidos (Kumar *et al.*, 2008). A Figura 1.2 mostra a cascata metastática, uma ilustração esquemática das etapas sequenciais envolvidas na disseminação de um tumor.

O papel das MMPs neste processo é baseado em avaliações provenientes de biópsias humanas e em estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* (Kumar *et al.*, 2008). As MMPs degradam os componentes da membrana basal e da MEC, facilitando assim a invasão das células tumorais através dos tecidos e das paredes dos vasos sanguíneos, resultando no estabelecimento da metástase.

A expressão das MMPs na maioria dos tecidos normais é muito baixa ou até mesmo indetectável, no entanto há um aumento substancial na maioria dos tumores malignos. Um

grande número de estudos em diferentes tipos de tumor, incluindo pulmão, cólon, mama e carcinoma de pâncreas, demonstra uma superexpressão das enzimas na região do tumor em comparação com os tecidos normais adjacentes (Clendeninn e Appelt, 2001; Kumar *et al.*, 2008; Roy, Yang e Moses, 2009). Além disso, os níveis das MMPs no plasma e na urina de pacientes com câncer são muito elevados em relação aos pacientes saudáveis. Alguns estudos discutem a possibilidade de empregar as MMPs, através do controle dos seus níveis nos tecidos de interesse, como marcadores tumorais, visando à prevenção de crescimento tumoral e metástase (Clendeninn e Appelt, 2001).



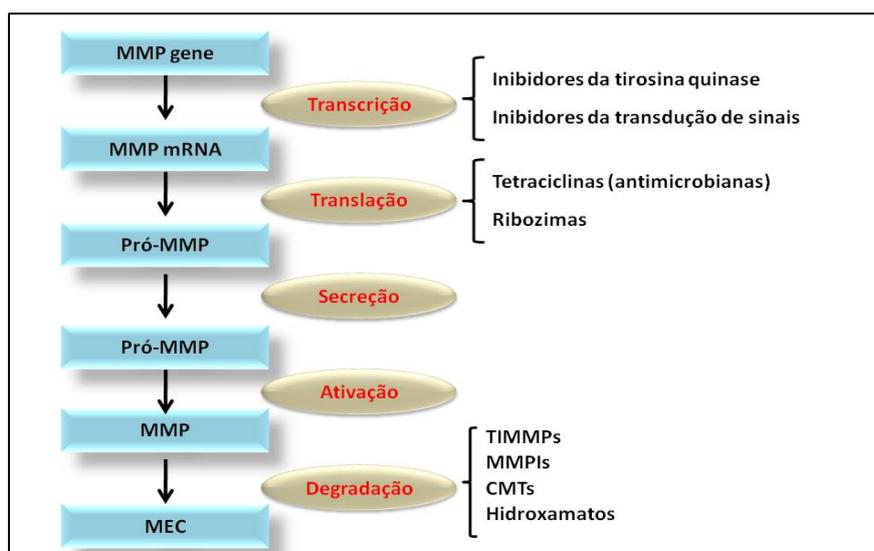
**Figura 1.2** Cascata metastática. Adaptada de Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2008)

A importância das MMPs no processo de migração celular é comprovada, entretanto, há discussões quanto à participação de membros específicos da família das MMPs nos processos neoplásicos (Clendeninn e Appelt, 2001). Em geral, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 são detectadas em tecidos malignos e estão associadas à alta agressividade, bem como ao potencial metastático e ainda o prognóstico desfavorável do tumor (Clendeninn e Appelt, 2001). Esse comportamento seria devido à gelatinases degradarem colágeno tipo IV, que é o principal componente da membrana basal, essa por sua vez separa o epitélio do tecido conjuntivo, e considera-se que essa membrana representa a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células neoplásicas (Kumar *et al.*, 2008; Roy, Yang e Moses, 2009). Esse fato sugere a relação entre os níveis de MMP-2 e 9 com

carcinomas de esôfago, oral, de endométrio, de pele, de laringe, próstata, ovário, estômago, mama, pulmão, bexiga, entre outros. Essas enzimas têm sido o maior alvo na pesquisa por inibidores de MMPs como estratégia no tratamento do câncer (Ryan *et al.*, 2001; Nuti, Tuccinardi e Rossello, 2007; Kumar *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2008; Roy, Yang e Moses, 2009).

### 1.3 INIBIÇÃO DAS MMPS COMO TERAPIA DO CÂNCER

A inibição da atividade das MMPs tem demonstrado ser uma forma alternativa de terapia do câncer (Tu *et al.*, 2008; Roy, Yang e Moses, 2009). A expressão e a ativação das MMPs ocorrem através de múltiplas etapas, e a intervenção farmacológica pode ocorrer em várias dessas etapas, como ilustrado na Figura 1.3. Entretanto as pesquisas por inibidores que atuem no tratamento do câncer têm como foco as MMPs depois de secretadas na MEC, atuando na inibição da ativação da pró-enzima ou inibindo a atividade enzimática da MMP.



**Figura 1.3** Representação esquemática dos possíveis intervenções terapêuticas para inibir MMPs. A maioria dos compostos em desenvolvimento clínico visa inibir a atividade enzimática da MMP.

Os inibidores das MMPs (IMMPs) podem ser classificados como sendo naturais (endógenos TIMPs) ou sintéticos (peptídicos, não peptídicos, bifosfanatos, derivados de tetraciclina) (Clendeninn e Appelt, 2001).

Os primeiros IMMPs sintéticos foram desenhados como modelos miméticos, ou seja, “quase cópias”, dos substratos específicos das MMPs, e dessa forma atuam por um

mecanismo competitivo (Clendeninn e Appelt, 2001). Esses inibidores baseados em substratos apresentam um amplo espectro de atividade bloqueando o sítio ativo da enzima, por meio de coordenação reversível ao íon Zn(II). Os inibidores que visam bloquear o sítio ativo da enzima, em geral, apresentam algum grupo com afinidade pelo zinco ativo da enzima e por isso são os chamados “*Zinc-Binding-Groups*” (ZBGs)(Gupta, 2007). O desenvolvimento de novos inibidores se mantém ativo e um grande número de compostos já chegaram a fase de testes clínicos. A Tabela 1.2 agrupa os inibidores de MMPs atualmente em testes clínicos para o câncer (Li *et al.*, 2009; Roy, Yang e Moses, 2009).

Com exceção do *batimastat*®, que foi administrado por via intraperitoneal, os outros IMMPs foram administrados oralmente. Vários ZBGs têm sido sintetizados e sua atividade biológica testada, incluindo carboidratos, aminocarboxilatos, derivados do ácido fosfórico, hidroxamatos e derivados de tetraciclinas (Tu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). De todos os IMMPs, os derivados hidroxamato dominaram o desenvolvimento clínico, enquanto os relativamente novos derivados das tetraciclinas têm mostrado ser uma opção viável.

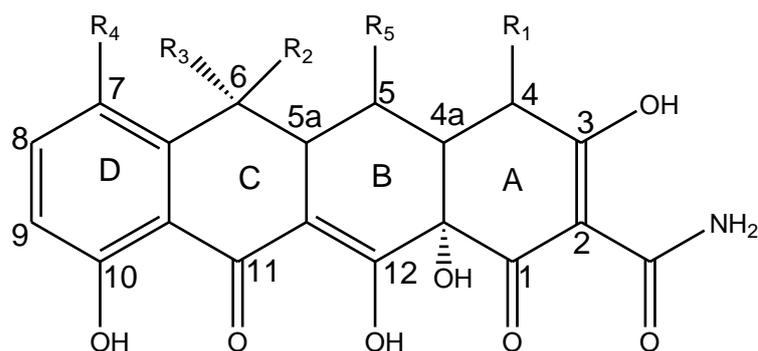
#### 1.4 INIBIÇÃO DE MMPS POR TETRACICLINAS

As TCs constituem uma família de antibióticos de amplo espectro de atividade antibacteriana, atuando principalmente na inibição da síntese proteica (Nelson, Hillen e Greenwald, 2001). Estes compostos foram inicialmente isolados de várias espécies de *streptomyces*, sendo posteriormente desenvolvidos derivados semissintéticos e sintéticos (Figura 1.4). O termo tetraciclina é usado para descrever todo o grupo, em função da natureza estrutural caracterizada pela fusão de quatro anéis de seis membros. De um modo geral, todos os análogos biologicamente importantes pertencentes a esta classe de antibióticos apresentam atividade semelhante, sendo as principais diferenças relacionadas à farmacocinética e à toxicidade envolvida com o processo de ação do fármaco (Chopra e Roberts, 2001; Nelson, Hillen e Greenwald, 2001).

**Tabela 1.2** Inibidores de MMP atualmente em testes clínicos para o câncer.

Droga e fase	Tipo de câncer	Tipo de droga	MMP
BMS-27591			
II	Próstata	Não peptídico	MMP-1,
III	Pulmão		2, 8, 14
COL-3		Tetraciclina	MMP-2,
I	Tumores sólidos em estado avançado	quimicamente	9
II		modificada	
Dalteparina			
II	Glioblastoma	Heparina sintética	MMP-9
III	Mama, pulmão, próstata, cólon		
Disulfiram			
I		Dissulfeto de	MMP-2,
II/III	Melanoma, tumores sólidos	Tetraetiltiuram	9
Genisteína			
II	Mama, rim, melanoma, próstata, bexiga,	Isoflavonas de soja	MMP-2,
			9
Marimastat			
III	Mama	Hidroxamato	MMP-1,
		peptídico	2, 3, 7, 9,
Neovastat			
II	Melanoma múltiplo	Extrato	MMP-2,
III	Rim, de mama, colorretal	de cartilagem de	9, 12
		tubarão	
PCK 3145			
I	Próstata	Peptídeo sintético	MMP-9
Prinomastat			
II		Hidroxamato não	MMP-2,
III	Glioblastoma, próstata	peptídico	9, 13, 14

Embora tenha sido descoberta em 1947, a molécula de tetraciclina e seus derivados estimularam a imaginação dos químicos e biólogos nas décadas seguintes. De antibacteriana a anti-inflamatória, de antiautoimunidade a regulação gênica, as TCs foram e ainda são modificadas e redesenhadas para apresentarem novas propriedades (M. Nelson e Greenwald, 2001). Dentro dos análogos mais recentes, destacam-se as tetraciclinas quimicamente modificadas (no inglês *Chemically Modified Tetracycline*, CMT), nas quais há adição ou remoção de algum grupo na estrutura da TC, o que normalmente altera as propriedades bioquímicas do composto. Como exemplo, a remoção do grupo dimetilamino na posição C4 da TC, elimina a atividade antimicrobiana, no entanto, potencializa a inibição de certas metaloproteinases (Acharya *et al.*, 2004).



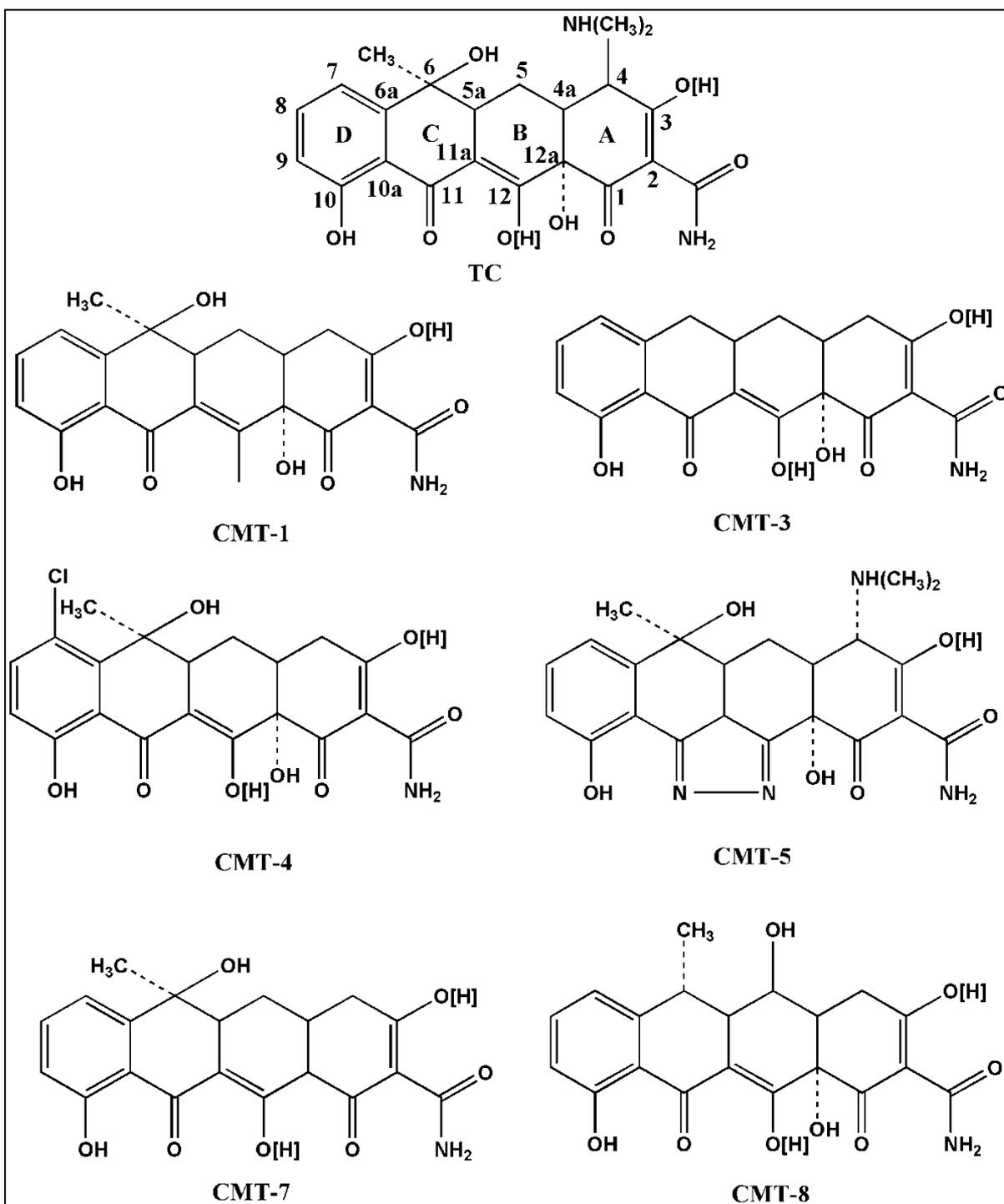
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Tetraciclina	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	H
Anidrotetraciclina	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
Doxiciclina	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	OH
Minociclina	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H

**Figura 1.4** Tetraciclina e alguns dos seus derivados.

As TCs estudadas como IMMPs incluem as antibióticas como: doxiciclina, minociclina além da própria tetraciclina (Figura 1.4); mas também inclui as tetraciclinas quimicamente modificadas que inibem as metaloenzimas por mecanismos não antimicrobianos (Chopra e Roberts, 2001). A doxiciclina é um dos derivados clássicos da TC e foi extensivamente estudada como anticancerígeno (Shen *et al.*, 2010). Em diversos estudos *in vitro* com linhagens de células tumorais de câncer de mama (MDA-MB-435) esse análogo atua inibindo a secreção e atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9. Atualmente só há no mercado mundial um medicamento registrado como um inibidor sintético de MMPs o *Periostat*® (Doxiciclina), que é indicado para o tratamento de doenças periodontais (Lee *et al.*, 2009; Roy, Yang e Moses, 2009; Fda, 2011).

### 1.5 TETRACICLINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS (CMTS)

Após a descoberta de que a atividade antimicrobiana das TCs dependia do grupo dimetilamônio na posição C4 do anel A, Golub e colaboradores (Golub *et al.*, 1991) verificaram que a ausência desse grupo não alterava a capacidade das moléculas em inibir as collagenases, portanto, tratava-se de mecanismos independentes. A partir daí, muitas tetraciclinas modificadas (conhecidas como CMTs, Figura 1.5), com intensa atividade antiMMP e não antimicrobianas foram sintetizadas (Stezowski, 1976; Prewo e Stezowski, 1977; Greenwald e Golub, 2001; Islam *et al.*, 2003; Acharya *et al.*, 2004; Sandler *et al.*, 2005; Kothari e Simon, 2006; Holmes *et al.*, 2008).



**Figura 1.5** Estrutura das principais tetraciclina quimicamente modificadas. 4-dedimetilaminotetraciclina (CMT-1), 6-deoxi-6-demetil-4-dedimetilaminotetraciclina (CMT-3), 7-cloro-4-dedimetilaminotetraciclina (CMT-4), pirazoltetraciclina (CMT-5), 12a-deoxi-4-dedimetilaminotetraciclina (CMT-7), 6-deoxi-5-hidroxi-4-dedimetilaminotetraciclina (CMT-8).

Atualmente as CMTs constituem uma família de pelo menos 10 moléculas (CMT-1-10) sem a presença, em geral, do grupo dimetilamônio (DMA) na posição C4. Algumas CMTs (Figura 1.5) parecem ser IMMPs mais potentes do que as TC convencionais, apresentando vantagens como a baixa toxicidade e maior acúmulo no plasma sanguíneo, mas, sobretudo, elas não apresentam mecanismo de resistência comum na terapia com antibióticos. A principal desvantagem das CMTs é a baixa solubilidade em água (cerca de 0,01mg/mL)(Seftor *et al.*, 1998; Acharya *et al.*, 2004). As CMT-1, -3, -4, -7 e -8 (Figura 1.5) demonstram o maior potencial terapêutico como inibidores de MMPs, *in vitro* e *in vivo*, apresentando uma maior lipofilicidade relativa, sendo que a CMT-3 está em fase II de triagem clínica como um antimetastático (Liu *et al.*, 2001). O mecanismo pelo qual as CMTs inibem as MMPs ainda não é bem conhecido, entretanto é sabido que as tetraciclinas se ligam aos íons metálicos Zn(II) e Ca(II) associados com as metaloproteinasas, bloqueando o sítio ativo das enzimas ou induzindo mudanças conformacionais, que tornam a pró-enzima susceptível a fragmentação durante o processo de ativação. De acordo com Acharya e colaboradores (Acharya *et al.*, 2004) as CMTs reduziram a atividade das MMPs pelo mesmo mecanismo descrito para TC e derivados.

## 1.6 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando a importância de se controlar a atividade das metaloenzimas da matriz extracelular, e conhecida a complexidade do sistema em questão, o planejamento racional dos inibidores das MMPs requer um modelo molecular adequado para possibilitar o estudo dos mecanismos de interação proteína-ligante. As estruturas de difração de Raios X para as MMPs e alguns inibidores têm colaborado no desenvolvimento de novos compostos baseados nessas estruturas. Entretanto, no caso dos inibidores da família das TCs não existem, ainda, estruturas cristalográficas reportadas na literatura, nem estudos que contemplem aspectos moleculares essenciais para o entendimento da natureza das interações entre CMTs e as metaloenzimas, tornando relevante o estudo teórico do modo de ligação das MMPs com estes potenciais inibidores. Nesse sentido o objetivo geral do presente trabalho é explorar as metodologias teóricas, através de cálculos *ab initio* (HF e DFT), docking molecular, simulação de dinâmica molecular (DM) e cálculos de energia livre de ligação, para avaliar a interação de diferentes CMTs (Figura 1.5) com as metaloproteinasas MMP-2 e MMP-9 (a partir das estruturas cristalográficas das enzimas), ambas diretamente relacionadas aos processos de metástase de células tumorais.

### 2 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

A química computacional pode ser considerada o grande elo entre o experimento e a teoria. Mediante o grande desempenho e capacidade de armazenamento de dados das máquinas atuais pode-se “reproduzir virtualmente” conjuntos de sistemas experimentais através de modelos bastante razoáveis. Seguido da aplicação dos mais diversos métodos computacionais, fruto de aproximações na teoria quântica, ao fim de experimentos computacionais é possível obter em nível molecular propriedades de interesse, inclusive àquelas inacessíveis experimentalmente.

Neste capítulo apresentaremos uma explanação das principais metodologias teóricas utilizadas no desenvolvimento da presente tese. A descrição aqui apresentada é necessária tendo em vista que a escolha e aplicação de técnicas e metodologias adequadas é essencial para o sucesso de um projeto.

O capítulo foi dividido em seções onde serão apresentadas as diferentes metodologias. Na seção 1 serão discutidos os aspectos fundamentais associados aos métodos *ab initio*, conceitos e aproximações que são em sua maioria os fundamentos do método discutido em seguida, a Teoria do funcional de Densidade (*Density Functional Theory, DFT*). Na seção 3 serão abordados os métodos de Mecânica Molecular (MM) e simulação. Na seção 4 serão apresentados os principais métodos para predizer energia de associação, o MM-PBSA (*Molecular mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*) e o método de integração termodinâmica (*Thermodynamic Integration, TI*) e a última seção é dedicada a descrição dos princípios e conceitos do docking molecular proteína-ligante, com atenção ao algoritmo e função de avaliação usados pelo programa AutoDock.

#### 2.1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DOS MÉTODOS *AB INITIO*

Os modelos teóricos têm por objetivo descrever quanticamente a estrutura molecular e as propriedades químicas, isto é, ligações químicas, fenômenos espectrais, reatividade molecular, entre outros, dependentes por sua vez de movimentos e interações entre núcleos e elétrons que constituem as moléculas. Os elétrons são partículas cujo comportamento em átomos e moléculas não podia ser descrito satisfatoriamente pelos princípios da mecânica clássica. Novas teorias eram necessárias para explicar comportamentos observados através de experimentos usando radiação eletromagnética sobre a matéria. (Levine, 2000)

Um dos primeiros fenômenos observados foi a quantização da luz, mostrada por Max Planck em seu estudo da radiação emitida por um corpo negro (Eisberg e Resnick, 1988), o qual mostrou que a radiação emitida é limitada a certos valores discretos. Outro estudo realizado por Albert Einstein descreve o efeito fotoelétrico, no qual ele propôs que a energia radiante era quantizada em pacotes concentrados, chamados de fótons (Atkins e Paula, 2012). Dessa forma uma série de experimentos envolvendo a interação da radiação com a matéria mostraram o comportamento dual onda-partícula. A mecânica clássica baseada nas Leis de Newton não podia explicar todos esses fenômenos, o que foi possível somente com o desenvolvimento da mecânica quântica, a qual considera que os elétrons têm propriedades de partículas, mas também de onda. Esse conceito já era apresentado por De Broglie em seus trabalhos que mostravam que o comportamento dual partícula-onda da radiação também se aplicava a matéria (Eisberg e Resnick, 1988; Levine, 2000; Atkins e Paula, 2012).

A mecânica quântica é fundamentada no conceito de dualidade partícula-onda da matéria, considerando que a partícula é distribuída no espaço como uma onda. Diferente da noção clássica de trajetória surge então o novo conceito: o da função de onda,  $\Psi$  (psi). O postulado fundamental da mecânica quântica prevê que para qualquer sistema material existe uma função de onda associada, a qual é função do tempo e das coordenadas e que descreve o estado do sistema.

Na forma independente do tempo a Equação proposta por Erwin Schrodinger em 1926 é considerada o coração da mecânica quântica, pois lida com um observável importante, a energia do sistema, Eq. 2.1.

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2.1)$$

Esta é uma equação de autovalores e autovetores, na qual  $\hat{H}$  é o operador Hamiltoniano que opera na função de onda  $\Psi$  para obter o autovalor de energia ( $E$ ) do sistema. Para uma dada partícula de massa  $m$  a equação de Schrödinger dependente do tempo pode ser escrita como:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V \right\} \Psi(\vec{r}, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (2.2)$$

Na qual  $\hbar$  é a constante de Planck,  $\nabla$  é o operador Laplaciano,  $V$  é a energia potencial e  $\vec{r}$  são as coordenadas da partícula.

Para um grupo de partículas, por exemplo, uma molécula a eq. (2.2) pode ser reescrita de forma similar, mas agora a função de onda deve ser função das coordenadas de todas as partículas que compõem o sistema. No caso particular em que o potencial  $V$  não é dependente do tempo, a equação de Schrödinger pode ser simplificada através da separação de variáveis. Assim pode-se reescrever a equação como um produto de duas funções: a função espacial  $\psi(\vec{r})$  e a dependente do tempo  $\tau(t)$ .

$$\Psi(\vec{r}, t) = \psi(\vec{r}) \cdot \tau(t) \quad (2.3)$$

Para maioria dos problemas de interesse químico a separação de variáveis é possível e aplica-se nestes casos apenas a equação de Schrödinger independente do tempo.

$$\hat{H}\psi(\vec{r}, R) = E\psi(\vec{r}, R) \quad (2.4)$$

Na equação acima  $\hat{H}$  é operador Hamiltoniano de energia total e  $\Psi$  é a função de onda total dependente das coordenadas eletrônicas  $r$  e das coordenadas nucleares  $R$ . A solução desta equação corresponde aos diferentes estados estacionários da partícula. Sendo que o estado de menor energia é chamado estado fundamental. É preciso considerar que a equação nessa forma não contempla efeitos relativísticos, ou seja, a variação na massa dos elétrons enquanto partícula em movimento é negligenciada.

### 2.1.1 Aproximação de Born-Oppenheimer

Da forma como escrita acima a equação de Schrödinger só pode ser resolvida analiticamente para o átomo de hidrogênio e outras espécies hidrogenoides (átomo de um elétron). Para sistemas complexos é necessário aproximações e a primeira delas é a aproximação de Born-Oppenheimer. Em termos qualitativos essa aproximação consiste basicamente na separação dos movimentos nucleares e eletrônicos, ou seja, considera-se o fato do núcleo ser muito mais pesado que os elétrons e por consequência os elétrons se movem muito mais rápido que os núcleos. Portanto, podemos considerar que os elétrons se

movem num campo onde os núcleos estão fixos e a função de onda total pode ser descrita como o produto das funções de onda eletrônica  $\Psi_e(r; R)$  e nuclear  $\Psi_n(R)$  .

$$\Psi(r, R) = \Psi_e(r; R)\Psi_n(R) \quad (2.5)$$

O Hamiltoniano puramente eletrônico que descreve o movimento de N elétrons num campo de M cargas pontuais é representado na Equação (2.6)

$$\hat{H}_e = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_\alpha \sum_i \frac{Z_\alpha}{r_{i\alpha}} + \sum_j \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.6)$$

A equação de Schrödinger eletrônica pode, portanto, ser escrita como:

$$\hat{H}_e \Psi_e(r; R) = E_e(R)\Psi_e(r; R) \quad (2.7)$$

Nessa equação o Hamiltoniano eletrônico  $\hat{H}_e$  opera sobre as coordenadas eletrônicas  $r$ , e a função de onda total  $\Psi_e(r; R)$  depende parametricamente das coordenadas nucleares  $R$ . Dessa forma, para diferentes arranjos dos núcleos, ou seja, diferentes valores de  $R$  obtêm-se uma função diferente das coordenadas eletrônicas. Devido a essa dependência, a energia total para os sistemas numa determinada configuração (núcleos fixos) inclui a contribuição da repulsão nuclear, embora as coordenadas nucleares não apareçam explicitamente na função de onda eletrônica.

$$E_{total} = E_e + \sum_\alpha \sum_{\beta>\alpha} \frac{Z_\alpha Z_\beta}{r_{\alpha\beta}} \quad (2.8)$$

Uma vez resolvido o problema eletrônico é possível resolver a equação para o movimento nuclear. Como os elétrons se movem muito mais rápido que os núcleos, é razoável substituir as coordenadas eletrônicas por seus valores médios, obtendo um Hamiltoniano nuclear para o movimento dos núcleos em um campo médio dos elétrons.

$$\hat{H}_n = \sum_\alpha -\frac{1}{2} \nabla_\alpha^2 + E_{total} \quad (2.9)$$

Resolvendo-se o problema eletrônico para um conjunto de coordenadas nucleares ( $\mathbf{R}$ ), obtemos uma superfície de energia potencial (do inglês *Potential energy surface*, PES), através da qual podemos calcular a função de onda dos núcleos que descreve o movimento nuclear, ou seja, a rotação, vibração e translação da molécula.

### 2.1.2 Aproximação de Hartree-Fock

Para resolver a Equação (2.7) para sistemas de muitos elétrons, utiliza-se a aproximação de um elétron de Hartree-Fock (Ditchfie.R; Szabo, 1996; Jansen, 1999; Cramer, 2006; Morgon e Koutinho, 2007). O método de HF se baseia na determinação de uma função de onda geral  $\Psi_e$  na forma de um produto antissimétrico de funções de onda de um elétron. De acordo com a teoria de orbitais moleculares (OM), a cada elétron está associado uma função spin-orbital  $\phi_{i\alpha}$  ou  $\phi_{i\beta}$ , em que  $\phi_i$  é a função de onda espacial e  $\alpha(m_s = 1/2)$  e  $\beta(m_s = -1/2)$  as funções de spin. Considerando que elétrons são férmions e “partículas” idênticas, os princípios de exclusão de Pauli e da indistinguibilidade devem ser satisfeitos. Portanto, a função de onda eletrônica deve ser escrita, na forma compactada, como um determinante de Slater.

$$\Psi_e = \frac{1}{\sqrt{n!}} \left| \phi_1(1)\alpha(1)\phi_1(2)\beta(2) \dots \phi_{n/2}(n)\beta(n) \right| \quad (2.10)$$

Para encontrar a função de onda e o valor exato da energia devem-se conhecer as funções spins-orbitais que minimizam a energia total, para tal utiliza-se o Princípio Variacional. Este princípio estabelece que qualquer função de onda aproximada apresenta uma energia superior ou igual à energia da função de onda exata.

$$E_{\psi_e \text{ aproximada}} = \int_{\tau} \Psi_e^* \hat{H}_e \Psi_e d\tau \geq E_{\psi_e \text{ exata}} \quad (2.11)$$

Como consequência do Princípio Variacional o menor valor de energia estará associado à função de onda mais próxima da exata. Dessa forma, partindo de uma função de onda aceitável, com vários parâmetros ajustáveis, variar esses parâmetros de modo a

minimizar a energia corresponde encontrar a representação mais precisa para a função de onda do sistema.

Aplicando o princípio variacional, usando um determinante de Slater para construir uma função inicial aceitável temos as equações de Hartree-Fock para cada spin orbital  $\phi_i$

$$\hat{f}\phi_i = \varepsilon_i\phi_i \quad (2.12)$$

Nesta equação  $\varepsilon_i$  é o autovalor da equação de Hartree-Fock representando a energia dos orbitais  $\phi_i$ , e  $\hat{f}$  é operador de Fock, definido como:

$$\hat{f} = \hat{h} + \sum_{i=1}^{n/2} \sum_{j=1}^{n/2} (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (2.13)$$

Nesta equação  $\hat{h}$  é o Hamiltoniano de 1 elétron e  $J_{ij}$  e  $K_{ij}$  representam as integrais de Coulomb e de troca, respectivamente.

$$J_{ij} = \iint \phi_i^*(1)\phi_j^*(2)r_{12}^{-1}\phi_i(1)\phi_j(2)d\tau_1d\tau_2 \quad (2.14)$$

$$K_{ij} = \iint \phi_i^*(1)\phi_j^*(2)r_{12}^{-1}\phi_i(2)\phi_j(1)d\tau_1d\tau_2 \quad (2.15)$$

Cada spin-orbital deve ser obtido resolvendo a eq. (2.12) usando o correspondente operador de Fock  $\hat{f}$ . O problema é que o operador de Fock definido na eq. (2.13) depende de todos os outros n-1 elétrons dentro do sistema. Para resolver a equação de Hartree-Fock é preciso conhecer as soluções correspondentes. O caminho usado para resolver este tipo de problema é usar um método iterativo de solução. Neste método parte-se de um conjunto de spin-orbitais “tentativa” para formular o operador de Fock, resolve-se a equação de Hartree-Fock para obter um novo conjunto de spin-orbitais, formula-se um novo operador de Fock e repete este processo até que um critério de convergência preestabelecido seja satisfeito.

A equação de Hartree-Fock pode ser resolvida numericamente para sistemas atômicos com poucos elétrons. Entretanto, para moléculas este tratamento é significativamente mais complicado, sendo necessária aplicação de algumas alternativas. Em

1951 C. C. J. Roothaan propôs que os orbitais moleculares poderiam ser representados por uma combinação linear de orbitais atômicos (LCAO- *Linear Combination of Atomic Orbitals*) centrados em cada átomo do sistema.

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^k C_{\mu i} \chi_{\mu} \quad i = 1, 2, 3 \dots k/2 \quad (2.16)$$

$\chi_{\mu}$  são os orbitais atômicos,  $C_{\mu i}$  a contribuição dos orbitais atômicos  $\mu$  para o orbital molecular  $i$  e  $k$  é número de orbitais atômicos usados na expansão. Substituindo a eq. (2.16) na eq. (2.12) obtemos as equações de HF-Roothaan.

$$\sum_{\mu=1}^k C_{\mu i} (F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) = 0 \quad (2.17)$$

Na qual  $F_{\mu\nu}$  são os elementos da matriz da Fock e  $S_{\mu\nu}$  as integrais de sobreposição dos orbitais atômicos  $\chi_{\mu}$  e  $\chi_{\nu}$ . A solução não trivial para a Equação (2.17) vem pela resolução do determinante secular eq. (2.18).

$$\det(F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) = 0 \quad (2.18)$$

Esse determinante é resolvido por um processo iterativo, conhecido como campo autoconsistente (SCF), uma vez que os elementos da matriz de Fock  $F_{\mu\nu}$  dependem do operador F que por sua vez depende dos coeficientes  $C_{\mu i}$ . Após o cálculo dos elementos da matriz de Fock, o determinante secular é resolvido obtendo-se os valores para a energia  $\varepsilon_i$ , e a matriz de coeficientes  $C_{\mu i}$  é determinada. Com a nova matriz  $C$  realiza-se uma nova expansão e o processo se repete até que ocorra convergência.

### 2.1.3 Aproximação do conjunto de funções de base

O conjunto de funções  $\chi_{\mu}$  é denominado de base de funções e representam orbitais semelhantes àqueles do átomo de hidrogênio, contendo parte radial e angular. A determinação ou escolha correta dessas funções é fundamental para o sucesso dos cálculos quânticos. De fato, é necessário que um conjunto de funções de base possa ter amplitude

suficiente para representar regiões do espaço com maior densidade de probabilidade eletrônica, ou menor amplitude em regiões onde a densidade de probabilidade é menor. A princípio seria possível pensar que quanto maior o conjunto de funções de base, ou seja, infinito ou completo, melhor seria a representação dos orbitais moleculares. Mas na prática é usado um conjunto finito de funções de base e quanto menor esse conjunto mais pobre a representação dos orbitais. Nesse contexto, é preciso que prevaleça o senso químico para escolher um conjunto de funções viável computacionalmente e eficiente para tratar os sistemas químicos de interesse.

As funções de base atômicas radiais usadas em cálculos de orbitais moleculares podem ser orbitais atômicos de Slater (STO's - *Slater Type Atomic Orbitals*) ou funções de base atômicas do tipo gaussianas (GTO's - *Gaussian Type Atomic Orbitals*).

Os STO's têm uma dependência exponencial com a distância núcleo-elétron e são muito similares aos orbitais atômicos do átomo de hidrogênio, e por isso os STO's representam satisfatoriamente o átomo de hidrogênio. Os orbitais STO's podem ser descritos na forma abaixo:

$$\chi_{STO} = N r^{n-1} \exp(-\xi r) Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (2.19a)$$

Nesta equação  $N$  é uma constante de normalização,  $\xi$  é o expoente do orbital,  $\theta, \phi$  são coordenadas esféricas e  $Y_{l,m}$  são os harmônicos esféricos. O  $n, l$  e  $m$  são os números quânticos: principal, momento angular e magnético, respectivamente.

A dependência exponencial, que caracteriza as STO's, garante um processo de convergência relativamente rápido. No entanto o cálculo das integrais de três e quatro centros é extremamente difícil e caro computacionalmente, limitando a aplicação dos STO's a sistemas atômicos e diatômicos, ou cálculos semi-empíricos onde essas integrais são negligenciadas.

As GTO's são polinômios em coordenadas cartesianas ( $x, y, z$ ) que apresentam uma dependência exponencial em  $r^2$  (onde  $r$  é distancia núcleo-elétron). São representados como:

$$\chi_{GTO} = N x^i y^j z^k \exp(-\xi r^2) \quad (2.19b)$$

Onde  $N$  é a constante de normalização e  $i, j, k$  são números inteiros positivos ou zero e podem definir os orbitais s, p, d. Se  $i + j + k = 0$ , a GTO representa o orbital atômico s; se  $i + j + k = 1$  o orbital representado é p.

As funções do tipo gaussianas variam exponencialmente com o quadrado da distancia núcleo-elétron, o que torna este tipo de função inferior em termos de qualidade, em comparação as STO's, na descrição do comportamento dos elétrons perto do núcleo. Apesar dessa deficiência, as GTO's têm propriedades matemáticas que tornam o seu tratamento computacional particularmente conveniente. Na verdade, é possível substituir as duas funções gaussianas centradas em átomos diferentes, por uma única função gaussianas centrada num ponto intermediário. Assim, integrais de dois elétrons em três e quatro centros atômicos diferentes podem ser reduzidas a integrais ao longo de dois centros diferentes, que são significativamente mais fáceis de calcular.

Apesar de três vezes mais funções gaussianas serem normalmente necessárias para garantir o mesmo nível de precisão que um determinado número de funções de Slater, a maioria dos cálculos quânticos utiliza funções do tipo GTO's. A razão é que, embora menos realísticas, a resolução das integrais eletrônicas tem um custo computacional menor.

Outra possibilidade de descrição dos orbitais atômicos é usar uma combinação linear de funções gaussianas como funções de base; originando novas funções chamadas funções contraídas (CGTO - *Contracted Gaussian-Type Function*) representadas como:

$$\chi_i = \sum_{\mu} d_{\mu r} g_r \quad (2.20)$$

$d_{\mu r}$  são novos coeficientes de expansão e  $g_r$  são as funções gaussianas originais (GTO) e são denominadas primitivas.

As funções de base podem ser classificadas pelo número de funções gaussianas que as formam. Uma base é dita mínima quando o número de funções é mínimo, ou seja, uma única função para cada orbital atômico. Dessa forma tem-se para C(H), que uma função de base mínima, por exemplo: STO-3G, pode ser representada por (6s,3p/3s)→[2s,1p/1s].

Uma base é dita estendida ou estendida de valência quando cada orbital é definido por duas ou mais funções de base. Quando se usa duas funções para cada orbital incluindo a valência e a camada interna (*core*) trata-se de uma função duplo-zeta (DZ), isso gera duas vezes mais funções de base e duas vezes mais coeficientes do que uma base mínima. No

caso de usar três funções para cada orbital tem-se uma triplo-zeta (TZ). Essas funções representam uma maior demanda computacional, mas podem significar uma melhora efetiva nos resultados dos cálculos.

Funções de base estendida são normalmente representadas por K-nlmG, na qual K representa o número de funções utilizadas para os elétrons de camada interna. A notação nlm, define as funções utilizadas para a camada de valência e “G” o uso de GTOs para representar os orbitais atômicos.

Como exemplo, a notação 3-21G representa uma base de camada de valência estendida, com o esquema de contração definido abaixo.

$$3-21G \left\{ \begin{array}{l} \chi_1 = \sum_{i=1}^3 d_i \chi_i^{GTO} \\ \chi_2 = \sum_{i=4}^5 d_i \chi_i^{GTO} \\ \chi_3 = \chi_6^{GTO} \end{array} \right.$$

(6s,3p/3s) → [3s,2p/2s]

A escolha do conjunto de funções de base depende do sistema molecular a qual será aplicada. Para aumentar a flexibilidade da base ou melhorar a sua descrição em determinadas regiões pode-se adicionar funções extras, como as funções difusas ou ainda funções de polarização. Quando for de interesse é possível ainda utilizar-se dos chamados potenciais efetivos de caroço para tratar sistemas de muitos elétrons. Essas funções serão descritas nas seções seguintes.

### 2.1.3.1 Inclusão de funções de polarização

O aumento do número de bases triplo-zeta, quádruplo-zeta nem sempre é o melhor na descrição de um sistema químico, particularmente em casos de moléculas com forte anisotropia na distribuição de carga. Nestes casos o melhor é adicionar funções de polarização. Função de polarização são funções com maior número quântico de momento angular. Ou seja, conjunto de bases polarizadas incluem orbitais adicionais de maior momento angular do que os orbitais ocupados. Normalmente adicionam-se funções d para o átomo de C e f para os metais de transição, ou ainda funções p para o átomo de hidrogênio. O uso de funções de polarização para os átomos pesados geralmente é indicada por um \* ou

\*\* quando são incluídas para o H também. Por exemplo, a notação 6-31G\* é na verdade o conjunto de funções 6-31G acrescido de uma função d para os átomos pesados, que também pode ser descrita como 6-31G(d). No caso de também conter função de polarização para os átomos de H, tem-se 6-31G\*\* ou 6-31G(d,p).

### 2.1.3.2 Inclusão de função difusa

Funções difusas são funções que possuem expoente mais difuso e produzem uma melhor descrição da função de onda longe do núcleo. É de particular importância para sistemas que possuem grande concentração de densidade eletrônica longe do núcleo. Por exemplo, moléculas com elétrons desemparelhados, ânions, sistemas carregados e moléculas no estado excitado. O uso da função difusa é normalmente denotado pelo símbolo + (apenas átomos pesados) ou ++ (átomos pesados e hidrogênio). No caso da notação 6-31+G(d) tem-se o conjunto de funções 6-31G(d) (discutido acima) acrescido de funções difusas para os átomos pesados, analogamente a função 6-31++G(d) apresenta funções difusas para os átomos pesados e para os átomos de hidrogênio.

### 2.1.3.3 Potencial efetivo de “caroço”

Nos cálculos de sistemas moleculares quanto maior o número de elétrons envolvidos maior será o número de funções de base necessárias para expandir os correspondentes orbitais moleculares, o que aumenta o custo computacional. Entretanto, para os sistemas com grande número de elétrons, a maioria deles é de camada interna (*core*), com destaque para os metais de transição. Esses elétrons do ponto de vista químico não são, a princípio, “importantes” por não estarem diretamente envolvidos na formação de ligações químicas. Portanto, uma aproximação muito utilizada para simplificar o número de funções de base consiste em substituir os orbitais internos por pseudopotenciais e tratar explicitamente somente os elétrons da camada de valência. Esses potenciais, denominados de ECP (*Effective Core Potentials*), são acompanhados de um conjunto de bases de valência, que varia de acordo com o pseudopotencial. Os ECP's podem também incluir efeitos relativísticos denominados RECP (*Relativistic Effective Core Potentials*), que tem importância para alguns átomos pesados. Os pseudopotenciais são conhecidos também como potenciais efetivos de caroço e existem diferentes potenciais descritos na literatura com formas analíticas normalmente baseadas em expansão de funções gaussianas.

$$U_{ECP}(r) = \sum_k d_k r^{n_k} e^{-\zeta_k r} \quad (2.21)$$

Os parâmetros  $d_k$ ,  $n_k$  e  $\zeta_k$  dependem do momento angular e são determinados pelo método dos mínimos quadrados. Para metais de transição os melhores resultados energéticos são encontrados considerando o espaço de valência uma camada abaixo da última camada.

A aproximação dos potenciais de caroço é muito usada principalmente para os metais de transição. Nos cálculos realizados para reação de análogos da cisplatina, a função de base usada para a platina foi um pseudopotencial, uma vez que o átomo de Pt contém 78 elétrons, sendo sua configuração (**Z=78**):  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^2 4p^6 4d^{10} 4f^{14} 5s^2 5p^6 5d^8 6s^2$ . A camada de valência é representada por: **5s<sup>2</sup> 5p<sup>6</sup> 5d<sup>8</sup> 6s<sup>2</sup>** e tratada explicitamente, o resto dos elétrons que formam o *core*, serão tratados pelo pseudopotencial, neste caso o LANL2DZ. Esse pseudopotencial foi desenvolvido por P. J. Hay e W. R. Wadt (Hay e Wadt, 1985), sendo os elétrons de valência tratados por um conjunto de bases (8s,6p,3d) → [3s,3p,2d].

Como já foi mencionado, o método é variacional, por consequência, quanto maior o número de funções de base usadas para expandir os orbitais moleculares, menor será a energia. Se o conjunto de função de base fosse completo então teríamos o resultado exato para a função de onda molecular dentro da aproximação de HF. Como esse conjunto completo é em geral infinito, ficamos limitados a uma base incompleta e a energia obtida é chamada energia SCF.

### 2.1.3 Limitação da teoria de Hartree-Fock e correlação eletrônica

A aproximação de Hartree-Fock não contempla as interações instantâneas entre dois elétrons, ou seja, seu movimento correlacionado não é propriamente tratado. A correlação eletrônica é geralmente definida como a diferença entre a energia exata (não relativística) e a solução da equação de HF no limite de um conjunto de funções de base completo.

$$E^{corr} = E^{exata} - E^{HF} \quad (2.22)$$

Quando se inclui a correlação eletrônica que leva em consideração o acoplamento dos movimentos eletrônicos individuais, contribui-se para a diminuição da repulsão elétron-elétron diminuindo a energia total.

Existem vários métodos que contém correlação eletrônica e que se baseiam no método de HF. Com exceção da teoria do funcional de densidade (DFT), que será brevemente discutida a seguir, todos os métodos correlacionados envolvem a mistura de funções de onda do estado fundamental com funções de onda dos estados excitados. Os métodos mais conhecidos são a Teoria de Perturbação de Muitos Corpos (MBPT - *Many Body Perturbed Theory*), Interação de Configuração (CI - *Configuration Integration*) e o método Coupled Cluster (CC)(Szabo, 1996; Jansen, 1999; Cramer, 2006; Morgon e Koutinho, 2007). Esses são os chamados métodos pós-Hartree-Fock, os quais não serão detalhados neste texto.

Todos esses métodos chamados pós-HF requerem necessariamente um maior custo computacional, como relatado na Tabela (2.1). O que torna a aplicação da maioria deles proibitiva, ou muito difícil, para sistemas moleculares maiores, como por exemplo, sistemas biológicos. Nesse sentido, a DFT tem se destacado como uma alternativa ao método HF e aos métodos pós-HF. A grande vantagem do método DFT é incluir um tratamento aproximado da correlação eletrônica por um custo computacional bem menor do que os métodos pós-HF, uma vez que a demanda computacional num calculo HF varia com  $N^4$  (ver Tabela 2.1), onde  $N$  é o número de funções de base usada na expansão dos orbitais moleculares (LCAO), nos métodos pós-HF variam com  $N^5$ - $N^7$  e no caso do DFT com  $N^3$ . Portanto, a DFT é uma alternativa para sistemas maiores sem perder qualidade nos resultados em comparação com o HF.

**Tabela 2.1.** Escala de cálculo como uma função do número de funções de base ( $N$ ) para vários métodos estrutura eletrônica (Cramer, 2006).

Escala	Método
$N^3$	DFT
$N^4$	HF
$N^5$	MP2
$N^6$	MP3, CISD
$N^7$	MP4
$N^8$	MP5, CISDT
$N^9$	MP6
$N^{10}$	MP7, CISDQT

### 2.2 TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE

Nos últimos anos a Teoria do Funcional de densidade (DFT) tem sido amplamente aplicada nos estudos de estrutura eletrônica de moléculas e sólidos. Os cálculos DFT demandam um menor custo computacional que métodos HF e pós-HF, em contrapartida apresenta resultados bastante similares a esses últimos métodos. Nesta seção apresentaremos uma breve introdução do formalismo da DFT, sendo que maior aprofundamento pode ser obtido num grande número de trabalhos (Ziegler, 1991; Morgon e Custodio, 1995; Duarte, 2001; Cramer, 2006; Morgon e Koutinho, 2007) que apresentam uma revisão da DFT e seu desenvolvimento que ocorre de fato, após os trabalhos de Hohenberg, Kohn e Sham por volta de 1964 (Hohenberg e Kohn, 1964; Kohn e Sham, 1965).

#### 2.2.1 O teorema de Hohenberg-Kohn

As bases da teoria do funcional de densidade estão no teorema de Hohenberg-Kohn (HK) (Hohenberg e Kohn, 1964). Este propõe que a energia eletrônica do estado fundamental ( $E_0$ ) e outras propriedades moleculares podem ser determinadas completamente a partir da densidade eletrônica deste estado ( $\rho_0$ ). A energia para o estado fundamental não degenerado é um funcional da densidade eletrônica,

$$E_0 = E_0[\rho_0] \quad (2.23)$$

O colchete denota o funcional e o subscrito zero representa o estado fundamental. A vantagem do tratamento proposto pelo formalismo da DFT sobre os outros métodos é baseada na ideia de que a função de onda para sistemas de  $n$  elétrons necessita de  $3N$  coordenadas para cada elétron e mais uma se o spin é incluído, ou seja,  $4N$  coordenadas para sua descrição. No entanto, a densidade eletrônica é uma função de  $3N$  coordenada independente do número de elétrons que constitui o sistema. Portanto, se a complexidade da função de onda aumenta com o número de elétrons, a densidade eletrônica permanece com o mesmo número de variáveis, independente do tamanho do sistema.

O teorema de HK confirma a existência de um funcional relacionando a densidade eletrônica e a energia do sistema, mas não descreve a forma desse funcional. A busca de funcionais capazes de conectar essas duas grandezas continuam sendo objeto de estudo no campo da DFT.

2.2.2 O formalismo de Kohn e Sham

Em 1965 Kohn e Sham (Kohn e Sham, 1965) propuseram um formalismo prático para resolver o teorema de Hohenberg-Kohn para um conjunto de elétrons interagentes, partindo de um sistema de referência fictício no qual existem apenas partículas independentes que não interagem entre si (Cramer, 2006), de tal modo que a densidade eletrônica gerada seja a mesma do sistema real original composto pelas partículas reais interagentes. A chave da aproximação de Kohn-Sham é que o funcional de energia cinética de um sistema pode ser dividido em duas partes: uma parte que pode ser calculada exatamente e que considera os elétrons como partículas que não interagem, e um pequeno termo de correção que inclui a contribuição da interação elétron-elétron.

Dentro do formalismo Kohn-Sham, a energia eletrônica do estado fundamental de um sistema de  $n$  elétrons e  $N$  núcleos pode ser escrita como:

$$E[\rho] = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \psi_i^*(r_1) \nabla_i^2 \psi_i(r_1) dr_1 - \sum_{X=1}^N \int \frac{Z_X}{r_{Xi}} \rho(r_1) dr_1 + \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E^{XC}[\rho] \quad (2.24)$$

Nesta equação  $\psi_i$  são os orbitais de Kohn-Sham. O primeiro termo representa a energia cinética dos elétrons não interagentes, o segundo termo considera a interação núcleo-elétron e o terceiro termo corresponde a repulsão de Coulomb entre a distribuição de carga total de  $r_1$  e  $r_2$ . Por fim o quarto termo é chamado de termo de troca e correlação, e representa a correção da energia cinética devido a natureza interagente dos elétrons e todas as correções não clássicas da repulsão elétron-elétron.

A conexão entre o sistema fictício e o real pode ser estabelecida quando a densidade eletrônica  $\rho(r)$  é escrita como a densidade eletrônica fundamental, dada por um conjunto de orbitais de um elétron (os orbitais de Kohn-Sham)(Morgon e Koutinho, 2007).

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^n |\psi_i(r)|^2 = \rho_0(r) \quad (2.25)$$

Os orbitais de Kohn-Sham são obtidos resolvendo as equações de Kohn-Sham. Isto pode ser obtido aplicando o princípio variacional para a energia eletrônica  $E[\rho]$  com a densidade de carga dada pela eq. (2.25).

$$\hat{h}_i \psi_i(r_1) = \varepsilon_i \psi_i(r_1) \quad (2.26)$$

$\hat{h}_i$  é o Hamiltoniano de Kohn-Sham e  $\varepsilon_i$  é a energia associada aos orbitais de Kohn-Sham. O Hamiltoniano pode ser escrito como:

$$\hat{h}_i = -\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_{X=1}^N \frac{Z_X}{r_{Xi}} + \frac{\rho(r_2)}{r_{12}} + V^{xc}(r_1) \quad (2.27)$$

Em que o termo  $V^{xc}$  é o potencial de troca e correlação, dado pela seguinte derivada funcional:

$$V^{xc}[\rho] = \frac{\delta E^{xc}[\rho]}{\delta \rho} \quad (2.28)$$

As equações (2.26), (2.27) e (2.28) representam o esquema Kohn-Sham autoconsistente-KS-SCF, *Kohn-Sham – Self Consistent Field* (Cramer, 2006; Morgon e Koutinho, 2007). Como o potencial depende da densidade eletrônica,  $\rho(r)$ , as equações de Kohn-Sham são resolvidas por meio de um procedimento autoconsistente.

Os orbitais de Kohn-Sham são expressos em termos de um conjunto de função de bases. Resolver essas equações corresponde a determinar os coeficientes em uma combinação linear de funções de base, de forma similar ao que é feito no cálculo de Hartree-Fock. Portanto, a escolha do conjunto de função de bases também é importante na DFT. A diferença é que a escala no HF varia com  $N^4$  onde  $N$  é o número de funções e na DFT varia com  $N^3$ , como mostrado na Tabela 2.1.

A equação de Kohn-Sham é capaz, a princípio, de produzir resultados exatos para energia, no entanto apresenta um funcional cuja forma analítica não é conhecida, o funcional de troca e correlação. Quando se compara as formulações da teoria do funcional da densidade e a Teoria de Hartree-Fock, a diferença mais significativa está no potencial de troca e correlação. A chave para obter um bom resultado com o método Kohn-Sham da DFT é

conseguir uma boa aproximação para a energia de troca e correlação. Existe um grande número de representações para esse termo e pesquisadores que trabalham no desenvolvimento de funcionais de troca e correlação. Entre as aproximações mais utilizadas para este termo está a aproximação da densidade local (LDA - *Local Density Approximatio*), e um aperfeiçoamento chamado aproximação do gradiente generalizado (GGA - *Generalized Gradient Approximation*).

### 2.2.3. Aproximação da densidade local

A LDA é baseada na teoria do gasosa de elétrons homogêneo, um sistema com densidade eletrônica  $\rho(r)$  não homogêneo, como uma molécula ou átomo, é tratado aproximando-se  $E^{XC}$  pelo valor correspondente ao gasosa de elétrons homogêneo com a densidade  $\rho(r)$ .

Na LDA o termo de troca e correlação é separado em duas parcelas:

$$E_{LDA}^{XC} = E^X[\rho] + E^C[\rho] \quad (2.29)$$

A primeira aproximação para o termo de troca,  $E^X[\rho]$ , foi proposta por A. M. Dirac em 1930 e foi usada junto com o modelo de Thomas-Fermi, no modelo de Thomas-Fermi-Dirac(Cramer, 2006):

$$E_{LDA}^X[\rho] = -C_X \int \rho(r)^{4/3} dr \quad (2.30)$$

Esta equação da LDA considera apenas sistemas de camada fechada, ou seja, todos os elétrons emparelhados. No entanto, a aproximação da densidade local de spin (LSDA), inicialmente proposta por Slater (Slater, 1951), representa a aplicação mais geral da LDA ao introduzir a dependência do spin no funcional. Quando considerada a densidade de spin a equação do funcional de troca passa a ser escrita como:

$$E_{LSDA}^X[\rho] = -2^{1/3} C_X \int (\rho_\alpha^{4/3} + \rho_\beta^{4/3}) dr \quad (2.31)$$

Nesta equação  $\alpha(m_s = 1/2)$  e  $\beta(m_s = -1/2)$  representam as funções de spins. Para sistemas de camada fechada,  $\alpha$  e  $\beta$  são iguais e a equação para LSDA é idêntica à equação para LDA.

Na aproximação da LDA não é conhecida nenhuma forma explícita da parte de correlação,  $E^C[\rho]$ . Entretanto diferentes formulações para este funcional foram desenvolvidas, como as apresentadas no trabalho de Ceperley e Alder (Ceperley e Alder, 1980). A forma mais utilizada foi desenvolvida por S. Vosko, L. Wilk and M. Nusair (Vosko, Wilk e Nusair, 1980), chamada VWM, e que incorpora os resultados de Monte Carlo de Ceperley (Ceperley, Whitlock e Kalos, 1979; Ceperley e Alder, 1980). Outros funcionais de correlação populares e mais recentes são os de Perdew (PL) (Perdew e Zunger, 1981).

#### 2.2.4. Aproximação do gradiente generalizado

Os sistemas não são homogêneos, ou seja, a densidade eletrônica é fortemente não uniforme no espaço. O método GGA leva em conta este efeito, produzindo um funcional de troca e correlação que depende não somente da densidade, mas também do gradiente da densidade,  $\nabla\rho(r)$ . Esses funcionais são os mais usados atualmente na DFT e podem ser escritos de forma generalizada como:

$$E_{GGA}^{XC}[\rho] = \int E^{XC}[\rho(r), \nabla\rho(r)] dr \quad (2.32)$$

Diferente da LDA, na aproximação GGA existem diferentes parametrizações possíveis para o termo  $\int E^{XC}[\rho(r), \nabla\rho(r)]$  que originam funcionais diferentes. Um grande número desses funcionais de troca GGA foi desenvolvido. Os mais comuns são os de Becke88 (B) (Becke, 1986), Perdew-Wang (Bairoch e Apweiler) (Perdew e Yue, 1986), Modified-Perdew-Wang (mPW) (Perdew e Yue, 1986), Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) (Perdew, Burke e Ernzerhof, 1996) entre outros. A eficácia desses funcionais depende muito do sistema para o qual são aplicados. Para a função de correlação na GGA também há várias formulações, alguns exemplos incluem Becke 88 (B88), Perdew 86 (Perdew e Zunger, 1981) e o popular Lee-Yang-Parr (LYP) (Lee, Yang e Parr, 1988).

Em geral esses métodos GGA apresentam boas vantagens sobre os métodos de densidade local. Mais recentemente uma nova classe de funcionais GGA foi desenvolvida, chamada de meta-GGA (M-GGA), eles dependem explicitamente, em maior ordem, do

gradiente da densidade, ou densidade de energia cinética, os quais envolvem derivadas dos orbitais de Kohn-Sham. Esses métodos ainda são bastante instáveis, mas têm apresentado melhores resultados na determinação de algumas propriedades energéticas. Exemplos desses funcionais, M-GGA incluem o B95 (Becke, 1996), KCIS (Krieger *et al.*, 1999), entre outros.

### 2.2.5 Funcionais de densidade híbridos

Os funcionais híbridos combinam a troca e correlação de métodos convencionais como GGA com parte do teorema de troca exato do método de Hartree-Fock. Um exemplo de funcional híbrido foi proposto por Becke (Becke, 1993):

$$E^{XC} = E_{GGA}^X + c_X E_{exato}^X + E_{GGA}^C \quad (2.33)$$

Há certo empirismo na determinação do fator peso dado a cada componente funcional misturado. O caminho usado para determinar essa proporção é a comparação com propriedades experimentais, como potencial de ionização, energia atômica total e outras calculadas para pequenas moléculas (Becke, 1996). Ainda assim os potenciais híbridos têm mostrado melhores resultados do que o GGA tradicional para muitas propriedades moleculares. Atualmente, são os mais usados nos cálculos de química quântica, sobretudo para moléculas. Alguns exemplos incluem: B3LYP (Becke, 1988b; 1996), B3P86 (Becke, 1988b; 1996), B3PW91 (Becke, 1988b; 1996), B98 (Hamprecht *et al.*, 1998), BH&HLYP (Becke, 1993; 1996), MPW1K (Adamo e Barone, 1998), mPW3LYP (Perdew, Burke e Ernzerhof, 1996; Adamo e Barone, 1998).

Os funcionais mais recentes estão ainda em desenvolvimento e são chamados híbridos-meta-GGA (HM-GGA). De forma generalizada esses métodos dependem do termo de troca de Hartree-Fock, da densidade eletrônica, do gradiente da densidade e da densidade de energia cinética. Exemplos de HM-GGA incluem: B1B95 (Becke, 1988b; 1996), BB1K (Becke, 1996; Adamo e Barone, 1998), MPW1B95 (Zhao e Truhlar, 2004), M05 (Zhao e Truhlar, 2004), M05-2x (Zhao, Schultz e Truhlar, 2006), M06 (Zhao, Yan e Truhlar, Donald G., 2008), M06-2x (Zhao, Yan e Truhlar, Donald G., 2008). Esses métodos têm mostrado superioridade aos outros formalismos, particularmente na determinação de barreiras de energia de reação.

Os desenvolvimentos na área da DFT continuam acontecendo, há uma constante busca por um funcional que englobe técnica, sofisticação, precisão e exatidão. Mas embora

os métodos HM-GGA e M-GGA sejam melhores que o GGA e LDA, os resultados variam muito de funcional para funcional. Além disso, como já foi mencionado, o desempenho dos funcionais não são uniformes e dependem muito do sistema estudado. Portanto, nestes casos ainda prevalece o bom senso e a análise crítica dos resultados e da própria literatura na escolha de um funcional para cálculos DFT.

### 2.3 MECÂNICA MOLECULAR

Todas as metodologias apresentadas neste capítulo apresentam suas vantagens e limitações. Os métodos baseados na Mecânica Molecular (MM) em particular são muito mais rápidos do que os métodos puramente quânticos, e por esse motivo são amplamente aplicados no estudo químico de sistemas biológicos, que devido ao tamanho elevado são na maioria das vezes proibitivos para métodos quânticos. No entanto, os métodos de MM não podem ser aplicados nos casos onde os processos ou propriedades de interesse dependem da distribuição eletrônica na molécula, ou seja, quando há quebra ou formação de ligações químicas. Os principais aspectos das metodologias de MM serão abordados nesta seção, com especial atenção ao campo de força da MM AMBER, que foi bastante explorado na execução do presente trabalho.

#### 2.3.1 Mecânica Clássica

Os métodos de mecânica molecular escrevem a energia do sistema como sendo uma função parametrizada das coordenadas nucleares. Isto é realizado negligenciando ambos os elétrons e aspectos quânticos do movimento nuclear. O modelo da mecânica clássica de estrutura molecular considera as moléculas como uma coleção de átomos ligados entre si por forças elásticas ou harmônicas. Estas forças são descritas pelas funções de energia potencial das contribuições estruturais, como comprimento de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros e interações não ligadas. A energia é então escrita como um somatório dessas diferentes contribuições, na qual cada termo é uma função individual previamente parametrizada para um dado conjunto de tipos de átomos. O conjunto dessas funções é conhecido como campo de força empírico. Os parâmetros envolvidos são normalmente derivados de dados experimentais ou de cálculos com alto nível de teoria (DFT, HF) para sistemas modelos pequenos.

## 2.3.2 Aspectos gerais dos campos de força da mecânica molecular

Os campos de força são baseados em três conceitos principais: a forma funcional usada para modelar as interações moleculares; os tipos de átomos que servem para diferenciar o mesmo em situações diferentes; e o conjunto de parâmetros associados aos tipos de átomos. Esse campo de força representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas, esse potencial pode ser representado pelo somatório:

$$E_{MM} = E_{est} + E_{ang} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{ele} \quad (2.34)$$

Onde os termos componentes são, na ordem, estiramento de ligação; deformação angular; torção; termos cruzados provenientes das torções; interações (atração e repulsão) de van der Waals entre os átomos não ligados e interações eletrostáticas entre os átomos. Todos esses termos serão discutidos brevemente nesta seção.

## 2.3.2.1 Estiramento da ligação

A energia potencial de estiramento  $E_{est}$  é a soma das energias potenciais necessárias para deformação de cada ligação da molécula, sendo a soma feita sobre todos os átomos ligados. A escolha mais simples para tratar o potencial de estiramento é utilizar a aproximação harmônica, na qual  $V_{est}$  será a função quadrática do deslocamento do comprimento de ligação  $r$  a partir do seu ponto de referência ou equilíbrio  $r_0$ .

$$V_{est,r} = \frac{1}{2} k_r (r - r_0)^2 \quad (2.35)$$

Onde  $k_r$  é a constante de força da vibração correspondente.

A maioria dos campos de força comumente utiliza a aproximação do oscilador harmônico, que descreve a vibração molecular muito bem, sobretudo próximo da região de equilíbrio  $r_0$ .

## 2.3.2.2 Deformação angular

A energia potencial de deformação angular  $E_{ang}$  é a energia necessária para tirar um ângulo formado por três átomos do seu valor de equilíbrio,  $\theta_0$ . A aproximação mais comum é um potencial harmônico:

$$V_{ang,\theta} = \frac{1}{2} k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.36)$$

Analogamente a equação anterior para o estiramento,  $k_{\theta}$  é a constante de força associada à deformação angular e  $\theta$  e  $\theta_0$  são o valor do ângulo e o valor do ângulo de equilíbrio, respectivamente. O desempenho desse termo pode ser melhorado incluindo termos de ordem maior, como é o caso do campo de força MM2 desenvolvido por N. L. Allinger e colaboradores (Allinger, 1977). Esse campo de força considera termos cúbicos além do termo quadrático.

### 2.3.2.3 Termo de torção

O termo  $E_{tors}$  é a energia de torção associada à rotação em torno de uma ligação J-K, como mostrado na Figura 2.1. O ângulo de torção ou ângulo diedro é definido como aquele formado entre a ligação K-L e a ligação J-I (Figura 2.1). A forma comumente usada para descrever esse termo é usando uma função periódica escrita em termos de uma função cosseno, que expandida numa série de Fourier truncada no terceiro termo é escrita como:

$$V_{tors,\varphi} = \frac{1}{2} [V_1(1 + \cos\varphi) + V_2(1 + \cos 2\varphi) + V_3(1 + \cos 3\varphi)] \quad (2.37)$$

Nesta equação  $\varphi$  é o ângulo diedro definido pelos átomos ijkl e  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  são as constantes de força da torção dependentes dos tipos de átomos e que podem ser determinados a partir de dados experimentais ou através de métodos de mecânica quântica.

Os termos referentes à energia de estiramento, energia de torção e energia de deformação angular são ilustrados na Figura 2.1.

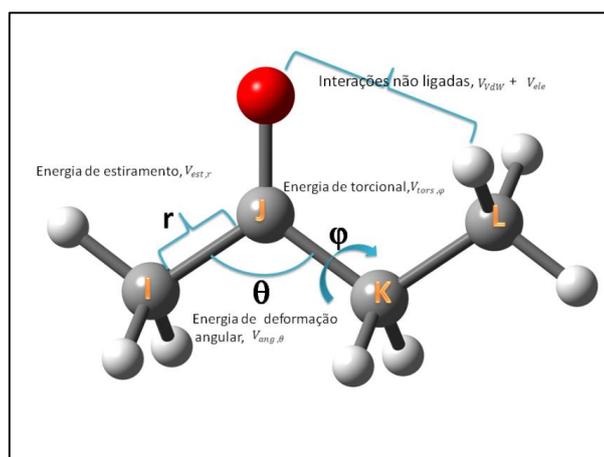
### 2.3.2.4 Interações eletrostáticas

As interações eletrostáticas são usadas para átomos não ligados. Numa molécula em geral haverá maior concentração de elétrons em algumas partes, o que classicamente pode

ser representado por cargas parciais sobre o átomo. A energia eletrostática tem papel fundamental nas interações moleculares. O termo mais importante na energia eletrostática é a interação carga-carga. A forma funcional geralmente utilizada para esse termo é o potencial de Coulomb. De acordo com esse funcional a carga atômica é atribuída átomo a átomo, assim a interação eletrostática entre diferentes moléculas ou diferentes partes da mesma molécula é dada pelo somatório sobre pares de átomos, calculada de acordo com a equação de Coulomb abaixo:

$$V_{ele} = \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (2.38)$$

A energia eletrostática é então função das cargas atômicas ( $q_i, q_j$ ), da distância entre o par de átomos  $i$  e  $j$  e da constante dielétrica do meio,  $\epsilon$ . A principal diferença no cálculo dos termos de energia eletrostática entre os diferentes campos de força está na forma como as cargas são calculadas. As cargas podem ser obtidas através de cálculos de mecânica quântica ou métodos semiempíricos. Vários tipos de cargas atômicas estão disponíveis de acordo com o método usado. Alguns exemplos incluem: cargas de Mulliken (Mulliken, 1962), NBO (Reed, Curtiss e Weinhold, 1988), RESP (Bayly *et al.*, 1993), cargas de Gasteiger (Gasteiger e Marsili, 1980).



**Figura 2.1** Alguns termos da equação de MM.

### 2.3.2.5 Interação de van der Waals

As interações de van der Waals são mais um tipo de interação entre os átomos não ligados. Das interações entre espécies quimicamente não ligadas a energia de van der Waals contempla as energias de indução e dispersão. A energia de indução vem da interação entre os momentos de multipolos permanentes de uma molécula e os momentos induzido de outra e é sempre atrativo. Já a energia de dispersão vem da interação entre os multipolos induzidos das duas moléculas e também é sempre atrativo. Alguns campos de força descrevem essas interações através do potencial de Lennard-Jones, o qual pode escrito como:

$$V_{vdw} = \sum_{ij} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \quad (2.39)$$

Nesta equação  $r_{ij}$  é a distancia entre os pares atômicos  $i$  e  $j$ . Os termos  $A_{ij}$  e  $B_{ij}$  são constantes dados por:

$$A_{ij} = \left( \frac{r_i^*}{2} + \frac{r_j^*}{2} \right)^{12} \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \quad e \quad B_{ij} = 2 \left( \frac{r_i^*}{2} + \frac{r_j^*}{2} \right)^6 \quad (2.40)$$

Nesta equação  $r_i^*$  e  $r_j^*$  são os raios de van der Waals para os átomos  $i$  e  $j$ , os termos  $\varepsilon_i$  e  $\varepsilon_j$  são os parâmetros de Lennard-Jones correspondente. O termo  $A_{ij}$  pode ser determinado da polarizabilidade medida experimentalmente ou calculada. O termo  $B_{ij}$  pode ser obtido de dados cristalográficos. Para distâncias muito curtas (menores que o somatório do raio de van der Waals para o par de átomos  $i$  e  $j$ ) as interações dadas pela eq. (2.39) são altamente repulsivas devido à superposição da densidade eletrônica. O primeiro termo da eq. (2.39) varia com o inverso de  $r_{ij}^{12}$  e descreve a repulsão e o segundo termo que varia com o inverso de  $r_{ij}^6$  descreve as atrações de longo alcance.

### 2.3.3 Campos de força da mecânica molecular

Todos os parâmetros apresentados no texto acima são importantes para os cálculos com mecânica molecular. Entretanto esses parâmetros são definidos de maneira distinta em cada campo de força de acordo com a parametrização de cada tipo de átomo ou grupo de átomos em cada sistema químico. O tipo de átomo é um conceito que define o ambiente químico do mesmo na molécula. As principais informações usadas na definição do tipo de

átomo são o número atômico dos átomos que se ligam ao átomo de referência, bem como o tipo de ligação. Por exemplo, um carbono  $sp^2$  tem representação diferente de um carbono  $sp$ ,  $sp^3$  ou ainda um carbono de anel aromático ou de carbonila. Os conjuntos de parâmetros associados a estes tipos de átomos são obtidos através de ajustes das constantes do funcional através de vários dados experimentais. Dada a dificuldade em se obter alguns parâmetros experimentalmente e também da necessidade de um grande número desses dados, pelo menos três a quatro independentes para cada parâmetro, alguns campos de força mais recentes têm se aproveitado de cálculos de estrutura eletrônica de alto nível para ajustar seus parâmetros.

É importante comentar sobre o conjunto de moléculas utilizadas para a parametrização. Alguns campos de força são mais abrangentes, podendo ser usados com boa precisão para cálculo de energia de várias moléculas. Outros campos de força são parametrizados apenas para um conjunto específico de moléculas como é o caso de campos como o AMBER (Weiner *et al.*, 1984; Cornell *et al.*, 1995) parametrizado para proteínas e ácidos nucleicos. Alguns campos de força usam os mesmos parâmetros para todos os tipos de átomos, são ditos campo de força universal, é o caso do UFF(Cox e Lloyd, 1975). A Tabela 2.2 descreve alguns campos de força conhecidos e a que tipos de moléculas são geralmente empregados.

**Tabela 2.2** Comparação entre os campos de força mais comuns.

<i>Campos de força</i>	<i>Moléculas</i>
EAS	Alcanos
EFF	Alcanos
MM2	Alcanos
MM3	Geral
MM4	Geral
CFE 93/95	Hidrocarbonetos
MMFF94	Geral
DREIDING	Geral
AMBER	Proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos
OPLS	Proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos
CHARMM	Proteínas
GROMOS	Proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos
MOMEK	Compostos com metais
ESFF	Geral
UFF	Geral

Devido ao grande interesse no estudo de sistemas biológicos geralmente, proibitivos para cálculos puramente quântico, muito esforço foi devotado no sentido de obter e melhorar campos de força viáveis computacionalmente e que fossem parametrizados especificamente para esses sistemas. Neste sentido alguns campos de força como AMBER (Weiner *et al.*, 1984; Cornell *et al.*, 1995), CHARM (Mackerell, Wiorkiewicz-Kuczera e Karplus, 1995; Mackerell, 1998; Mackerell *et al.*, 1998), GROMOS (Daura, Mark e Van Gunsteren, 1998; Scott *et al.*, 1999; Kunz *et al.*, 2012; Schmid *et al.*, 2012) e OPLS (Jorgensen e Tiradorives, 1988; Jorgensen, Maxwell e Tiradorives, 1996) são os mais comumente parametrizados para sistemas como proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos.

Todos esses campos de força aplicados em simulação de sistemas biológicos usam uma função potencial que é função de pares de átomos. Eles aplicam a aproximação harmônica para ligações e ângulos, uma série de Fourier para torções e termo de van der Waals e Coulomb para interações de átomos não ligados. A principal diferença entre eles está em como são parametrizados. No entanto, o AMBER e o CHARM são os campos de força mais populares no estudo de sistemas biológicos. Na próxima seção, os principais princípios associados ao campo de força AMBER serão apresentados e discutidos.

### 2.3.3.1 Campo de força AMBER

O campo de força AMBER (*do inglês Assisted Model Building and Energy Refinement*) foi desenvolvido por P. Kollman e seus colaboradores (Weiner *et al.*, 1984; Cornell *et al.*, 1995) para o cálculo de proteínas e ácidos nucleicos.

Atualmente o campo de força AMBER se refere a uma família de campos de força. Diferentes esquemas de parametrização foram usados para representar peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (FF94, FF96, F98, F99, F99EP, FF02, FF02EP, FF03)(Cornell *et al.*, 1995); o GAFF (Generalized AMBER force Field) contém parâmetros para moléculas orgânicas e o GLYCAM (GLYCAM2000, GLYCAM04EP) desenvolvido para carboidratos.

No campo de força AMBER os termos de estiramento de ligação e deformação angular são calculados usando a aproximação harmônica incluindo apenas termos quadráticos. Os termos referentes à torção são determinados por uma série de Fourier truncando no sexto termo. As interações de van der Waals são aproximadas pelo potencial de Lennard-Jones. A fórmula de Coulomb é considerada para o cálculo do potencial de interação eletrostático. Os tipos de cargas variam com a versão do campo de força usado, mas para a maioria dos campos de força AMBER as cargas parciais são obtidas usando o

método RESP (Bayly *et al.*, 1993) a partir da geometria obtida no nível de teoria HF/6-31G(d).

A energia potencial para o AMBER pode ser escrita na forma:

$$U(\vec{R}) = \sum_{\text{ligações}} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\varphi - \delta)) + \sum_{\text{não-ligados}} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (2.41)$$

Nesta equação  $K_r$ ,  $K_\theta$  e  $V_n$  representam as constantes de força de estiramento e deformação angular e o potencial de torção, respectivamente.  $r$ ,  $\theta$  e  $\varphi$  são comprimento de ligação, ângulo de ligação e angulo diedro, quando estão com subscrito zero representam os valores de equilíbrio para os termos individuais.

## 2.4 DINÂMICA MOLECULAR

Simulação de Dinâmica Molecular é uma das técnicas mais versáteis no estudo de biomoléculas. Ao longo dos anos ocorreu um desenvolvimento computacional significativo, bem como grandes avanços nos algoritmos de DM proporcionando uma maior eficiência das simulações.

Atualmente, as simulações de DM são aplicadas com certa facilidade para investigar estrutura, dinâmica e termodinâmica de sistemas biológicos. Esses cálculos representam uma forte ferramenta computacional no estudo da química de sistemas macromoleculares, sobretudo porque permitem o estudo de propriedades dinâmicas dos sistemas. Dentro das aplicações mais importantes da DM para sistemas biológicos estão o estudo da estabilidade das proteínas, mudanças conformacionais, interação com substratos (Karplus e Mccammon, 2002; Warshel, 2002), bem como podem ainda ser aplicadas no auxílio ao desenho de novas drogas e na determinação de estruturas de RMN e Raios X.

## 2.4.1 Princípios Básicos da DM

A metodologia de DM é fundamentada na mecânica clássica e fornece propriedades dinâmicas dependentes do tempo para todos os átomos individuais que compõem o sistema. A simulação de DM gera sucessivas configurações do sistema através da integração numérica das equações de movimento de Newton.

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (2.42)$$

Esta equação descreve a trajetória de uma partícula de massa  $m_i$ , ao longo da coordenada  $x_i$  submetida a uma força  $F_{x_i}$ . A partir do conhecimento da força que atua em cada átomo pode-se determinar a aceleração de cada átomo do sistema. Integrando as equações de movimento de Newton é possível obter as velocidades e as novas posições dos átomos. Com as novas velocidades e posições calcula-se a energia cinética e potencial do sistema. Aplicando este procedimento obtém-se um conjunto de posição e velocidade de cada partícula ao longo do tempo, chamado de trajetória. O método acima descrito é determinístico, uma vez conhecida a velocidade e posição de cada partícula, o estado do sistema pode ser assim determinado para qualquer tempo, tanto no presente quanto no futuro.

A grande dificuldade para se obter a energia potencial através das equações de Newton é que não existe solução analítica para essas equações, as quais são resolvidas numericamente. A integração dessas equações de movimento é realizada através de algoritmos baseados no método das diferenças finitas. A integração é dividida em pequenos intervalos de tempo,  $\delta t$ , chamados de passo de integração, permitindo simular os movimentos de maior frequência do sistema que muitas vezes são as vibrações das ligações. Os algoritmos mais populares são os de Verlet (Verlet, 1967), o algoritmo Leap-frog (Eastwood, Hockney e Lawrence, 1980) e ainda outros como Verlet-velocidade e o algoritmo de Beeman (Beeman, 1976).

O algoritmo de Verlet utiliza as posições ( $r$ ) e acelerações ( $a$ ) dos átomos no tempo  $t$  e as posições do passo anterior,  $t-\delta t$ , para determinar as novas posições no tempo  $t+\delta t$ , de acordo com a equação abaixo:

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + \frac{F(t)}{m} \delta t^2 \quad (2.43)$$

Essa equação surge do fato que no método de Verlet, se a posição do centro de massa da partícula  $i$  no tempo  $t$  é  $r_i(t)$ , as posições nos tempos  $t \pm \delta t$  são dadas por uma expansão de Taylor ao redor de  $r_i(t)$ , uma expansão para frente (eq. (2.44)) e outra para trás (eq. (2.45)):

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.44)$$

$$r(t - \delta t) = r(t) - v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.45)$$

Somando as duas equações acima se obtêm a eq. (2.43). Este método usa velocidades ( $v$ ) não explícitas e requer um único cálculo das forças por ciclo de integração, apresentando uma precisão modesta.

O algoritmo Leap-frog é uma modificação do algoritmo de Verlet, tendo as mesmas propriedades, porém maior precisão. Na aproximação Leap-frog as velocidades ( $v$ ) são calculadas na metade do intervalo de  $(\delta t/2)$ , sendo a primeira calculada em  $t+\delta t/2$  e então usando esta velocidade calcula-se a posição  $r$  no tempo  $t+\delta t$ , como mostrado na equação abaixo:

$$v\left(t + \frac{1\delta t}{2}\right) = v\left(t - \frac{1\delta t}{2}\right) + a(t)\delta t \quad (2.46)$$

$$r(t + \delta t) = r(t) + v\left(t + \frac{1\delta t}{2}\right)\delta t \quad (2.47)$$

Este algoritmo é significativamente mais preciso e também computacionalmente bastante mais expansivo que o algoritmo de Verlet.

#### 2.4.2 Passo de integração e a manutenção da geometria

O passo de integração (chamado de *time step*) é um fator importante para o processo da simulação de DM. Um passo muito pequeno resulta num aumento do custo computacional e limita o espaço de fase que pode ser explorado. Um passo muito longo pode levar a instabilidade nos algoritmos de integração devido a mudanças rápidas nas forças. Geralmente, considera-se que o limite superior do passo de integração é aquele que permite simular bem o movimento mais rápido do sistema, ou seja, aqueles de frequências mais elevadas. Em sistemas biomoleculares as vibrações de maior frequência estão associadas ao estiramento das ligações envolvendo átomos de hidrogênio da ordem de 10fs (por exemplo, para ligação C-H). O passo de integração deve ser pelo menos uma ordem de magnitude menor que este movimento, portanto o passo recomendado é de 1fs.

Os movimentos de alta frequência limitam o tamanho do passo de integração, mas geralmente esses movimentos não afetam o comportamento global do sistema. Uma solução para aumentar o passo de integração é congelar as vibrações de maior frequência aplicando vínculos para as ligações correspondentes de maneira a preservar o comprimento das ligações nos seus valores de equilíbrio, sem afetar os graus de liberdade restantes. São então estabelecidas constrictões sobre as distancias de ligação e ângulos, ou restrições sobre as posições.

O método mais comum usado para manter a geometria ou parte dela na simulação de DM é o algoritmo SHAKE (Ryckaert, Ciccotti e Berendsen, 1977). Neste método as equações de movimento dos sítios são descritas inserindo termos de força que agem para preservar os comprimentos das ligações. Assim a equação de movimento de um átomo  $i$  de uma molécula com  $n$  sítios pode ser dada por:

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} m_i = F_i(t) + \sum_{j \neq i}^n \gamma_{ij}(t) \quad (2.48)$$

Onde o termo  $\gamma_{ij}$  é a força de vínculo que mantém rígida a ligação entre os sítios  $i$  e  $j$ .

O uso do algoritmo SHAKE para fixar ligações de hidrogênio com átomos pesados tem sido rotineiramente aplicado na simulação de DM de proteínas. Este uso permite definir um passo de integração de 2fs que resulta numa redução considerável do custo computacional.

#### 2.4.3 Condições periódicas de contorno e raio de corte

Os sistemas simulados com DM possuem normalmente  $10^2$ - $10^6$  partículas, e são relativamente pequenos em escala macroscópica de modo que boa parte dos átomos encontra-se rodeado pelo vácuo. A maneira mais comum de minimizar esse efeito de fronteira é usar as chamadas condições periódicas de fronteira (*Periodic Boundary Conditions, PBC*). Neste método o sistema é colocado dentro de uma caixa (cíclica, retangular, octaédrica) que é replicada em todas as direções do espaço. Durante a simulação se um átomo sair da caixa original sua imagem entra pela face oposta da caixa, com a mesma velocidade e assim o número total de átomos na caixa central e no sistema como um todo é conservado. Desta forma não há fronteiras no sistema e as condições indesejadas de um sistema isolado, bem como o efeito de superfície são substituídos por condições periódicas.

Como consequência do uso das condições periódicas de fronteira um raio de corte (chamado *cutoff*) é usado para evitar a interação da partícula com sua própria imagem ou com a mesma partícula duas vezes. Isso é feito truncando o potencial em um raio de corte esférico, geralmente da ordem de  $L/2$  ( $L$  é a largura da célula), que significa tipicamente 8 ou 10 Å para simulações em caixa de águas, ou 16 Å para simulações em solvente implícito.

#### 2.4.4 Tratamento das interações de longo alcance

O uso do raio de corte resulta num tratamento inapropriado das interações de longo alcance, como as interações eletrostáticas, que decaem com o inverso da distância. O

potencial de Coulomb usado para tratar essas interações de longo alcance decai com a distância que é menor que  $r^{-n}$  ( $n$  é a dimensão do sistema). O truncamento abrupto desse potencial leva a problemas na estabilidade da simulação (Schreiber e Steinhauser, 1992; York *et al.*, 1995).

Diferentes métodos foram desenvolvidos para contornar esse problema com as interações de longo alcance. Dentre os métodos está o método das soma de Ewald e o método do campo de reação (Tironi *et al.*, 1995). O método mais usado é o das somas de Ewald, que foi introduzido como uma técnica para somar interações de longo alcance entre diferentes partículas incluindo as várias imagens dentro do sistema periódico. De forma geral, o termo correspondente às interações de longo alcance converge rapidamente no espaço recíproco, enquanto transformadas de Fourier fornecem a energia potencial da interação de uma partícula com suas imagens periódicas.(Morgon e Koutinho, 2007)

Algumas variações do método das somas de Ewald são comuns nos programas de DM. Entre eles destaca-se o Particule Mesh Ewald (PME)(Essmann *et al.*, 1995), que mantém a eficiência e precisão dos cálculos, mas com mais rapidez no protocolo computacional e está implementado no pacote AMBER.

### 2.5 MÉTODOS PARA O CÁLCULO DA ENERGIA LIVRE DE ASSOCIAÇÃO

A energia livre de Gibbs é de grande importância para o estudo de reações químicas, uma vez que a maioria das reações é estudada a pressão constante. No entanto, esta é uma das propriedades mais difíceis de serem determinadas (Wang *et al.*, 2001; Simonson, Archontis e Karplus, 2002). A simulação da energia livre fornece uma ligação entre as propriedades macroscópicas que podem ser medidas e os fenômenos microscópicos dos sistemas químicos e biológicos. Por isso o cálculo da energia livre tem tido uma grande aplicação de simulações moleculares. Nesse sentido, muitas pesquisas são realizadas na busca pelo refinamento dos métodos usados para o cálculo da energia (Steinbrecher e Labahn, 2010). A integração termodinâmica (*Thermodynamic Integration - TI*) e a perturbação de energia livre (*Free Energy Perturbation - FEP*) são os métodos mais rigorosos usados para o cálculo da energia livre. Os métodos FEP e TI são considerados de primeira escolha para o cálculo da energia de interação proteína-ligante. No entanto, ambos são computacionalmente caros limitando sua aplicação principalmente no caso de sistemas grandes. Outras aproximações foram desenvolvidas para estimar a energia livre mais rapidamente e com precisão aceitável (Ajay e Murcko, 1995; Steinbrecher e Labahn, 2010). Entre esses métodos o mais popular é o MM-PBSA (*molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area method*)(Massova e Kollman, 2000; Swanson, Henchman e Mccammon, 2004; Kuhn *et al.*, 2005). Nessa seção serão apresentados os princípios associados à aplicação desses métodos no estudo de interações proteína-ligante. Uma extensiva revisão sobre o cálculo de energia livre pode ser encontrada na literatura (Straatsma e Mccammon, 1992; Lamb e Jorgensen, 1997; Kollman *et al.*, 2000; Van Gunsteren, Daura e Mark, 2002; Gumbart, Roux e Chipot, 2013).

#### 2.5.1 Os métodos FEP e TI

Tanto o TI quanto o FEP são métodos rigorosos para se calcular teoricamente a energia livre de ligação que não dependem de nenhum parâmetro empírico além dos já presentes nos campos de força da MM. No FEP, a energia é computada do valor esperado da diferença de energia entre dois estados dada pelo fator de Boltzmann. No TI, a energia livre é calculada do valor esperado da derivada da energia em relação ao parâmetro de acoplamento (Morgon e Koutinho). Na literatura estão disponíveis trabalhos de revisão dos

métodos FEP e TI (Straatsma e Mccammon, 1992; Kollman, 1993; Aleksandrov e Simonson, 2009; Steinbrecher e Labahn, 2010).

De acordo com o método da perturbação termodinâmica, inicialmente proposto por Zwanzig (Zwanzig, 1954), a diferença da energia livre entre um estado de referência A e um estado perturbado B é dado por:

$$\Delta G = G_B - G_A = -kT \ln \left\langle \exp \left( -\frac{\Delta V}{kT} \right) \right\rangle_A \quad (2.49)$$

Onde  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura em Kelvin e  $\Delta V$  é a diferença de energia potencial entre o estado de referência e o estado perturbado. A eq. (2.49) indica uma média calculada num *ensemble* gerada da DM ou ainda de uma simulação de Monte Carlo.

Como a amostragem é feita no estado de referência A, só é obtida uma boa convergência para o cálculo da média  $\left\langle \exp \left( -\frac{\Delta V}{kT} \right) \right\rangle_A$  se o estado perturbado B for semelhante ao estado A. Um possível problema de convergência apresentado pela eq. (2.49), principalmente se os estados A e B forem razoavelmente diferentes, pode ser superado recorrendo à aproximação do parâmetro de acoplamento. Nesta aproximação é definido um caminho entre os dois estados pela introdução de um conjunto de funções de energia potencial intermediárias construídas como uma combinação linear do potencial do estado inicial e final ( $V_A, V_B$ ).

$$V_m = (1 - \lambda_m)V_A + \lambda_m V_B \quad (2.50)$$

Nesta equação  $\lambda_m$  é o parâmetro de acoplamento que varia de 0 a 1.

A validade desta aproximação é fundamentada no fato da energia livre ser uma função de estado, que pode ser definida pelos estados inicial e final e calculada ao longo de um caminho reversível que liga esses dois estados. De modo que a mudança na energia livre total de  $\lambda = 0$  até  $\lambda = 1$  pode ser obtida a partir do somatório das mudanças da energia para os vários valores de  $\lambda$ , como mostrado abaixo:

$$\Delta G = G_B - G_A = -\frac{1}{\beta} \sum_{m=1}^{n-1} \ln \left\langle \exp[-\beta(V_{m+1} - V_m)] \right\rangle_m \quad (2.51)$$

$$\beta = \frac{1}{kT} \quad (2.52)$$

Esta equação é usada para representar a aproximação da perturbação de energia, FEP. O método da integração termodinâmica é baseado na seguinte equação:

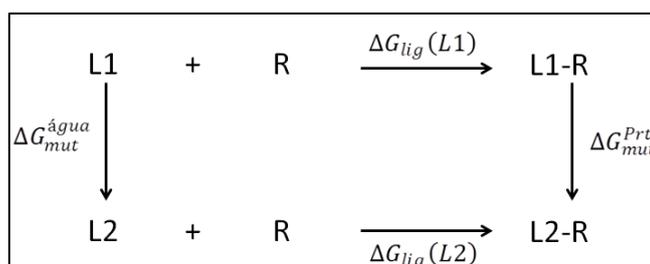
$$\Delta G = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \quad (2.53)$$

Assumindo que o potencial intermediário  $V_m$  é definido como uma combinação linear de  $V_A$  e  $V_B$  a equação acima pode ser reescrita na forma:

$$\Delta G = \int_0^1 \langle \Delta V_m \rangle_{\lambda} d\lambda \quad (2.54)$$

Na prática a integral é aproximada por uma soma sobre intervalos discretos em  $\lambda$ . As simulações são realizadas para diferentes valores  $\lambda$  entre 0 e 1 e a média de *ensemble* é determinada para cada valor de  $\lambda$ . Essas simulações podem ser realizadas na direção direta (0→1) ou na direção reversa (1→0), sendo a diferença entre a simulação direta e reversa é chamada de *histerese* e é a medida da incerteza estatística da integração.

Em princípio as metodologias FEP e TI deveriam chegar ao mesmo resultado, pelo fato da energia livre ser uma função de estado. No estudo de interações proteína-ligante, geralmente, essas metodologias são aplicadas para calcular a diferença de energia livre de ligação entre dois ou mais ligantes (L1, L2) e uma proteína alvo (R). Essa diferença de energia pode ser obtida de acordo com o ciclo termodinâmico abaixo:



**Figura 2.2** Exemplo de um ciclo termodinâmico usado nos métodos FEP e TI para o cálculo da energia livre de ligação relativa entre L1 e L2 com a proteína receptora R.

Na Figura acima  $\Delta G_{mut}^{Prt}$  e  $\Delta G_{mut}^{água}$  representam a diferença de energia entre os ligantes L1 e L2 quando ligados no sítio da proteína e em água, respectivamente. Os termos  $\Delta G_{lig}(L2)$  e  $\Delta G_{lig}(L1)$  correspondem à energia de ligação. A partir desse ciclo é possível obter a energia relativa de ligação ( $\Delta\Delta G_{lig}$ ) como:

$$\Delta\Delta G_{lig} = \Delta G_{lig}(L2) - \Delta G_{lig}(L1) = \Delta G_{mut}^{Prt} - \Delta G_{mut}^{água} \quad (2.55)$$

A aplicação das metodologias FEP e TI é limitada ao fato dos ligantes L1 e L2 apresentarem similaridade estrutural para diminuir problemas de cálculo, que exige pequenas perturbações. Por isso esses métodos são usados para determinar a energia de ligação relativa entre ligantes similares, caso contrário o uso do FEP e TI devem ser evitados.

Os resultados obtidos com os métodos FEP e TI apresentam excelente acordo com dados experimentais, como mostrado por vários estudos (Straatsma e Mccammon, 1992; Aleksandrov e Simonson, 2009; Perez, Fernandes e Ramos, 2010; Steinbrecher e Labahn, 2010). No entanto, esses métodos demandam de um alto custo computacional, devido ao grande tempo de cálculo necessário para executá-los. Esse fato torna muitas vezes proibitivo aplicá-los quando há um número grande de ligantes sendo investigados. Nestes casos a aplicação de outras metodologias mais rápidas e capazes de prever a energia livre de ligação é recomendável. Dentre os diferentes métodos para o cálculo da energia livre de forma mais simplificada o MM-PBSA (Kollman *et al.*, 2000) têm sido bastante usado e será brevemente discutido abaixo.

### 2.5.2 O método MM-PBSA

O MM-PBSA é um método para calcular a energia livre de ligação a partir de um número finito de estruturas representativas extraídas da trajetória resultante do processo de DM (Swanson, Henchman e Mccammon, 2004; Kuhn *et al.*, 2005). No MM-PBSA o efeito do solvente é incluído apenas de forma implícita, isto é através do uso de uma constante dielétrica apropriada. Neste sentido pode ser aplicado tanto para trajetórias geradas por simulações de DM realizadas em solvente explícito com condições periódicas de fronteira e com contra-íons quanto para simulações em solvente implícito. Uma vez que nesse método um conjunto de configurações do soluto é obtido da DM com solvente explícito, ou não, e

todas as moléculas do solvente são eliminadas. De acordo com o MM-PBSA a energia livre é calculada a partir da equação seguinte:

$$\Delta G = E_{MM} - T\Delta S + \Delta G_{solv} \quad (2.56)$$

A energia de mecânica molecular ( $E_{MM}$ ) é calculada para cada configuração no vácuo com o mesmo campo de força usado na simulação da DM, como descrito na eq. (2.34). A diferença é que na simulação de DM os termos não ligantes são calculados para todas as interações observadas num determinado raio de corte pré-definido; para efeitos de cálculo destas componentes no MM-PBSA, o raio de corte considerado é infinito, ou seja, todas as interações não ligantes presentes no sistema são incluídas. Tanto a energia molecular ( $E_{MM}$ ) quanto à energia de solvatação ( $\Delta G_{solv}$ ) são calculadas como uma média sobre um número finito de estruturas representativas extraídas da trajetória resultante da DM.

A entropia conformacional ( $T\Delta S$ ) do soluto, incluindo contribuições translacionais, rotacionais e vibracionais, pode ser estimada por análise de modos normais (Srinivasan *et al.*, 1998). Este é o termo da eq. (2.56) cujo cálculo é mais exigente do ponto de vista computacional. No entanto, em aplicações típicas de MM-PBSA este termo é frequentemente desprezado.

A energia livre de solvatação ( $\Delta G_{solv}$ ) do sistema é obtida para cada estrutura intermediária como uma soma de duas contribuições: uma contribuição eletrostática  $G_{PB}$ , dada pela resolução numérica da equação de Poisson-Boltzmann (Warwicker e Watson, 1982; Gilson e Honig, 1988; Honig e Nicholls, 1995) e uma contribuição não polar Não Polar  $G_{n\tilde{a}o-polar}$ , expressa sob a forma de um termo dependente da área acessível ao solvente (*Surface Area, SA*)(Tannor *et al.*, 1994).

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{n\tilde{a}o-polar} \quad (2.57)$$

A equação de Poisson-Boltzmann, que serve de base para o cálculo da componente eletrostática da energia livre de solvatação é dada por:

$$\nabla\epsilon(r)\nabla\phi(r) - k'\phi(r) = -4\pi\rho(r) \quad (2.58)$$

Onde  $\phi(r)$  é o potencial eletrostático,  $\epsilon(r)$  é a constante dielétrica do meio,  $\rho(r)$  é a densidade de carga do soluto e  $k'$  é o inverso do comprimento de Debye-Huckel. As derivadas da equação de Poisson-Boltzmann são determinadas através de uma formula de diferenças finitas, resolvida de forma iterativa até que seja alcançado um determinado parâmetro de convergência. Este método está implementado em vários programas, como DELPHI (Rocchia, Alexov e Honig, 2001) e as versões AMBER8-12(Amber10, 2008).

Os componentes eletrostáticos da energia livre de solvatação podem ser vistos como uma variação da energia eletrostática resultante da transferência do soluto de um meio com uma constante dielétrica baixa (vácuo), para um meio com uma constante dielétrica alta (solução), mantendo a mesma constante dielétrica para o soluto.

$$\Delta G_{PB} = \frac{1}{2} \sum_i (\phi_i^{80} - \phi_i^1) \quad (2.59)$$

O termo de solvatação não polar é aproximado por uma função linear, dependente da área acessível ao solvente, dada por:

$$\Delta G_{n\tilde{a}o-polar} = \gamma(A) + \beta \quad (2.60)$$

Onde A é a área acessível ao solvente e  $\gamma$  e  $\beta$  são constantes obtidas a partir de dados experimentais.

A energia livre de ligação ( $\Delta G_{lig}$ ) entre um ligante e um receptor (proteína-receptor) é calculada de acordo com a relação abaixo:

$$\Delta G_{lig} = \Delta G_{complexo} - \Delta G_{receptor} - \Delta G_{ligante} \quad (2.61)$$

A energia livre de ligação receptor-ligante pode ser calculada de duas formas. A primeira, e que em princípio seria mais correta, é realizar simulações de DM independentes para o complexo, receptor e ligante, sendo cada uma destas trajetórias usadas para extrair um número de estruturas representativas para o complexo, receptor e ligante, respectivamente, que serviriam depois de base para o cálculo da respectiva energia livre. A segunda forma consiste em partir de uma única simulação de DM para o complexo receptor-

## MÉTODOS COMPUTACIONAIS

ligante, usando essa trajetória para extrair estruturas representativas para o complexo, receptor e ligante. Esta abordagem é mais rápida, pois é necessária apenas uma única simulação de dinâmica. No entanto, nela supõem-se que as estruturas do receptor e do ligante extraídas da simulação do complexo podem ser combinadas como uma aproximação realista das estruturas que o receptor e o ligante assumiriam numa simulação de DM independente. Esta aproximação foi usada no desenvolvimento da presente tese, e é geralmente o método dominante em estudos MM-PBSA.

### 2.6 DOCKING MOLECULAR PROTEÍNA-LIGANTE

A compreensão dos mecanismos pelos quais receptores biológicos reconhecem, interagem e associam-se com seus substratos moleculares e inibidores é um dos grandes desafios da biologia molecular, bem como, é de suma importância na descoberta de novos compostos bioativos baseados no desenho racional de fármacos. Nesse sentido, metodologias computacionais têm sido uma forte ferramenta na descrição de processos de reconhecimento molecular receptor-ligante. Em especial, os métodos de docking proteína-ligante vêm sendo amplamente aplicados em pesquisas acadêmicas e por grandes empresas farmacêuticas e de biotecnologia em todo mundo (Mihasan, 2012). O docking molecular visa basicamente à predição do modo de associação de um ligante (inibidor) com um determinado receptor (proteína) cuja estrutura 3D seja conhecida, e, mediante o cálculo da energia de interação entre o ligante e o receptor ranquear diferentes ligantes quanto à afinidade ao alvo biológico (Sousa, Fernandes e Ramos, 2006; Kukol, 2008).

As técnicas de docking apresentaram grande avanço nas últimas décadas. Isto ocorreu devido ao crescimento do poder computacional bem como ao acesso facilitado aos bancos de dados de pequenas e grandes moléculas, como proteínas.

Nesta seção abordaremos os conceitos-chaves da metodologia de docking molecular, com especial atenção ao programa AutoDock® que foi usado na execução desta tese.

#### 2.6.1 Princípios do docking molecular

Segundo a literatura, métodos de docking tentam prever a estrutura de um complexo intermolecular entre dois ou mais constituintes moleculares (Sousa, Fernandes e Ramos, 2006). Isto é feito estruturalmente com a predição do modo de interação e energeticamente com a predição da afinidade de ligação receptor-ligante. Os estudos se aplicam geralmente entre pequenas moléculas e alvos macromoleculares (RNA, DNA ou proteínas), chamado docking proteína-ligante. No entanto, a metodologia pode ser aplicada no estudo da interação proteína-proteína, que é considerado o estado da arte em termos de docking molecular.

O primeiro programa de docking foi desenvolvido em 1982 por Kuntz e colaboradores (Kuntz *et al.*, 1982) e foi chamado de Dock. Atualmente um grande número de softwares está disponível no mercado. Na literatura estão disponíveis vários artigos de revisão a respeito dos métodos de docking, bem como trabalhos comparando a eficácia dos

diferentes programas (Cramer, 2006; Sousa, Fernandes e Ramos, 2006; Kukol, 2008; Mihasan, 2012).

A Figura 2.3 ilustra as principais etapas envolvidas em qualquer protocolo de docking. O experimento de docking envolve encontrar o modo de ligação mais favorável de um ligante dentro do alvo molecular de interesse. Esse modo de associação com o receptor pode ser definido pelas variáveis de estado do ligante, que consistem nas posições (x, y, z); na orientação no espaço e, se o ligante for flexível, na conformação (ângulo de torção). Cada uma dessas variáveis descreve um grau de liberdade em um espaço de busca multidimensional. Os métodos de docking podem ser rígidos, nesse caso o ligante e o receptor são mantidos fixos e o espaço de busca é muito menor do que no caso do docking que considera a flexibilidade do ligante, chamado semirrígido. O docking pode ainda ser totalmente flexível, quando receptor e ligante são flexíveis. Mas essa abordagem ainda é bastante limitada devido ao espaço de busca quase proibitivo, tendo em vista que as moléculas receptoras são macromoléculas como proteínas.

Basicamente todos os métodos de docking necessitam de uma função de avaliação (*função de scoring*) para ranquear os modos de associação baseados na energia de interação da macromolécula-ligante e de um método de busca para explorar as variáveis de estado (busca no espaço conformacional macromolécula-ligante).

As funções de scoring tradicionalmente usadas nos programas de docking podem ser classificadas em:

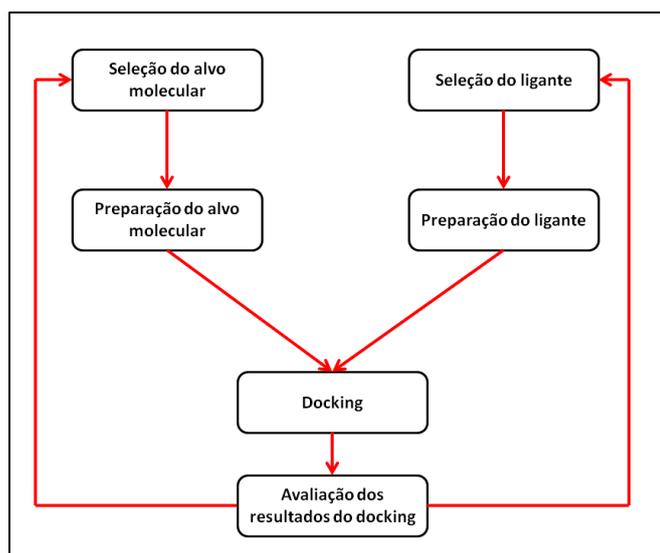
**Empíricas:** Reproduzem a energia de ligação como uma soma de interações resultantes da contribuição ponderada dos parâmetros estruturais (número de ligações de hidrogênio, iônica, contatos polares, entropia, ...). Os pesos para cada parâmetro são obtidos por ajuste de uma série de complexos proteína-ligante com constante de ligação conhecida. As funções mais comuns são: LUDI(Bohm, 1998), CHEMSCORE(Eldridge *et al.*, 1997; Murray, Auton e Eldridge, 1998), X-SCORE(Wang, Lai e Wang, 2002) e GOLDScore(Rarey, Kramer e Lengauer, 1997).

**Baseadas em campos de força da MM:** A energia livre de ligação é estimada a partir da soma de interações eletrostáticas e de van der Waals como descritas nos campos de força da MM. Muitas vezes também são adicionados termos empíricos para incluir efeitos da entropia e de solvatação. Incluem essas funções o DOCK(Meng *et al.*, 1994) e o CHARMM(Mackerell, Wiorkiewicz-Kuczera e Karplus, 1995).

**Baseadas em conhecimento:** Representa a energia de afinidade como uma soma de interações de pares de átomos da proteína-ligante dentro de certa distância. Os potenciais

são derivados da análise estatística das distribuições e frequências de interações específicas de pares atômicos em complexos proteína-ligante com estrutura conhecida (depositadas no Protein Data Bank, por exemplo). Incluem essas funções: PMF(Ishchenko e Shakhnovich, 2002), DrugScore(Gohlke, Hendlich e Klebe, 2000), FLEX(Rarey *et al.*, 1996).

As funções empíricas são as mais usadas nos programas de docking envolvendo estudo de novos fármacos. No entanto, o sucesso da função é bastante dependente do sistema a qual está sendo aplicada. Muitos estudos têm aplicado uma combinação de diferentes funções, chamadas função consenso(Charifson *et al.*, 1999), visando aumentar a probabilidade de encontrar a solução correta. Essas funções consenso ainda estão em discussão, pois a combinação de diferentes funções de avaliação poderia levar à amplificação dos erros devido às aproximações de cada função.



**Figura 2.3** Esquema de docking típico. O fluxograma mostra os passos fundamentais comuns a todos os protocolos de docking. As estruturas 3D para a macromolécula alvo e a molécula ligante têm que ser escolhidas e em seguida, cada uma das estruturas deve ser preparada em conformidade com os requisitos do método de docking a ser utilizado. Após o experimento de docking ser realizado, os resultados devem ser analisados e selecionados os melhores modos de ligação (Kukol, 2008).

Os algoritmos de busca podem ser subdivididos em duas categorias principais: os métodos estocásticos e os determinísticos (Cramer, 2006; Kukol, 2008). Os métodos clássicos de minimização de energia e os métodos de simulação por DM são exemplos de métodos determinísticos aplicados ao docking. Os métodos sistemáticos varrem o espaço de

busca em intervalos pré-definidos. Os métodos estocásticos realizam buscas aleatórias nas variáveis de estado até atingir um critério de parada estabelecido pelo usuário. Monte Carlo, *simulated annealing* e algoritmos evolucionários são exemplos de métodos de busca estocástica que também têm sido usados nos problemas de docking proteína-ligante.

Na seção seguinte serão descritos as funções de scoring e o algoritmo de busca usado pelo AutoDock, que é o programa mais usado e citado na literatura até o presente.

### 2.6.2 O programa AutoDock

O programa AutoDock (Morris *et al.*, 2009) utiliza um algoritmo genético (AG) tradicional e um AG Lamarckiano (Wheeler *et al.*) para busca no espaço conformacional. O AGL é um algoritmo genético híbrido de busca local.

A função de avaliação usada pelo AutoDock é baseada no campo de forças AMBER (ver seção 2.3.3.1) acrescido de alguns termos empíricos, e por isso é considerado uma função de *scoring* empírica (Morris *et al.*, 1998). Os termos empíricos da função de *scoring* do AMBER são para incluir o efeito do solvente, o qual é baseado em parâmetros atômicos de solvatação. Um segundo termo empírico para modelar a perda da entropia conformacional com a ligação receptor-ligante e um último termo para incluir os efeitos das ligações de hidrogênio. A função de *scoring* do AMBER é descrita abaixo:

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vdw} \sum_{ij} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] + \Delta G_{ele} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \\ & + \Delta G_{lig-H} \sum_{ij} E(t) \left[ \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{lig-H} \right] \\ & + \Delta G_{tors} N_{tors} + \Delta G_{solv} \sum_{icj} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \end{aligned} \quad (2.62)$$

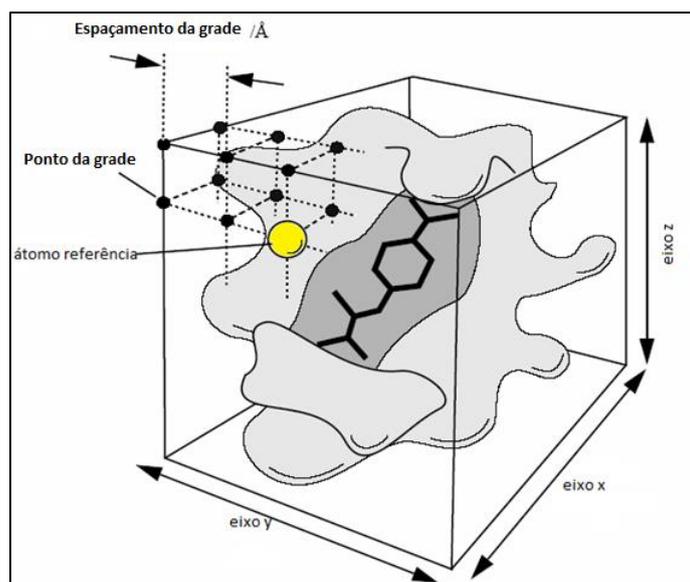
Os coeficientes ( $\Delta G$ ) foram determinados empiricamente, por uma regressão linear múltipla sobre um conjunto de 30 complexos proteína-ligante, com constantes de inibição ( $K_i$ ) conhecidas, depositados do PDB (Para versão do AutoDock 4.0 foram usados um conjunto de 188 complexos)(Morris *et al.*, 1998).

As contribuições em fase gasosa incluem o potencial 12-6 de Lennard Jones, um potencial 12-10 para ligações de hidrogênio que também leva em conta a dependência

angular da ligação com o termo  $E(t)$  e o potencial eletrostático de Coulomb. O quarto termo corresponde à contribuição entrópica desfavorável da ligação receptor-ligante e proporcional ao número de ligações  $sp^3$  no ligante ( $N_{tors}$ ). O último termo de desolvatação é calculado por uma variação do método de Stouten e colaboradores (Stouten *et al.*, 1993), baseados em parâmetros atômicos de solvatação e neste caso restrito a átomos de carbono alifáticos e aromáticos do ligante. Para cada um desses átomos é avaliado a porcentagem de volume ao seu redor que é ocupada por átomos da proteína, essa porcentagem é então ponderada pelo parâmetro de solvatação atômica do referido átomo resultando na energia de dessolvatação. Além disso, uma constante ( $E_{lig-H}$ ) é adicionada ao termo de ligação de hidrogênio para modelar a dessolvatação de átomos polares.

Todos os termos da eq. (2.62) são somas realizadas para todos os pares de átomos do ligante ( $i$ ) e da proteína ( $j$ ), bem como para todos os pares de átomos do ligante que estão separados por três ou mais ligações. A energia de interação intramolecular do ligante não é incluída no cálculo da energia livre de ligação, mas é considerada na energia total de formação que é a função avaliação que dirige o processo de busca do docking (usada no método de busca conformacional).

Para diminuir o custo computacional com o cálculo dos termos de interação entre átomos não ligados (por exemplo, os termos das interações de longo alcance), que envolveria um número total de átomos do ligante e da proteína (geralmente da ordem de milhares de átomos), é utilizada uma aproximação baseada em grade (Luty *et al.*, 1995). Nesta metodologia são considerados apenas os átomos do receptor vizinhos ao sítio ativo da proteína, que é englobado por uma grade/rede tridimensional. Um átomo referência é colocado em cada ponto da rede, e são pré-calculados potenciais de interação atômica para cada tipo de átomo do ligante (Figura 2.4). Essa energia é armazenada em cada ponto da grade, constituindo o mapa de potencial. Os valores da energia para cada conformação do ligante é determinado posteriormente por uma interpolação trilinear dos oito pontos da rede que envolve cada um dos átomos do ligante.



**Figura 2.4** Modelo de grade gerado pelo *Autogrid*, uma sub-rotina do AutoDock. A grade é construída ao redor da proteína, ou do sítio de interesse da proteína, um átomo sonda correspondente a cada tipo de átomo do ligante são dados os valores de energia que pode ser posteriormente usados pelo programa principal de docking se os átomos do ligante são encontrados perto destes pontos. Figura adaptada de Morris *et al.* (Morris *et al.*, 1998)

A metodologia de docking está hoje bem estabelecida, mas ainda longe da perfeição. A maioria dos programas de docking existentes é capaz de prever complexos proteína-ligante com erro médio de 1,5-2,0 Å e com taxa de sucesso de 70-80% (Sousa, Fernandes e Ramos, 2006). No entanto o problema do docking ainda tem várias deficiências ocultas, a ausência de uma função de *scoring* capaz de combinar eficientemente a precisão e velocidade talvez seja um dos maiores problemas. Nesse sentido, diversos estudos buscam desenvolver funções de avaliação que possam incluir os efeitos entrópicos, eletrostáticos, solvente e flexibilidade dos receptores no cálculo da energia. Além disso, algoritmos de busca mais efetivos em amostrar o espaço conformacional proteína-ligante são necessários. Para, além disso, é preciso ressaltar que os resultados de um experimento de docking molecular não devem ser tomados como o resultado final de um estudo estrutural, mas sim como um bom ponto de partida para uma análise mais precisa e profunda usando metodologias mais sofisticadas.

**3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nos últimos anos, dado o conhecimento da estrutura tridimensional de diferentes domínios catalíticos das MMPs, intensas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de se obter inibidores sintéticos potentes e seletivos para as MMPs (Nutti, Tuccinardi e Rossello, 2007; Murphy e Nagase, 2008; Tu *et al.*, 2008). No entanto, os resultados desfavoráveis apresentados nos ensaios clínicos para a maioria dos compostos incentivou a pesquisa por inibidores específicos com afinidade por zinco, presente no sítio ativo das enzimas, os chamados ZBGs. As CMTs e outros derivados da TC fazem parte desse grupo de compostos. Neste trabalho foi proposta a investigação da natureza da interação entre tetraciclinas quimicamente modificadas e MMPs, buscando avaliar aspectos estruturais, reatividade, dinâmica e implicações biológicas dessas interações.

Em geral, as maiores dificuldades em utilizar métodos computacionais no estudo da interação de inibidores com as MMPs são o tamanho da estrutura e a presença de metais, sendo que a primeira dificuldade é modelar o sistema de interesse em diferentes níveis de complexidade. Nesse sentido, a estratégia adotada foi começar modelando sistemas menores, como por exemplo, partes do sítio catalítico, onde é possível aplicar cálculos *ab initio* (ou DFT) puros. No segundo momento foram modelados sistemas mais complexos envolvendo a estrutura experimental da MMP de interesse disponível no banco de estruturas PDB. As estruturas dos complexos das CMTs com as metaloproteínas foram primeiramente obtidas através da metodologia de docking molecular. Em seguida um novo conjunto de parâmetros para os átomos de Zn estrutural e catalítico da enzima foi calculado, validado e depositado dentro do campo de forças AMBER. Esses parâmetros foram então usados na simulação de DM das estruturas dos complexos MMP-CMTs e uma completa análise da estrutura e dinâmica desses complexos foi realizada. Por fim a reatividade dos ligantes foi avaliada com o cálculo da energia livre de ligação aplicando os métodos de integração termodinâmica e MM-PBSA. De modo que cada etapa do estudo mencionada será descrita e discutida nas seções seguintes.

### 3.1 INTERAÇÃO DAS TETRACICLINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS COM O ÍON ZN(II) PRESENTE NO SÍTIO CATALÍTICO DAS MMPS: EVIDÊNCIAS PARA O SÍTIO DE COORDENAÇÃO DO METAL

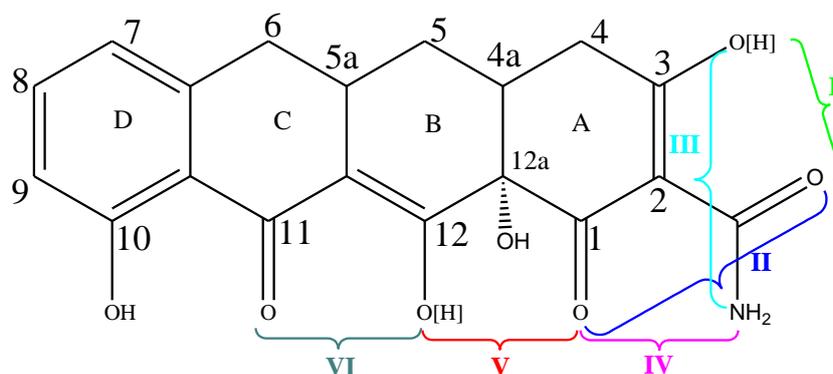
Dentre as tetraciclinas quimicamente modificadas a CMT-3 ou COL-3 está em fase mais avançada nos testes como antitumorais, pois ela atua inibindo a expressão e atividade das gelatinases A e B, MMP-2 e MMP-9, respectivamente (Tu *et al.*, 2008). Essas enzimas degradam os principais componentes da membrana basal e, portanto, são essenciais à progressão celular, desempenhando um papel primário no mecanismo de metástase. Outras CMTs incluindo CMT-1, CMT-4, CMT-7 e CMT-8 (Figura 1.5) também apresentam atividade antiMMP.

No entanto, os testes biológicos em diferentes linhagens de células tumorais mostram um comportamento distinto entre as CMTs. Testes *in vivo* com células de melanoma humano (C8161) altamente invasivo e metastático mostram que a CMT-3 pode diminuir em até 97% a atividade da gelatinase A, enquanto que a CMT-7 inibe apenas 8% os níveis de atividade extracelular da gelatinase (Seftor *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). A diferença na potência das CMTs como inibidoras de MMP pode ser um resultado direto das diferenças estruturais entre as mesmas, diferenças essas que podem alterar a solubilidade e reatividade desses compostos.

A TC e também os derivados da família das CMTs possuem diferentes sítios disponíveis para a coordenação com íons metálicos (Figura 3.1) e formam complexos com íons como Mg(II), Ca(II), Al(III), Zn(II), Pt(II), entre outros (Asleson e Frank, 1975; Lee e Everett, 1981; Machado *et al.*, 1995; Matos e Beraldo, 1995; Wessels *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 2006). Em geral, essa forte habilidade das TCs e análogos em formarem complexos metálicos é tida como um dos principais fatores para o potencial biológico dessas moléculas, uma vez que a coordenação com o metal pode interferir diretamente no mecanismo de ação desses compostos em nível molecular. Nesse sentido, a aplicação de métodos teóricos para investigar aspectos estruturais e propriedades termodinâmicas do processo de complexação com metais pode ser relevante para a elucidação do modo de ação das CMTs como IMMPS.

Há disponível na literatura um grande número de trabalhos que tem contribuído com o entendimento da química das tetraciclinas aplicando métodos teóricos para investigar mudanças conformacionais, complexação com íons metálicos, interação com proteínas e propriedades espectroscópicas desses compostos (Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998b; Duarte *et al.*, 1999; Dos Santos *et al.*, 2003; Othersen, Lanig e Clark, 2003; Leybold *et al.*,

2004; Meindl e Clark, 2005; Aleksandrov e Simonson, 2006; Dos Santos *et al.*, 2006; Othersen *et al.*, 2006; Marcial *et al.*, 2008; 2009). Esses estudos têm auxiliado experimentalistas na caracterização do modo de coordenação de íons metálicos, incluindo Mg(II), Al(III) e Pt(II), que é uma tarefa difícil devido à existência de vários possíveis sítios de coordenação na molécula da TC e derivados.



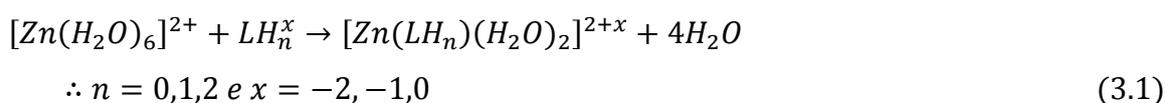
**Figura 3.1** Distintos modos de coordenação apresentados pelas CMTs (ilustrados para CMT-3).

Foram realizados cálculos quânticos de primeiros princípios baseados na teoria do funcional de densidade (DFT) para descrever a interação de diferentes CMTs (Figura 1.5) com o íon Zn(II) da enzima MMP. No primeiro momento foram explorados os distintos modos de coordenação do metal nas CMTs, incluindo os modos I-VI mostrados na Figura 3.1, considerando para isso a interação das mesmas com o íon Zn(II) hexahidratado ( $[Zn(H_2O)_6]^{2+}$ ). Em seguida foi usado como modelo molecular o íon Zn(II) no sítio ativo da gelatinase B (MMP-9) considerando a primeira esfera de coordenação do metal que compreende His401, His405 e a His411 (numerado de acordo com a estrutura cristalográfica). O modelo foi obtido de uma estrutura de cristalografia de Raios X de alta resolução no *Protein Data Bank* (PDB código 1L6J) (Elkins *et al.*, 2002). Por fim, a estrutura e a estabilidade dos complexos Zn(II)-CMT, foram discutidas como um primeiro esforço para investigar o mecanismo de ação das CMTs como inibidoras de metaloproteinases da matriz.

3.1.1 Tratamento teórico

As CMTs consideradas neste estudo foram CMT-1, CMT-3, CMT-4, CMT-7 e CMT-8 (ver Figura 1.5). Estas moléculas em comparação com outras CMTs e a própria TC apresentam uma maior lipofilicidade relativa, sendo, portanto, melhor absorvidas pelo organismo e células humanas administradas por via oral. As CMTs possuem apenas dois grupos ionizáveis, devido à ausência do grupo dimetilamônio na posição C4, por isso não possuem um terceiro pKa como a tetraciclina. Dependendo do pH da solução, as CMTs podem existir nas formas não ionizada (LH<sub>2</sub>) ou nas formas ionizadas LH<sup>-</sup> (O3) e L<sup>2-</sup> (O3,O12). Pinsuan e colaboradores (Pinsuan *et al.*, 1999) usaram a técnica de espectrofotometria para determinar as constantes de acidez da CMT-3, encontrando os valores de 5,6±0,2 (pKa1) e 8,35±0,07 (pKa2).

O presente estudo foi organizado em duas partes. Primeiramente todos os modos de coordenação possíveis, representados na Figura 3.1, foram testados para a CMT-1 e CMT-3. A escolha dessas duas CMTs específicas se deve a características importantes das mesmas. A CMT-1 foi a primeira tetraciclina não antibiótica a ser sintetizada e tem a estrutura mais próxima da TC, já a CMT-3 é a mais simples das tetraciclinas, não possuindo nenhum ligante nas posições C4, C5, C6 e C7. Além dos diferentes modos de coordenação, foram consideradas também a geometria dos ligantes em suas diferentes formas ionizadas, ou seja, LH<sub>2</sub>, LH<sup>-</sup> e L<sup>2-</sup>. O metal foi tratado como uma espécie hexahidratada, como mostra a Equação (3.1).



Na segunda parte desse estudo, os modos de coordenação mais estáveis para os complexos CMT-1-Zn(II) e CMT-3-Zn(II) foram considerados na construção do modelo com o sítio ativo da MMP-9 obtido da estrutura cristalográfica da enzima (Elkins *et al.*, 2002).

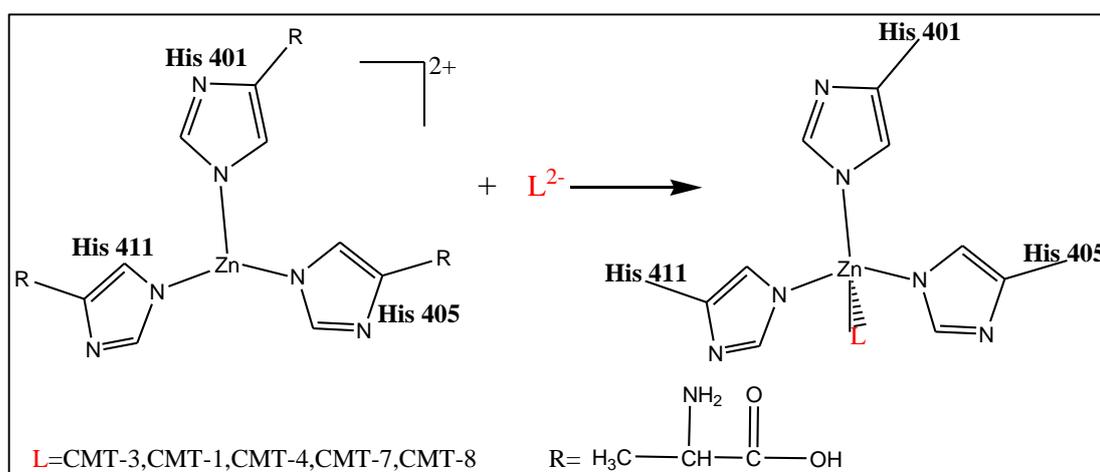
Atualmente existe nos bancos de estruturas um grande número de metaloenzimas resolvidas por técnicas de cristalografia de Raios X ou RMN. As gelatinases A e B apresentam uma sequência primária bastante semelhante, não só em humanos, mas também em outras espécies, como mostra a Figura 3.2. A região do domínio catalítico das enzimas é altamente conservada e como na maioria das MMPs, sendo a primeira esfera de coordenação

do zinco catalítico formada por três histidinas (His401, His405 e His411) (Clendeninn e Appelt, 2001).

Gelatinases	
MMP-2 Humana	Y S L F L V A A H E F G H A M G L E H S Q D P G A L M A P I Y
MMP-2 Ratos	Y S L F L V A A H E F G H A M G L E H S Q D P G A L M A P I Y
MMP-2 Coelhos	Y S L F L V A A H E F G H A M G L E H S Q D P G A L M A P I Y
MMP-9 Humana	Y S L F L V A A H E F G H A L G L D H S S V P E A L M A P M Y
MMP-9 Coelhos	Y S L F L V A A H E F G H A L G L D H S S V P E R L M A P M Y
MMP-9 Ratos	Y S L F L V A A H E F G H A L G L D H S S V P E A L M A P L Y

**Figura 3.2** Estrutura primária da região do zinco catalítico das MMP-2 -9. A região alinhada corresponde aos resíduos 393-423 da MMP-9 humana. Abreviações: A, alanina; R, arginina; N, asparagina; D, ácido aspártico; E, ácido glutâmico; Q, glutamina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; L, leucina; M, metionina; F, fenilalanina; P, prolina; S, serina; Y, tirosina; V, valina.

Para estudar a interação das CMTs com a enzima, adotamos a gelatinase B (MMP-9) depositada no PDB sob o código 1L6J (Elkins *et al.*, 2002), da qual somente a primeira esfera de coordenação (His401, His405 e His411) foi considerada na construção do modelo. A estrutura dos aminoácidos foi considerada na sua forma neutra, com os grupos COOH e NH<sub>2</sub>. Todas as CMTs foram usadas como ligantes na forma totalmente desprotonada (L<sup>2-</sup>), como mostra a Figura 3.3. A estequiometria final dos complexos com o zinco catalítico foi [Zn(L)(His)<sub>3</sub>].



**Figura 3.3** Processo considerado no estudo da reação com o modelo do sítio ativo da MMP-9.

Todas as geometrias foram completamente otimizadas e caracterizadas como mínimo na superfície de energia potencial (Mackerell *et al.*) usando DFT com o funcional híbrido B3LYP(Becke, 1988b; Lee, Yang e Parr, 1988). O conjunto de funções de base 6-31G(d) foi usado para todos os átomos, incluindo o íon zinco (Curtiss *et al.*, 1998; Rassolov *et al.*, 2001). A energia livre de reação ( $\Delta G_{R,g}$ ) foi calculada usando a Equação (3.2), na qual  $\Delta E_{R,g}^{ele-nuc}$  vem da contribuição eletrônica-nuclear e  $\Delta G_{R,g}^T$  da correção térmica. Esta última contribuição é obtida utilizando o formalismo da termodinâmica estatística, o qual tem como princípios modelos simples como gasosa ideal, rotor-rígido e oscilador harmônico(Jansen, 1999; Levine, 2000).

$$\Delta G_{R,g} = \Delta E_{R,g}^{ele-nuc} + \Delta G_{R,g}^T \quad (3.2)$$

Recentemente, Ramos e colaboradores(Sousa, S. F., Fernandes, P. A. e Ramos, M. J., 2007; Sousa, Carvalho, *et al.*, 2009) demonstraram a acurácia e superioridade do funcional B3LYP, em comparação com Hartree-Fock e até mesmo teoria de perturbação de segunda ordem Moller-Plesset para sistemas biológicos contendo Zn. Neste sentido, embora a avaliação sistemática de métodos de cálculo não fosse objetivo do presente trabalho, foram realizados cálculos adicionais para avaliar o possível efeito do conjunto de funções de base e dos funcionais DFT na energia relativa dos complexos. Para isso foram realizados cálculos de energia usando um dos mais modernos funcionais DFT chamado M06(Zhao, Y. e Truhlar, D. G., 2008). Para avaliar o efeito das funções de base na energia, foram realizados cálculos de energia usando o conjunto de funções 6-311+G(2d,p) com os funcionais B3LYP e M06, nomeados como B3LYP/6-311+G(2d,p)// e M06/6-311+G(2d,p)//. Em todos os cálculos foram usadas as geometrias otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d).

Os cálculos foram realizados também em solução ( $\epsilon=78,39$ , correspondente a água) usando o modelo contínuo polarizável (PCM) dentro do formalismo IEF (Cances, Mennucci e Tomasi, 1997; Cossi *et al.*, 2002). A cavidade do soluto foi construída de acordo com o esquema UAHF (Barone, Cossi e Tomasi, 1997), incluindo somente as contribuições eletrostáticas para a energia de solvatação, como já havia sido sugerido em trabalhos prévios (Marcial *et al.*, 2008; 2009).

A energia livre de reação em solução foi calculada de acordo com a Equação (3.3), sendo o nível B3LYP/6-31G(d) utilizado para o cálculo da geometria, correção térmica e

energia de solvatação. Todos os cálculos foram realizados usando o programa Gaussian 09 (Frisch *et al.*).

$$\Delta G_{R,aq} = \Delta G_{R,g} + \delta \Delta G_{sol} \quad (3.3)$$

Na Equação (3.3) o último termo na direita representa a diferença de energia de solvatação entre as espécies interagentes.

### 3.1.2 Estrutura e estabilidade dos complexos $[Zn(LH_n)(H_2O)_2]^{2+x}$

As CMTs inibem a atividade das MMPs por mecanismo não antimicrobiano, atuando como um ZBG. Na literatura há vários trabalhos discutindo aspectos importantes quanto à farmacocinética e lipofilia desses compostos (Seftor *et al.*, 1998; Pinsuwan *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2010). No entanto, quando atuam como ZBGs, não se sabe muito sobre a estrutura do complexo formado com o zinco catalítico das enzimas, mas há evidências de que a reatividade das CMTs está diretamente relacionada à sua estrutura. Esta relação é suportada por estudos realizados com o análogo CMT-5 (Figura 1.5), os quais mostram que essa CMT não apresenta atividade como inibidora de MMP *in vitro* (Nelson, Hillen e Greenwald, 2001). Na CMT-5, os grupos carbonila C11 e hidroxila C12 são substituídos por átomos de nitrogênio formando um anel de cinco membros, eliminando um importante sítio de coordenação dos íons Zn(II) e Ca(II) (sítio VI na Figura 3.1). Essas observações experimentais sugerem que o sítio O11-O12 esteja relacionado ao modo de interação da CMT com o íon zinco presente no domínio catalítico das metaloproteínas. Nesse sentido é importante explorar em nível molecular as interações das CMTs com o íon zinco.

O zinco é um dos metais mais abundantes nos organismos humanos, e apresenta algumas propriedades que o diferenciam de outros metais. Por exemplo, o zinco apresenta esfera de coordenação flexível, podendo adotar número de coordenação seis, cinco ou quatro dependendo dos ligantes. A possibilidade de uma rápida troca de ligantes também é uma característica importante para o mecanismo catalítico de metaloenzimas. O zinco existe no meio biológico na forma do cátion Zn(II), apresentando uma camada d fechada (configuração  $d^{10}$ ) e geralmente forma complexos incolores que torna difícil a aplicação direta de técnicas experimentais na caracterização desses compostos. Esta última característica é uma das grandes motivações para o uso de ferramentas computacionais no estudo de sistemas contendo íons Zn(II) (Sousa, Lopes, *et al.*, 2009).

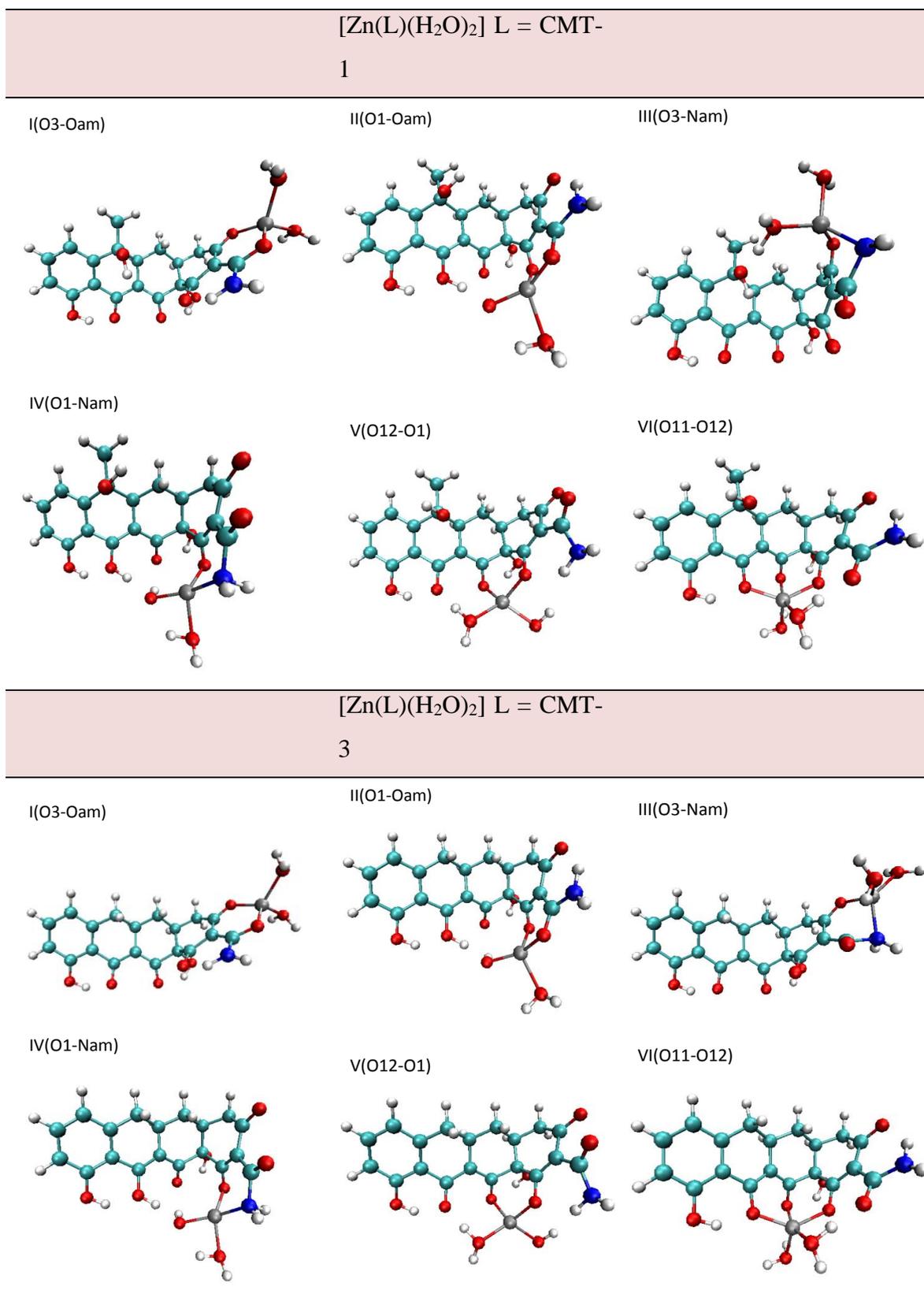
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para definir os modos de coordenação mais estáveis dos complexos CMT-Zn(II), o processo (3.1) foi investigado na fase gasosa e em solução aquosa. Foram propostos 18 sítios distintos de coordenação para as CMT-3 e CMT-8, considerando as três formas ionizadas ( $\text{LH}_2$ ,  $\text{LH}^-$  e  $\text{L}^{2-}$ ). Para a forma neutra  $\text{LH}_2$  e ionizada  $\text{LH}^-$  foram analisados cinco sítios de coordenação, tendo sido propostos dois tautômeros para o sítio III(O3-Nam) e IV(O1-Nam) na forma neutra (IIIA e IVA, respectivamente). Um total de sete estruturas para  $[\text{Zn}(\text{LH}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  e cinco para  $[\text{Zn}(\text{LH})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$  foram calculadas. Para o ligante na forma completamente ionizada  $\text{L}^{2-}$  foram calculados seis estruturas com estequiometria  $[\text{Zn}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]$ , sendo um modo adicional na posição O11-O12 chamado de modo VI (Figura 3.1). A Figura 3.4 mostra todas as estruturas otimizadas para os complexos CMT-Zn(II) no nível B3LYP/6-31G(d).

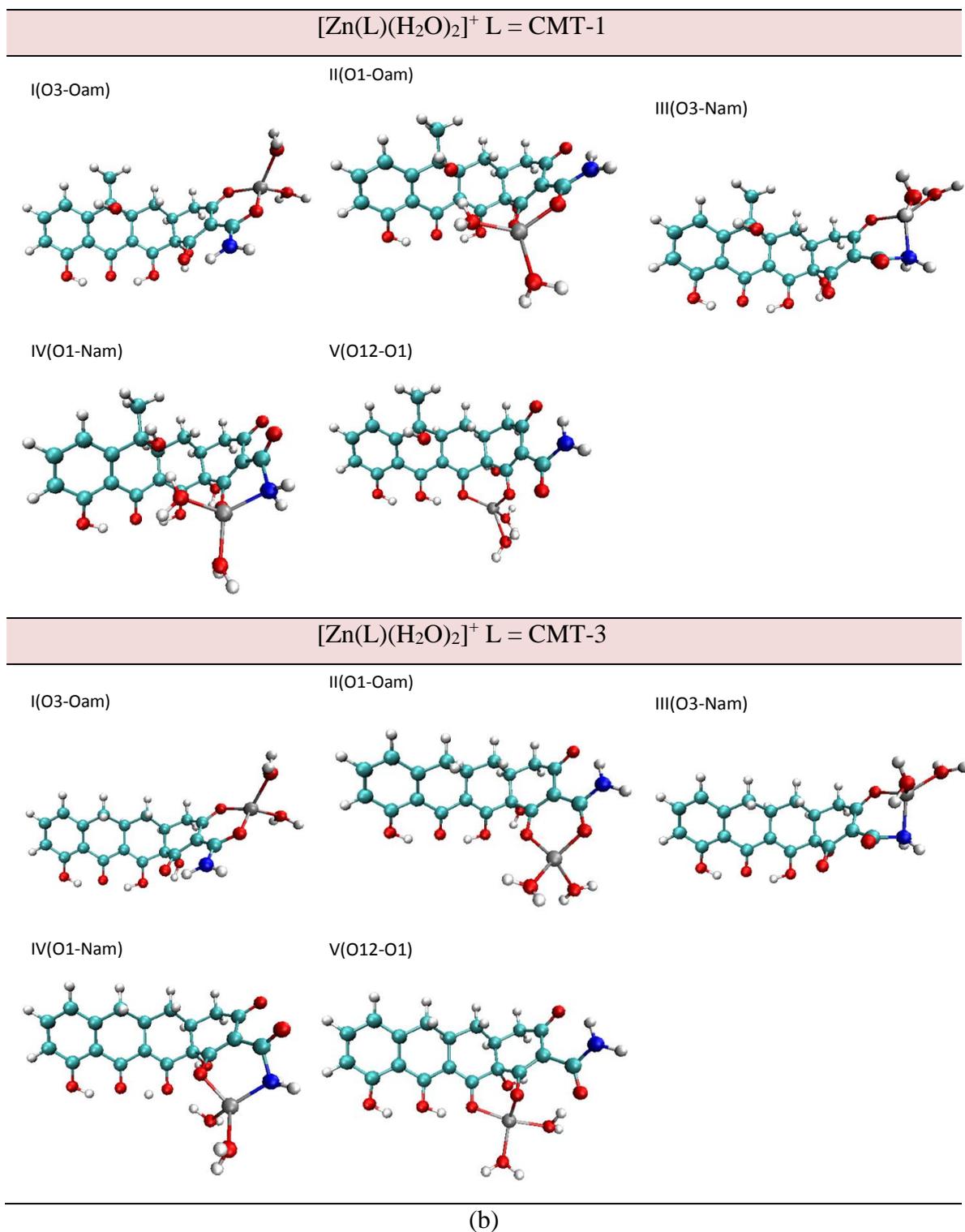
Em todos os complexos mostrados na Figura 3.4, a CMT-1 e a CMT-3 coordenam-se ao metal de forma bidentada, com exceção do modo de coordenação VI(O11-O12), proposto somente para os ligantes completamente ionizados. Neste caso a estrutura inicial que apresentava o íon Zn(II) coordenado aos átomos O11- O12 sofre uma grande distorção e a geometria final apresenta o metal ligado aos átomos O11-O1, com uma fraca interação eletrostática com o O12 (Figura 3.4a). Os comprimentos das ligações O11-Zn e O1-Zn foram calculados e variam de 1,94-1,97 e 1,93-1,96 Å, respectivamente. Já a ligação O12-Zn varia de 2,16 a 2,33 Å, os quais estão próximos de comprimentos típicos de ligação para complexos de zinco com tetraciclinas e com aminoácidos em metaloenzimas (Matos e Beraldo, 1995; Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998b; Tamames *et al.*, 2007). Entretanto, esses resultados sugerem que a CMT quando ionizada atua como um ligante tridentado no modo de coordenação VI(O11-O12-O1), para o qual o metal apresenta uma esfera de coordenação pentacoordenada (Figura 3.4a). Este modo de coordenação já foi descrito para outro complexo de zinco com o análogo 5a,6-anidrotetraciclina (AHTC), o qual foi caracterizado comparando-se os espectros UV-Vis experimental (Matos e Beraldo, 1995) e teórico (Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998b). Parâmetros termodinâmicos também mostraram que o complexo tridentado é a espécie mais estável em solução aquosa do complexo AHTC-Zn(II).

Os valores para os principais ângulos diedros dos complexos CMT-Zn(II) são mostrados na Tabela 3.1. As maiores distorções ocorrem no modo de coordenação VI, os valores de  $\omega_4: [\text{C1}, \text{C2}, \text{C2am}, \text{O2am}]$  são  $-16,79^\circ$  (CMT-1) e  $-16,71^\circ$  (CMT-3). Esses valores se devem à forte distorção no esqueleto da CMT, com a coordenação no sítio O11-O12-O1,

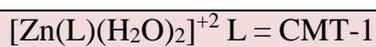
a qual favorece a mudança na conformação do grupo amina na CMT-1 e na CMT-3 para a forma *cis* (ver Figura 3.4a).



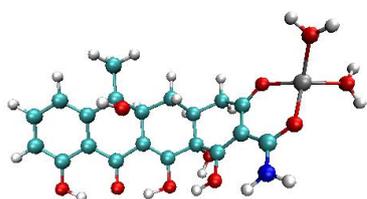
**Figura 3.4** Estruturas dos complexos CMT-Zn(II) otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d). (a) Complexos com ligantes na forma  $L^{2-}$ . (b) Complexos com o ligante  $LH^-$ . (c) Complexos com ligante  $LH_2$ .



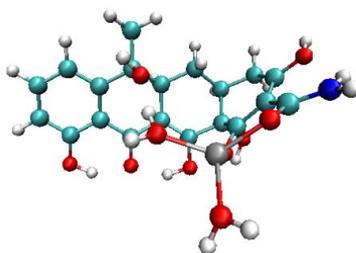
Continuação Figura 3.4



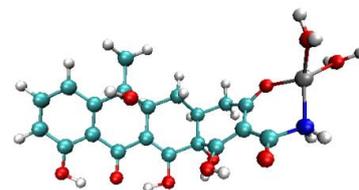
I(O3-Oam)



II(O1-Oam)



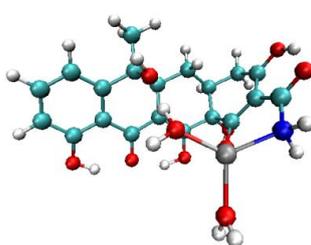
III(O3-Nam)



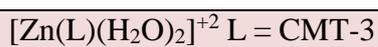
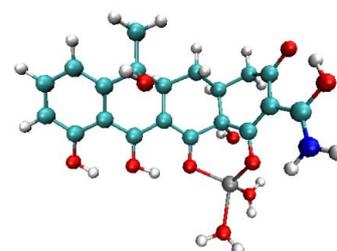
IIIA(O3-Nam)



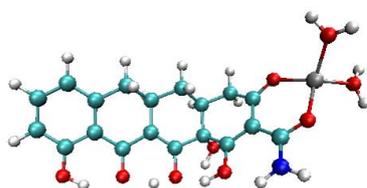
IV(O1-Nam)



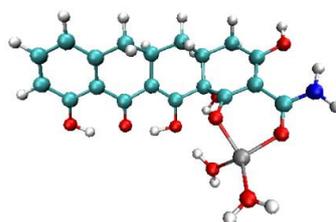
V(O12-O1)



I(O3-Oam)



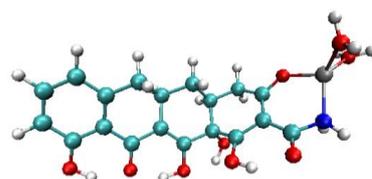
II(O1-Oam)



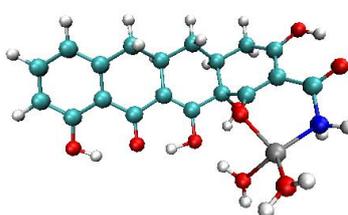
III(O3-Nam)



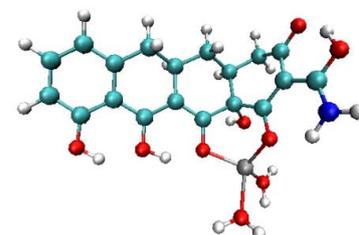
IIIA(O3-Nam)



IV(O1-Nam)



V(O12-O1)



(c)

Continuação Figura 3.4

Para o complexo com o ligante na forma  $\text{L}^{2-}$  coordenados nos sítios II(O1-Oam) e IV(O1-Nam) ocorre uma transferência do próton da água para o O11 da CMT, levando a

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

uma maior estabilização desses complexos. Para os complexos com  $[\text{Zn}(\text{LH}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  e  $[\text{Zn}(\text{LH})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ , a CMT-3 e a CMT-1 coordenam de forma bidentada e o centro metálico apresenta geometria tetraédrica distorcida. O comprimento da ligação Zn-O varia de 1,87-1,97 Å, e a ligação Zn-N varia de 2,00-2,04 Å. Os ângulos O-Zn-O e O-Zn-N foram calculados com valores de 90,6-106,6° e 85,4-96,4°, respectivamente. O sítio V(O12-O1) no complexo  $[\text{Zn}(\text{LH})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$  sofre uma distorção levando a mudança na conformação do grupo amina para a forma *cis*, o que pode ser observado pelo valor do ângulo de torção ( $\omega_4$ ) apresentado na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** Principais ângulos diedros (°) para os complexos das CMTs com Zn(II).

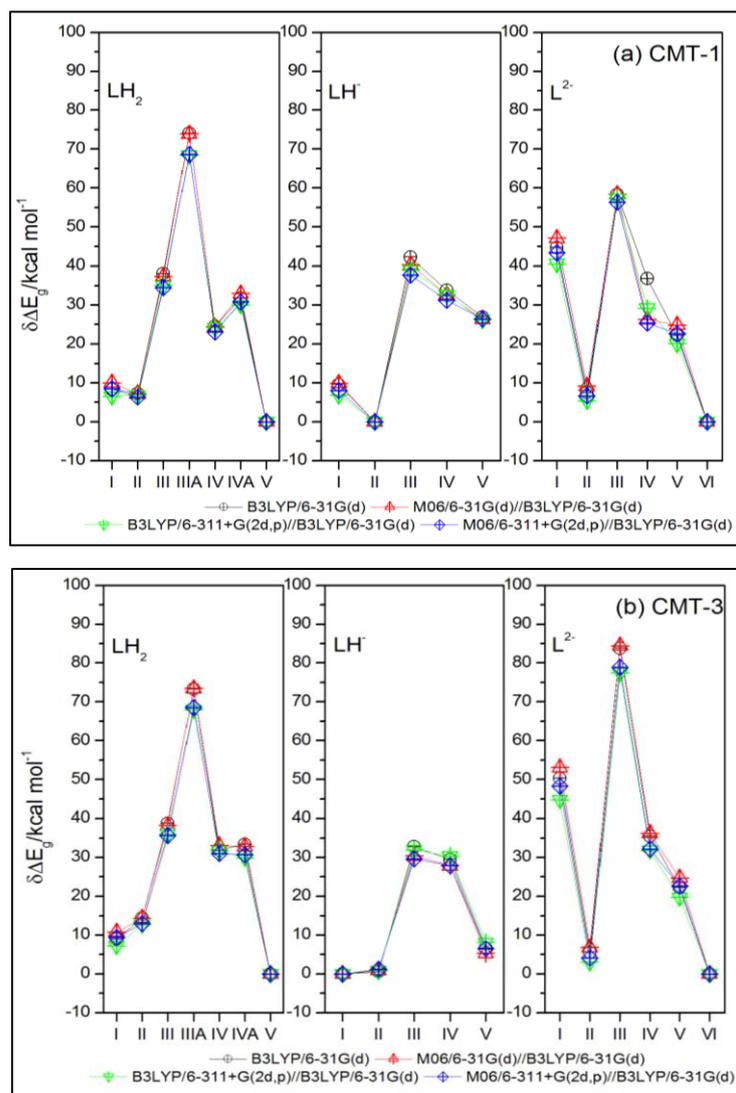
		CMT-1							
LH <sub>2</sub>	$\omega_1$	46,76	57,37	56,28	57,47	55,12	22,90	45,43	
	$\omega_2$	45,83	57,73	52,14	57,34	54,58	25,20	39,64	
	$\omega_3$	41,24	53,39	50,64	51,66	50,26	24,29	44,48	
	$\omega_4$	176,96	-25,83	-15,31	-11,52	-171,31	-168,30	-178,61	
LH <sup>-</sup>	$\omega_1$	55,88	55,57	54,83		52,01		29,17	
	$\omega_2$	55,87	57,89	54,56		54,60		31,43	
	$\omega_3$	52,15	52,59	50,94		49,79		31,48	
	$\omega_4$	176,19	-16,67	-47,61		-153,65		-19,57	
L <sup>2-</sup>	$\omega_1$	61,13	33,36	38,80		32,90		51,52	46,10
	$\omega_2$	59,12	36,93	42,86		35,56		51,04	49,22
	$\omega_3$	59,76	31,17	40,14		31,56		50,27	41,14
	$\omega_4$	177,21	-14,30	-7,09		-166,85		-143,02	-16,71
		CMT-3							
		I	II	III	IIIA	IV	IVA	V	VI
LH <sub>2</sub>	$\omega_1$	46,05	54,34	55,88	57,73		19,35	44,38	
	$\omega_2$	44,98	51,37	51,54	57,59		21,73	38,66	
	$\omega_3$	39,99	46,97	49,60	51,04		20,40	42,86	
	$\omega_4$	177,32	12,01	-15,91	-12,38		-167,04	-178,40	
LH <sup>-</sup>	$\omega_1$	56,55	52,43	55,84		56,59		47,40	
	$\omega_2$	56,67	51,16	55,56		53,18		43,99	
	$\omega_3$	52,01	49,94	51,14		48,92		48,87	
	$\omega_4$	174,53	7,93	-50,95		-130,12		33,27	
L <sup>2-</sup>	$\omega_1$	60,99	32,32	60,39		31,00		51,12	45,44
	$\omega_2$	58,71	36,13	58,68		33,86		50,52	48,42
	$\omega_3$	57,53	29,85	57,25		29,30		49,26	34,59
	$\omega_4$	170,98	-1	-44,46		-166,16		-140,41	-16,79

$\omega_1$ : [O12a,C12a,C4a,H4a],  $\omega_2$ : [C4,C4a,C12a,C1],  $\omega_3$ : [C12,C12a,C4a,C5],  
 $\omega_4$ : [C1,C2,C2am,O2am] (numeração de acordo com a Figura 3.1).

A maioria dos sítios mostrados na Figura 3.1 envolve a coordenação do metal com átomos de oxigênio, a exceção dos sítios III(O3-Nam) e IV(O1-Nam), nos quais o N completa a esfera de coordenação. Os valores das distâncias de ligação Zn-O nesses complexos são sempre maiores do que as ligações Zn-N, o que sugere uma maior afinidade do íon zinco pelo átomo de oxigênio. O caráter mais fraco das ligações Zn-N pode ser observado com o cálculo do índice de ligação de Wiberg (Wiberg) para o complexo da CMT-3 no modo III(O3-Oam), com valores de 0,42 (Zn-O) e 0,29 (Zn-N). Um fato interessante é que a maioria dos compostos estudados como inibidores de MMPs apresentam átomos de O como ligante, como os inibidores derivados do ácido hidroxâmico.

A estabilidade dos complexos  $[\text{Zn}(\text{LH}_n)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+x}$  foi comparada em todos os níveis de teoria estudados, e é mostrada na Figura 3.5. As estruturas mais estáveis no nível B3LYP/6-31G(d) foram usadas como referência. Em pH baixo, no qual a espécie  $\text{LH}_2$  é predominante, a coordenação do zinco ocorre preferencialmente no sítio V(O12-O1). Entretanto, os sítios II(O3-Oam) e I(O1-Oam) são também estáveis, apresentando energia similar ao modo V. São estes também os sítios mais favoráveis para o caso do ligante na forma  $\text{LH}^-$ , sendo o sítio II o mínimo global para a CMT-1. Em pH alto, o sítio VI(O11-O12) é o mais estável, seguido pelo modo II. Todos os sítios contêm apenas átomos de O, aqueles que contêm átomos de nitrogênio são aproximadamente  $20 \text{ kcal mol}^{-1}$  menos estáveis. Como mostrado na Figura 3.5, a ordem de estabilidade não muda com o nível de teoria aplicado; dessa forma, somente a energia livre de Gibbs obtida no nível B3LYP/6-31G(d) será discutida nesta seção.

A energia livre de Gibbs relativa ( $\Delta\Delta G_R$ ) para o processo (3.1), a qual foi calculada no nível B3LYP/6-31G(d) em fase gasosa e em solução aquosa, é apresentada na Tabela 3.2. Surpreendentemente, a estabilidade dos complexos em fase gasosa e em solução aquosa apresenta o mesmo comportamento. Para os complexos  $[\text{Zn}(\text{LH}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ , a ordem de estabilidade foi  $V > II \sim I$ . No caso dos complexos com carga +1, os modos II e I são igualmente favoráveis, e em solução aquosa a diferença de energia é próxima de  $1,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Para os complexos neutros  $[\text{Zn}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]$ , o modo de coordenação VI(O12-O1) o mais estável, seguido pelos modos II e I. A maior estabilidade do complexo VI tanto para CMT-3 quanto CMT-1 atribuída ao modo tridentado de coordenação do Zn envolvendo os átomos O11-O12-O1 do ligante (ver Figura 3.4).



**Figura 3.5** Energia de complexação relativa calculada em fase gasosa para os complexos  $[\text{Zn}(\text{LH}_n)(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+x}$ , onde  $n=0, 1, 2$  e  $x=-2, -1, 0$ .

Como já observado anteriormente para a energia relativa, os complexos nos quais o Zn está ligado a átomos de N são menos favoráveis (ver Tabela 3.2). Em geral, a ordem de estabilidade mostrada na Tabela 3.2 foi idêntica àquela ilustrada na Figura 3.5, portanto, a contribuição da energia térmica e de solvatação permanecem constantes. A partir dos valores de energia relatados podemos concluir que o sítio de coordenação do Zn depende do pH do meio. Especificamente, o modo O11-O12-O1 (anel BC) foi o mais estável em pH baixo e alto (formas  $\text{LH}_2$  e  $\text{L}^{2-}$ ), e o modo O3-Oam-O1 (anel A) foi favorável em meio neutro ( $\text{LH}^-$ ). Em todos os casos, os sítios de coordenação envolvendo somente átomos de O são mais favoráveis do que aqueles que envolvem também átomos de N.

**Tabela 3.2** Energia livre de Gibbs relativa ( $\delta\Delta G_R$  valores em kcal mol<sup>-1</sup>) em fase gasosa e em solução aquosa (valores em colchetes) calculados no nível B3LYP/6-31G(d) para os distintos sítios de coordenação da CMT-1 e CMT-3.

	CMT-1			CMT-3		
	LH <sub>2</sub>	LH <sup>-</sup>	L <sup>2-</sup>	LH <sub>2</sub>	LH <sup>-</sup>	L <sup>2-</sup>
I (O3-Oam)	6,77 [8,63]	6,90 [1,01]	47,1 [3,00]	6,9 [8,6]	<b>0,00 [0,00]</b>	45,9 [3,52]
II (O1-Oam)	8,69 [5,15]	<b>0,00 [0,00]</b>	8,7 [10,6]	14,4 [12,0]	0,41 [1,74]	5,54 [4,79]
III (O3-Nam)	37,4 [19,1]	39,7 [22,6]	55,8 [26,8]	37,9 [19,1]	32,8 [21,7]	79,7 [26,5]
IIIA (O3-Nam)	70,6 [32,8]	-	-	70,0 [33,5]	-	-
IV (O1-Nam)	26,3 [17,2]	33,1 [20,9]	37,4 [31,1]	33,3 [24,1]	29,5 [23,2]	35,8 [29,3]
IVA (O1-Nam)	32,0 [26,9]	-	-	32,1 [7,1]	-	-
V (O1-O12)	<b>0,00 [0,00]</b>	25,5 [19,2]	22,7 [8,2]	<b>0,00 [0,00]</b>	8,03 [15,3]	21,2 [7,86]
VI (O11-O12)	-	-	<b>0,00 [0,00]</b>	-	-	<b>0,00 [0,00]</b>

Este estudo inicial, como descrito na Equação (3.1), permitiu identificar os sítios preferenciais de ligação do íon Zn na molécula de CMT baseado na estabilidade dos complexos com os ligantes CMT-3 e CMT-1. No entanto, o objetivo consiste em avaliar o modo de interação das CMTs com o íon Zn presente no sítio ativo das metaloproteínas. Desse modo, a próxima etapa do trabalho foi considerar um modelo molecular que mimetize o zinco catalítico da MMP-9. Entender o mecanismo de complexação da CMT com o zinco é fundamental, tendo em vista que se espera que o modo de ação desses compostos seja pelo bloqueio do sítio ativo das enzimas.

### 3.1.3 Complexos das CMTs com modelo do zinco catalítico da MMP-9

As interações entre as CMTs e o zinco ativo da MMP-9 foram investigadas considerando somente a primeira esfera de coordenação que contem os aminoácidos His401, His405 e His411 (Figura 3.3). O modelo foi obtido da estrutura cristalográfica da pró-forma da gelatinase B (MMP-9) humana, a qual foi resolvida com resolução de 2,5 Å por Elkins e Colaboradores (Elkins *et al.*, 2002). Os domínios da enzima foram deletados, incluindo o pró-domínio inserido dentro do sítio ativo através da coordenação da cadeia lateral do aminoácido cisteína ao zinco presente no domínio catalítico da enzima. Esta ligação é rompida quando a enzima é ativada, permitindo o zinco ativo interagir com o substrato

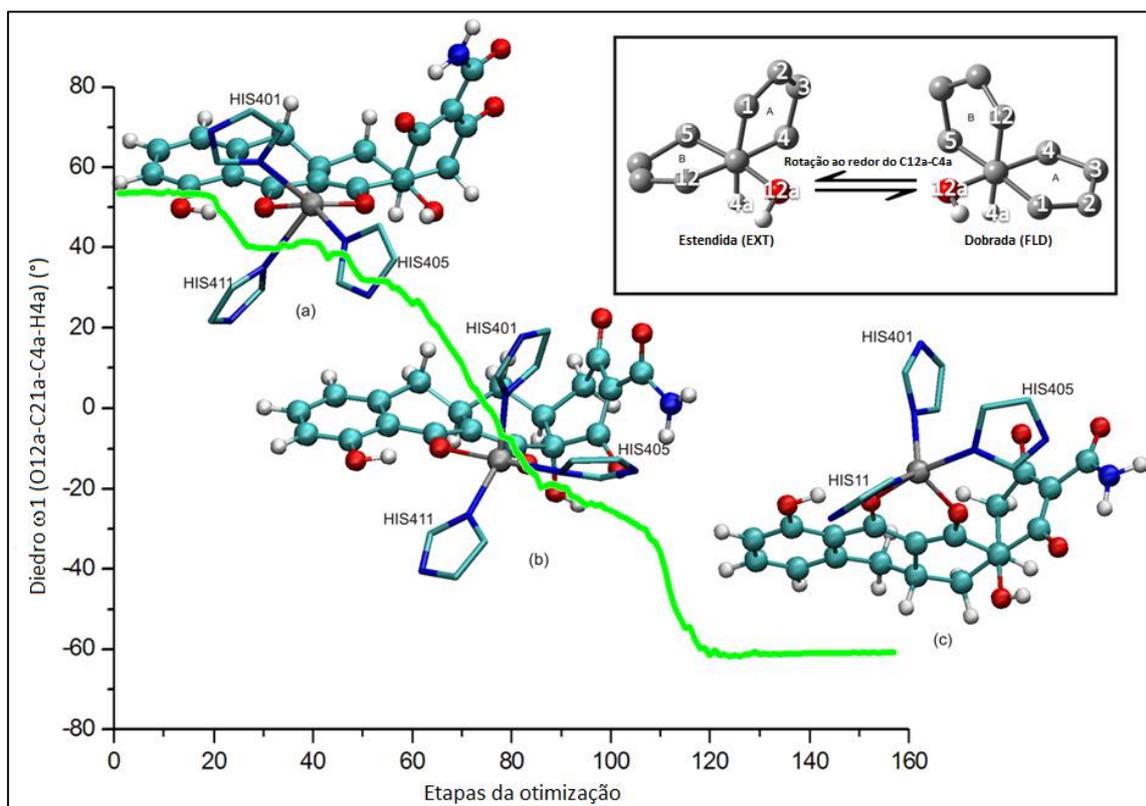
específico ou com o inibidor da MMP. Diversos estudos têm relatado a aplicação de modelo simples do sítio ativo de enzimas, os chamados modelos miméticos, para elucidação do mecanismo de ação de diversas enzimas e seus inibidores (Diaz, Suarez e Sordo, 2006; Tamames *et al.*, 2007). É conhecido que a estrutura eletrônica do metal e da sua vizinhança desempenha importante papel nos processos catalíticos das enzimas. Portanto, a representação do metal e da primeira esfera de coordenação parece ser uma boa aproximação para o estudo de reações que ocorrem no sítio ativo da enzima. Esses modelos pequenos tratados com mecânica quântica têm sido aplicados no estudo da estrutura e mecanismo de várias enzimas (Linder e Rodgers, 2004; Diaz, Suarez e Sordo, 2006; Gupta, 2007). Logo, para definir o sítio preferencial para coordenação das CMTs com o zinco, o modelo simplificado deve ser, em princípio, suficiente.

As CMT-1, CMT-3, CMT-4, CMT-7 e CMT-8 foram consideradas nesta etapa, na forma  $L^{2-}$ , na qual todos os sítios de coordenação são acessíveis. Baseados nos resultados obtidos para os complexos  $[Zn(LH_n)(H_2O)_2]^{2+x}$ , somente os sítios de coordenação mais estáveis foram tratados, incluindo os modos II(O1-Oam), V(O12-O1) e VI(O11-O12). As geometrias dos ligantes livres e dos complexos foram otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d). Os cálculos de energia foram realizados para os complexos nos níveis B3LYP/6-311+G(2d,p)// e com o funcional M06 com os conjuntos de funções 6-31G(d) e 6-311+G(2d,p). Os parâmetros termodinâmicos da reação mostrada na Equação (3.4) serão discutidos, bem como as energias e estruturas dos complexos formados.



Os comprimentos de ligação do metal-ligante foram comparados com o modelo obtido da estrutura de Raios X (Elkins *et al.*, 2002).

Antes de discutir as energias de complexação dos modos, algumas características dos complexos devem ser consideradas. Em todas as estruturas a coordenação envolve átomos de O e os ligantes CMTs atuam como bidentados. As tetraciclinas são conhecidas pela sua flexibilidade conformacional, podendo adotar diferentes formas, de acordo com o solvente e o pH do meio (Meindl e Clark, 2005). Particularmente, o processo de conversão da forma estendida (no inglês *extended* (EXT)) para a dobrada (no inglês *folded* (FLD)) foi considerado, o qual envolve a pseudo rotação da ligação C4a-C12a (ver Figura 3.6) e pode ser monitorada através do valor do ângulo diedro O12a-C12a-C4a-H4a ( $\omega_1$ ) (ver Figura 3.1 para a numeração).

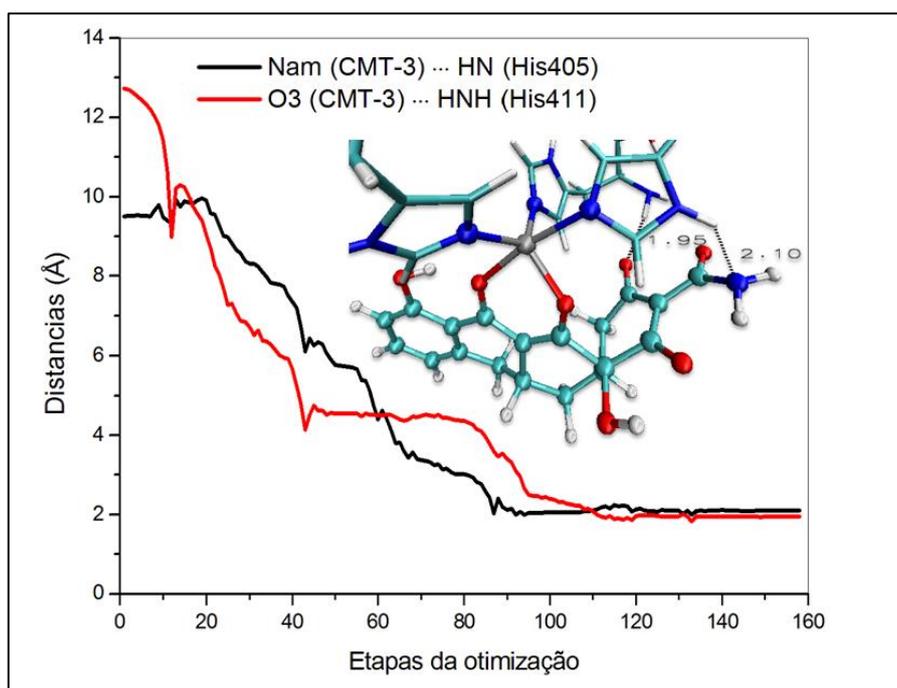


**Figura 3.6** Representação da mudança na conformação estendida (a)→dobrada (c) prevista para o complexo  $[\text{Zn}(\text{CMT-3})(\text{His})_3]$  e a variação ângulo diedro O12a-C12a-C4a-H4a ( $\omega_1$ ). A estrutura intermediária mostrada em (b) foi obtida após 72 etapas da otimização.

Na forma EXT o valor de  $\omega_1$  varia de  $50\text{-}60^\circ$  e o valor na conformação dobrada é ao redor de  $-60^\circ$  (Dos Santos *et al.*, 2003). Estudos teóricos indicam que essas geometrias diferem entre si por poucos  $\text{kcal mol}^{-1}$  (Dos Santos, De Almeida e Zerner, 1998a; Meindl e Clark, 2005; Othersen *et al.*, 2006); desse modo, é praticamente impossível identificar condições sob as quais esteja presente exclusivamente uma única espécie. As TCs podem mudar de conformação quando ocorre a coordenação com um metal. Distintos sítios de coordenação são disponíveis para diferentes formas espaciais dos ligantes da família das TCs (Othersen, Lanig e Clark, 2006).

No complexo  $[\text{Zn}(\text{CMT-L})(\text{His})_3]$ , a mudança conformacional da forma EXT para a forma FLD foi prevista para  $L=\text{CMT-3}$ . A Figura 3.6 mostra as estruturas obtidas durante a otimização do complexo no modo VI, sendo o processo  $\text{EXT}\rightarrow\text{FLD}$  claramente seguido como ilustrado na Figura 3.6. Na geometria inicial (Figura 3.6a), o valor de  $\omega_1 = 47,2^\circ$  e a geometria atribuída é estendida (Dos Santos *et al.*, 2003). A geometria obtida após 72 etapas

de otimização (Figura 3.6b) apresenta  $\omega_1 = 5,5^\circ$ . Para a geometria completamente otimizada  $\omega_1 = -60,8^\circ$ , sendo a geometria atribuída como FLD. A interconversão foi favorecida pela forte ligação de hidrogênio entre o O3 do ligante e o grupo amino da His411 ( $O3 \cdots HNH = 1,95 \text{ \AA}$ ). Uma segunda interação responsável pela estabilização da forma dobrada envolve o grupo Nam da CMT-3 e o HN da His405 ( $H2N \cdots HN(\text{His405}) = 2,0 \text{ \AA}$ ), ilustrada na Figura 3.7. No entanto, essas interações são mais difíceis de ocorrerem no ambiente do sítio ativo da proteína, no qual a flexibilidade do aminoácido é menor.

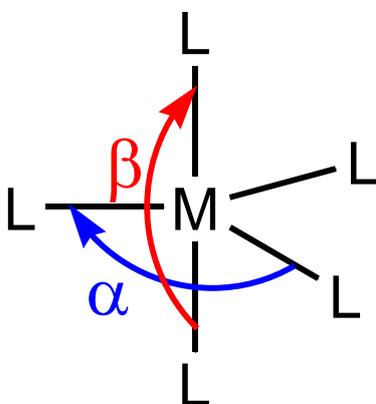


**Figura 3.7** Interações importantes ao longo da otimização da geometria para o complexo  $[Zn(CMT-L)(His)_3]$  que favorecem a mudança conformacional, calculados no nível B3LYP/6-31G(d).

Os parâmetros estruturais dos compostos calculados nos níveis B3LYP/6-31G(d) são mostrados na Tabela 3.3. Os comprimentos das ligações Zn-ligante foram aproximadamente  $2,1 \text{ \AA}$ , independentemente do tipo de ligante, sugerindo que o centro metálico Zn é pentacoordenado. Um importante aspecto estrutural a ser discutido é o grau de trigonalidade do centro metálico nos complexos. Este parâmetro foi calculado de acordo com a Equação (3.5).

$$\tau = (\beta - \alpha)/60^\circ, \tag{3.5}$$

na qual,  $\beta$  e  $\alpha$  se referem ao maior ângulo na esfera de coordenação do metal como mostra o esquema 3.1.



**Esquema 3.1.** Esquema usado para o cálculo do grau de trigonalidade ( $\tau$ ).

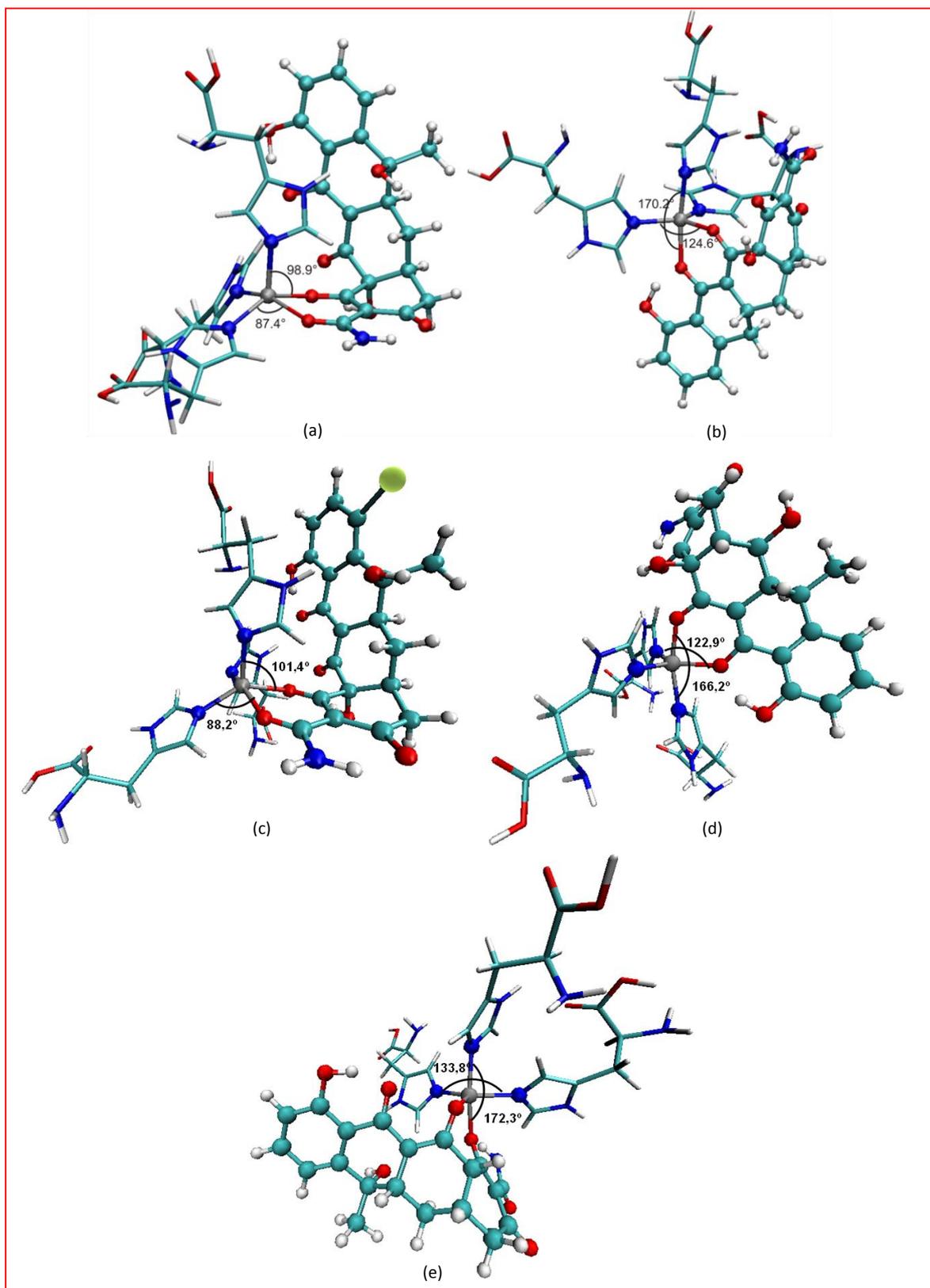
Esse parâmetro é usado para compostos pentacoordenados, nos quais para  $\tau=1$  a geometria possui simetria  $D_{3h}$  perfeita (bipirâmide trigonal) e para  $\tau=0$  a geometria é  $C_{4v}$  (pirâmide de base quadrada)(Addison *et al.*, 1984).

A análise do parâmetro  $\tau$  revela um comportamento interessante na coordenação do íon Zn no anel A das CMTs, mais precisamente no sítio II(O1-Oam). O grau de trigonalidade é próximo de zero para todos complexos, especialmente CMT-3 e CMT-1 ( $\tau = 0,1$ ), o que sugere que a geometria do centro metálico é uma pirâmide de base quadrada quase perfeita (ver Figura 3.8a, c). Por outro lado, quando coordenado no sítio V(O12-O1) e VI(O12-O11) o valor do grau de trigonalidade é próximo de 1,0, como mostrado na Tabela 3.3. Em particular, para o complexo com CMT-8 no modo V,  $\tau = 0,9$ , para o complexo da CMT-1 no modo VI,  $\tau = 0,9$ , e para a CMT-3 também no modo VI,  $\tau = 0,8$ . Todos esses complexos envolvem coordenação nos anéis A, B ou C das CMTs; e neste caso, a geometria ao redor do centro metálico é uma bipirâmide trigonal quase perfeita (ver Figura 3.8b,d,e). Esses resultados sugerem que a geometria do zinco depende do sítio de ligação, e não da CMT especificamente. Como discutido previamente o zinco pode assumir diferentes geometrias, dependendo do sítio de coordenação (Sousa, Lopes, *et al.*, 2009).

**Tabela 3.3** Parâmetros estruturais (distancias em Å e ângulos em °) calculados no nível B3LYP/6-31G(d) para os complexos [Zn(L)(His)<sub>3</sub>], onde L corresponde as distintas CMTs.

Molecules		Zn- O <sup>a</sup>	Zn- N(His401)	Zn- N(His405)	Zn- N(His411)	∠N(His401) -Zn- N(His405)	∠N(His411) -Zn- O <sup>a</sup>	τ
X-ray	MMP-9 <sup>b</sup>	-	2,05	2,21	2,26	107,27	-	-
	CMT-1	2,07	2,04	2,07	2,10	116,64	151,77	0,13
II(O1-Oam)	CMT-3	2,00	2,04	2,06,	2,27	107,48	157,68	0,11
	CMT-4	2,08	2,05	2,06	2,15	120,82	159,61	0,37
	CMT-7	2,02	2,05	2,10	2,12	136,29	174,64	0,64
	CMT-8	2,03	2,05	2,06	2,19	118,07	164,81	0,52
	CMT-1	2,03	2,05	2,11	2,16	134,88	173,79	0,65
V(O12-O1)	CMT-3	2,03	2,08	2,09	2,21	105,99	171,38	0,68
	CMT-4	2,07	2,05	2,10	2,10	127,64	170,58	0,72
	CMT-7	2,01	2,06	2,12	2,15	133,76	172,31	0,64
	CMT-8	2,02	2,07	2,08	2,17	128,16	180,00	0,86
	CMT-1	2,04	2,03	2,06	2,16	115,65	171,02	0,89
VI(O11-O12)	CMT-3	2,05	2,06	2,07	2,14	124,65	170,23	0,76
	CMT-4	2,04	2,06	2,06	2,14	112,17	168,84	0,74
	CMT-7	2,03	2,05	2,07	2,16	114,19	170,48	0,66
	CMT-8	2,00	2,04	2,08	2,19	115,25	166,17	0,72

A análise da estrutura de Raios X do complexo da MMP-9 com o inibidor hidroxamato (Rowell *et al.*, 2002) revela que o íon Zn(II) está coordenado a His405, His401, His411 e aos dois átomos de O do ligante. O centro metálico apresenta uma geometria pentacoordenada distorcida, próxima de uma pirâmide de base quadrada perfeita ( $\tau = 0,1$ ). Outra estrutura de Raios X da MMP-9 com um inibidor do tipo carboxilato (Tochowicz *et al.*, 2007), similar a CMT, foi analisada. Os resultados mostram que o metal tem número de coordenação cinco e uma geometria próxima de uma pirâmide de base quadrada. ( $\tau = 0,1$ ). Quando coordenado no sítio II, a CMT-1 e a CMT-3 interagem com o anel imidazol da histidina (His401), o que leva a diminuição do ângulo His401-Zn-O e His411-Zn-O (ver Tabela 3.3.) reduzindo o grau de trigonalidade.



**Figura 3.8** Geometrias otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d) para o complexo  $[Zn(L)(His)_3]$ , sendo L CMT-1/II(O1-Oam) (a), CMT-3/VI(O12-O11) (b), CMT-4/II(O1-Oam) (c), CMT-8/VI(O12-O11) (d) e CMT-7/V(O12-O1) (e).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3.4 mostra a energia livre de Gibbs do processo ilustrado na Equação (3.2) em fase gasosa ( $\Delta G_{R,g}$ ) e em solução aquosa ( $\Delta G_{R,aq}$ ) para todos os complexos  $[Zn(L)(His)_3]$ . Em geral, todos os processos são termodinamicamente favoráveis, exceto quando o nível B3LYP/6-311+G(2d,p) foi aplicado, mostrando vários valores de  $\Delta G_{R,aq} > 0$ . A ordem de estabilidade depende do sítio de coordenação e da estrutura do ligante. No entanto, em todos os complexos considerados, o modo mais espontâneo para a coordenação do zinco em fase gasosa, foi o sítio II(O1-Oam) para CMT-1, -4, -7 e -8, e o sítio VI(O12-O11) para a CMT-3. Este mesmo comportamento foi observado em solução aquosa, com exceção da CMT-8 quando aplicado um conjunto de funções de base *triple-zeta* (M06/6-311+G(2d,p)). Neste caso, o sítio VI foi calculado como o mais favorável para coordenação do metal em solução, o que leva a conclusão de que o sítio II(CMT-1, -4 e -7) e VI(CMT-3 e -8) são os mais favoráveis para a ligação do íon Zn(II). A energia livre de Gibbs das reações em fase gasosa e em solução aquosa foi calculada a partir da Equação (3.2) e (3.3), respectivamente. Somente o primeiro termo do lado direito da Equação (3.2) ( $\Delta E_{R,g}^{ele-nuc}$ ) foi obtido em todos os níveis de teoria, os termos referentes a correção térmica ( $\Delta G_{R,g}^T$ ) e de solvatação ( $\delta \Delta G_{sol}$ ) foram tomados do cálculo no nível B3LYP/6-31G(d). Como mostrado na Tabela 3.4, é significativo o efeito do solvente na espontaneidade dos processos pelo fato dos reagentes serem espécies carregadas e os produtos compostos neutros (ver Equação (3.1)). Apesar dos inconvenientes apresentados pelo modelo *continuum* no tratamento de espécies iônicas, os resultados obtidos em solução para as reações com as CMTs parecem razoáveis quando comparados com processos similares envolvendo outros análogos da tetraciclina (Matos e Beraldo, 1995).

Antes de discutir a relação estrutura-reatividade das CMTs, é importante destacar o efeito do nível de teoria na energia de reação. As energias de reações calculadas com o funcional M06 foram cerca de 4-7% menores (valores mais negativos) que os correspondentes dados no nível B3LYP. Quando o conjunto de funções de base aumenta, a energia de reação também aumenta de 8-9%; portanto, os valores calculados usando o nível M06/6-311+G(2d,p) são mais satisfatórios, equilibrando ambos os efeitos. Por isso somente esses valores são discutidos nesta seção (penúltima coluna da Tabela 3.4)

**Tabela 3.4** Energia livre de Gibbs (em kcal mol<sup>-1</sup>) para a formação do complexo [Zn(L)(His)<sub>3</sub>] com L = CMT-1, -3, -4, -7 e -8.

	$\Delta G_{R,g} [\Delta G_{R,aq}]^a$				Log $\beta$ <sup>b,c</sup>
	B3LYP/ 6-31G(d)	M06// 6-31G(d)	B3LYP// 6-311+G(2d,p)	M06// 6-311+G(2d,p)	
<b>CMT-1</b>					
II (O1-Oam)	<b>-286,5[-28,3]</b>	<b>-300,8[-42,7]</b>	<b>-263,7[-5,55]</b>	<b>-283,1[-24,9]</b>	18,3
V (O1-O12)	-257,4[-14,1]	-272,5[-29,3]	-238,2[5,06]	-257,1[-13,9]	10,2
VI (O11-O12)	-261,5[-17,8]	-271,9[-28,2]	-241,9[1,77]	-255,9[-12,3]	9,0
<b>CMT-3</b>					
II (O1-Oam)	-284,2[-20,7]	-299,4[-37,0]	-262,4[0,00]	-282,8[-20,5]	15,0
V (O1-O12)	-257,4[-8,36]	-269,6[-21,7]	-237,8[10,0]	-253,8[-5,92]	4,3
VI (O11-O12)	<b>-293,6[-24,5]</b>	<b>-308,3[-40,4]</b>	<b>-269,0[-1,00]</b>	<b>-289,7[-21,7]</b>	15,9
<b>CMT-4</b>					
II (O1-Oam)	<b>-293,7[-27,9]</b>	<b>-312,4[-48,8]</b>	<b>-269,5[-5,91]</b>	<b>-294,9[-31,3]</b>	23,0
V (O1-O12)	-270,7[-17,4]	-287,7[-36,7]	-249,3[1,71]	-271,8[-20,8]	15,3
VI (O11-O12)	-272,7[-16,2]	-288,2[-34,0]	-251,7[2,55]	-272,9[-18,6]	13,6
<b>CMT-7</b>					
II (O1-Oam)	<b>-274,1[-13,9]</b>	<b>-293,7[-35,0]</b>	<b>-250,7[8,08]</b>	<b>-276,8[-18,1]</b>	13,3
V (O1-O12)	-262,6[-18,0]	-276,2[-33,1]	-243,2[-0,03]	-260,5[-17,3]	12,7
VI (O11-O12)	-257,5[-16,1]	-268,9[-29,0]	-238,8[1,07]	-253,7[-13,8]	10,1
<b>CMT-8</b>					
II (O1-Oam)	<b>-285,9[-23,3]</b>	<b>-304,1[-43,5]</b>	<b>-261,1[-0,50]</b>	<b>-286,3[-25,7]</b>	18,8
V (O1-O12)	-266,3[-22,6]	-279,8[-38,1]	-245,5[-3,83]	-252,0[-10,3]	7,6
VI (O11-O12)	-258,2[-22,5]	-267,6[-33,9]	-239,5[-5,82]	-262,7[-29,0]	21,3

<sup>a</sup> A notação // usada para o nível de teoria indica que a geometria foi otimizada no nível B3LYP/6-31G(d). <sup>b</sup> Calculado usando os valores de energia obtidos no nível M06/6-311+G(2d,p)//. O  $\log\beta = -\Delta G_{R,aq}/1,364$ . <sup>c</sup> O valor experimental de  $\log\beta = 15,59 \pm 0,01$  para o complexo AHTC-Zn(II) (Matos e Beraldo, 1995).

Como já foi descrito previamente, a reação do íon Zn(II) com CMT-1 ocorre preferencialmente no sítio II, já para a CMT-3 o sítio VI foi levemente mais favorável (1,2 kcal mol<sup>-1</sup>). As geometrias desses modos são mostrados na Figura 3.8a,b. Comparando os

valores da energia livre de reação para CMT-1 e CMT-3 (Tabelas 3.2 e 3.4), podemos observar que a CMT-3 apresenta o mesmo comportamento, com o sítio VI mais estável. No entanto, para a CMT-1, o modo II é cerca de 12,6 kcal mol<sup>-1</sup> menos estável do que o modo VI quando o modelo biológico é considerado. A ordem de estabilidade dos complexos com a CMT-4 é idêntico ao previsto para CMT-1 (II > V ~VI, ver Tabela 3.4). As estruturas dessas moléculas são similares, diferindo apenas na posição C7 (ver geometria do modo II na Figura 3.8c). Para CMT-7 o modo II é o mais estável, entretanto, o modo V é igualmente estável e foi somente 0,8 kcal mol<sup>-1</sup> menos favorável em solução. Diferente das outras CMTs, a CMT-7 não possui o grupo OH na posição C12a, o que pode influenciar na coordenação no sítio V(O12-O1). A geometria do modo V para a CMT-7 está mostrada na Figura 3.8e.

A relação estrutura-reatividade para os complexos com CMT-8 é similar a CMT-3, e a seguinte ordem de estabilidade foi observada: VI > II > V. Um fator estrutural comum entre esses dois ligantes é a ausência do grupo OH na posição C6. A CMT-8 possui um grupo hidroxila na posição C5, semelhante ao seu análogo antimicrobiano mais direto, a doxiciclina (ver Figura 1.4).

A interação do análogo AHTC (ver Figura 1.4) com íon Zn(II) em solução aquosa foi estudada por Beraldo e Matos (Matos e Beraldo, 1995) aplicando espectroscopia de dicroísmo circular. Os resultados deste estudo sugerem que o zinco se coordena no sítio VI(O12-O11), e a constante de formação do complexo AHTC-Zn(II) (em escalas logarítmicas) foi igual a  $\log \beta = 15,59 \pm 0,01$ . A Tabela 3.4 mostra os valores das constantes de formação dos complexos CMTs-Zn(II) no nível M06/6-311+G(2d,p) em solução aquosa. Embora exista uma grande diferença entre o sistema experimental e modelo teórico, os valores das constantes de formação dos complexos foram comparados. Os resultados experimentais sugerem que a coordenação com o zinco ocorra no sítio VI, o qual é igualmente favorável para a CMT-3 ( $\log \beta = 15,9$ ) e CMT-8 ( $\log \beta = 21,3$ ). A principal diferença entre as CMT-3 e -8 e as demais é a ausência do grupo OH na posição C6, o que parece estabilizar o modo VI. Similarmente ao análogo doxiciclina (Acharya *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010), a qual é uma efetiva inibidora de MMP, e também não contém o grupo OH na posição C6, o que sugere que a presença da hidroxila dificulta a coordenação do metal na posição O12-O11.

Até o presente momento, o mecanismo molecular de inibição das MMPs pelas tetraciclinas quimicamente modificadas não foi completamente descrito. Entretanto, a relação estrutura-atividade das CMTs já foi observada. As diferenças estruturais entre as CMTs afetam a habilidade das mesmas em interagir com proteases. No presente estudo foi

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

demonstrado que a estrutura das CMTs interferem na coordenação com o íon Zn(II) presente no sítio ativo das MMPs. Baseados na energia relativa, mostrada na Tabela 3.4, os análogos CMT-3 e CMT-8, com o sítio VI(O12-O11) como preferencial para a coordenação do íon Zn(II), apresentam um comportamento interessante. Para as outras CMTs o sítio preferencial foi o II ou V (ver Tabela 3.4). Portanto, considerando o modelo simples do ambiente químico do zinco catalítico das MMPs reagindo com o conjunto de CMTs, as propriedades estruturais e energéticas determinadas no presente estudo sugerem que a CMT-3 e CMT-8 apresentam características diferentes para a coordenação com o zinco, o que pode estar relacionado com a atividade distinta dessas moléculas enquanto IMMP.

### 3.2 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR NA MODELAGEM DOS COMPLEXOS DA METALOPROTEINASE MMP-2 COM OS LIGANTES CMTS

Como discutido anteriormente, as tetraciclinas quimicamente modificadas estão entre os candidatos mais promissores a inibidores das metaloproteinases da matriz (Tu *et al.*, 2008). A inibição das MMPs é uma estratégia terapêutica para o tratamento de diversas patologias, sobretudo aquelas que estão relacionadas à progressão celular, como o câncer. Considerando os números relacionados a essa doença, que a classifica como um problema de saúde pública mundial (Inca, 2011; Nci, 2013), há um grande esforço em identificar novos inibidores sintéticos de MMPs (ver Tabela 1.2). No entanto, o único IMMP disponível no mercado, a doxiciclina (ver Figura 1.4), é usado no tratamento de doenças periodontais e atua inibindo a atividade das MMP-7 e -8 (Kumar *et al.*, 2008). Outros análogos da TC vêm sendo testados frente a diferentes linhagens de células tumorais. Atualmente o composto em fase mais avançada é a CMT-3 (Col-3 ou *metastat*®), que está em fase II de testes clínicos como um antimetastático (Clendeninn e Appelt, 2001). Entre outros, o *metastat* inibe MMP-2 e MMP-9, impedindo a metástase em modelos pré-clínicos de câncer de próstata. A fase II de testes tem mostrado bons resultados em modelos de sarcoma de *Kaposi* (Tumor maligno do endotélio linfático) (Tu *et al.*, 2008). Apesar de tudo o que já foi obtido de estudos com testes biológicos *in vivo* e *in vitro*, é preciso ressaltar que ainda não há muita informação sobre o mecanismo de ação das CMTs como IMMPs.

Na seção anterior do presente estudo, foram empregadas metodologias teóricas na investigação do modo de coordenação das CMTs com o íon Zn(II) presente no sítio ativo das MMPs. Essa interação ligante-metal também foi avaliada usando um modelo mimético do sistema biológico que foi construído a partir da estrutura cristalográfica da MMP-9 e continha a primeira esfera de coordenação do metal (His401, His405 e His411). Em metaloproteínas a estrutura eletrônica do metal e da sua vizinhança imediata é fundamental para o processo catalítico das enzimas. Por isso o uso de modelos pequenos usando métodos de mecânica quântica é frequentemente aplicado no estudo de sítios ativos de enzimas e mecanismos de reação enzimática (Diaz, Suarez e Sordo, 2006; Himo, 2006; Sousa, Carvalho, *et al.*, 2009). No entanto, para entender em nível molecular o mecanismo de ação das CMTs, enquanto inibidoras das MMPs, é preciso modelar a interação com toda a proteína para incluir os efeitos estruturais e energéticos do ambiente proteico além da esfera de coordenação do zinco. Neste sentido, nesta seção será apresentado o estudo da

modelagem molecular dos complexos de diferentes CMTs com o domínio catalítico da MMP-2 baseado na metodologia de docking molecular.

### 3.2.1 Tratamento teórico

As estruturas de Raios X das gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) humana foram obtidas do *Protein Data Bank*. A estrutura da MMP-9 foi resolvida por Rowsell e colaboradores (Rowsell *et al.*, 2002) (código PDB, 1GKC) com uma resolução de 2,3 Å e a estrutura da MMP-2 foi resolvida por Dhanaraj e colaboradores (Dhanaraj *et al.*, 1999) (código PDB, 1QIB) com resolução de 2,8 Å. Todas as moléculas de água foram removidas e os átomos de hidrogênio adicionados a enzima em pH 7,0.

As estruturas dos ligantes CMT-n (n= 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8) foram otimizadas usando o DFT com o funcional híbrido B3LYP(Becke, 1988a; Lee, Yang e Parr, 1988) e o conjunto de funções de base 6-31G(d)(Curtiss *et al.*, 1998; Rassolov *et al.*, 2001) para todos os átomos. O mapa de potencial eletrostático (MEP) para as geometrias otimizadas foi gerado usando o utilitário do Gaussian09(Frisch *et al.*), CUBEGEN. As isoenergias de contorno dos MEPs foram calculadas e sobrepostas numa superfície de densidade eletrônica constante de 0,2 e/bohr<sup>3</sup> usando o programa *Gaussianview 5.0*.

Os ligantes foram docados dentro do sítio ativo da enzima usando os programas AutoDockTools e AutoDock 4.0 (Morris *et al.*, 2009). Os arquivos de entrada no formato adequado para o AutoDock foram gerados usando o programa VsLab (Cerqueira *et al.*, 2011). As cargas atômicas para os ligantes foram calculadas no nível B3LYP/6-31G(d). Um modelo não ligado foi usado para o átomo de zinco e os seguintes parâmetros foram adotados: raio de van der Waals = 1,1 Å; profundidade do poço potencial = 0,25 kcal mol<sup>-1</sup>; carga = +2,0e (Stote e Karplus, 1995). A grade utilizada para os estudos de docking foi definida como 80x80x80 Å centrada no átomo de zinco catalítico da enzima e com 0,275 Å de espaço entre os pontos da grade. Como parâmetro para o docking molecular, foi empregado o algoritmo genético lamarckiano ou AGL. O número de conformações previstas para as simulações foi de 100, e o número máximo de corridas realizadas pelo algoritmo foi 27.000. As 100 conformações de menor energia foram selecionadas pelo programa como as melhores conformações dos ligantes nos sítios receptores. As melhores poses dos ligantes dentro do sítio ativo das MMPs foram escolhidas baseadas em dois critérios: a função *scoring* do programa AutoDock (Morris *et al.*, 1998) e na menor distância entre os ligantes CMT-n e o átomo de zinco catalítico.

A estrutura da MMP-2 usada neste estudo estava complexada com o inibidor hidroxamato, mas as coordenadas do inibidor não foram depositadas no PDB, por isso para validar o protocolo de docking adotado neste estudo foi realizado um experimento de re-docking com a MMP-9 complexada com o hidroxamato-reverso (N-formil hidroxilamina) (código PDB 1GKC) (Rowse *et al.*, 2002). As conformações e todas as principais interações foram analisadas e serão discutidas.

### 3.2.2 Validação do protocolo de docking

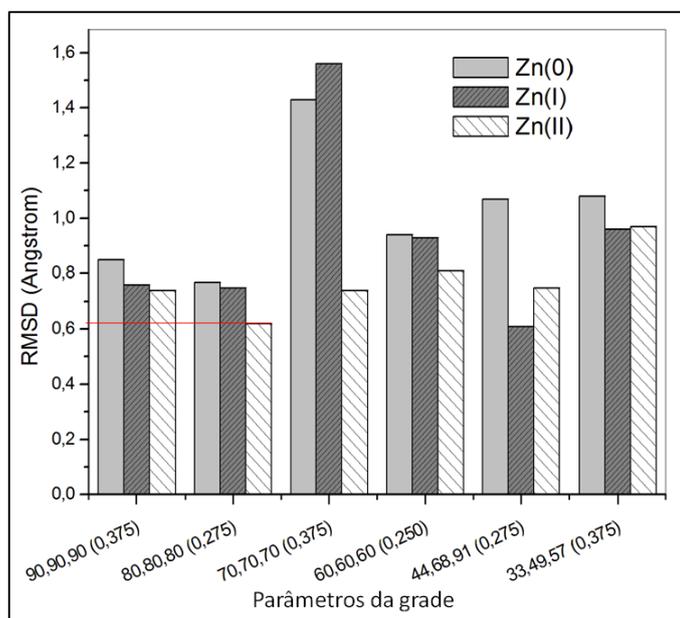
Para validar o protocolo de docking adotado neste estudo, primeiramente foi realizado um experimento de re-docking usando a estrutura da MMP-9 complexada com o hidroxamato-reverso. As moléculas de água foram removidas, bem como a molécula do ligante, que foi novamente ancorado dentro do sítio ativo da MMP-9 seguindo o protocolo descrito acima.

Foram realizados vários testes variando os parâmetros da grade e também para o átomo de zinco. O ponto mais delicado dentro do protocolo de docking a ser adotado no estudo de sistemas envolvendo metais é justamente os parâmetros para o metal. No caso das MMPs, o átomo de zinco pode ser tratado com parâmetros obtido em outros estudos, como discutido por Shelver e Hu (Hu e Shelver, 2003). Neste estudo os autores usaram os parâmetros de vdW obtidos por Stoke e Karplus (Stote e Karplus, 1995) ( $r = 1,1 \text{ \AA}$ ;  $\epsilon = 0,25 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) para o átomo de zinco no processo de re-docking de quarenta complexos diferentes de MMPs/ligantes com estrutura conhecida, e mostraram bons resultados com diferentes programas de docking. No entanto o uso da carga formal +2e para o átomo de Zn pode não ser realístico, uma vez que a carga deve estar distribuída pelos átomos coordenados ao metal. Por isso os autores (Hu e Shelver, 2003; Hu, Balaz e Shelver, 2004) sugerem que num estudo de docking é importante uma avaliação dos parâmetros a serem usados para o zinco, os quais podem ser determinantes, principalmente em estudos envolvendo MMPs. Neste sentido, na presente tese foram avaliados três valores diferentes de carga para o átomo de zinco, e ainda diferentes parâmetros de grade. A Figura 3.9 mostra os resultados desses parâmetros em função do desvio médio quadrático, RMSD (*Root Mean Square deviation*), que é uma medida muito usada para a geometria tridimensional de moléculas para comparar duas conformações de um dado conjunto de pontos, tipicamente átomos. No geral, para um conjunto de átomos idênticos presentes em duas conformações diferentes, a análise por RMSD fornece uma medida da diferença entre esses dois conjuntos de átomos. O docking

pode ser avaliado baseado no RMSD entre as estruturas obtidas no docking e a estrutura de Raios X, que deve ser menor que 2Å para ser aceitável. O RMSD é calculado a partir da relação abaixo:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{ci} - x_{di})^2 + (y_{ci} - y_{di})^2 + (z_{ci} - z_{di})^2} \quad (3.6)$$

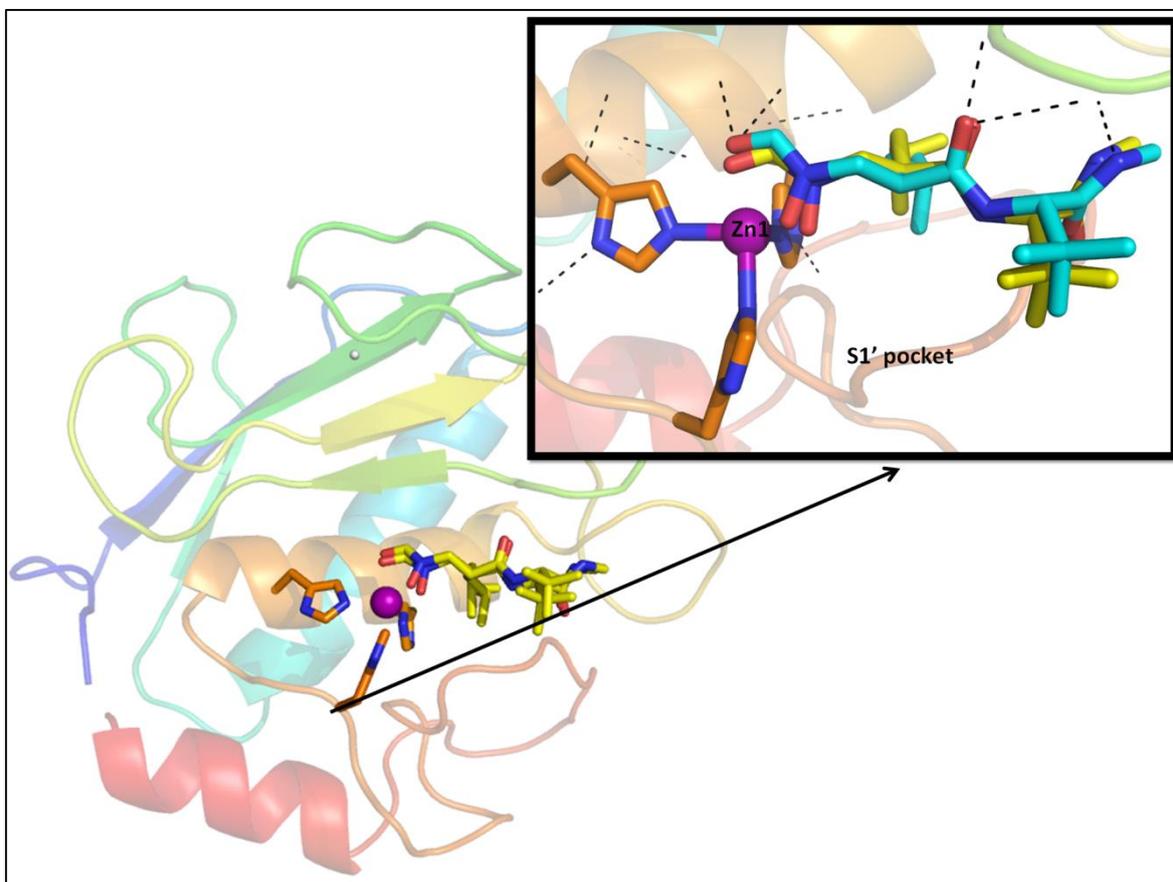
Nesta Equação  $x_c, y_c, z_c$  são as coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica e  $x_d, y_d, z_d$  são as coordenadas atômicas das estruturas obtidas com o docking.



**Figura 3.9** Parâmetros da grade versus RMSD entre as estruturas do docking e de Raios X para diferentes cargas no átomo de zinco. Os valores entre parênteses referem-se ao espaçamento da grade.

Os dados mostrados na Figura 3.9 sugerem que neste caso é razoável usar a carga formal +2e para o zinco e os parâmetros de grade como 80x80x80 e 0,275 Å de espaço entre os pontos da grade. Esse conjunto de parâmetros levou a estrutura do complexo MMP-9:hidroxamato-reverso com menor RMSD, 0,61 Å. A estrutura obtida no docking foi sobreposta à estrutura de Raios X como mostrado na Figura 3.10. Foi verificado que as principais interações de hidrogênio entre o inibidor e o sítio ativo da MMP-9 foram mantidas,

definindo assim o protocolo de docking a ser aplicado na determinação dos complexos da MMP-2 com as CMT-n.

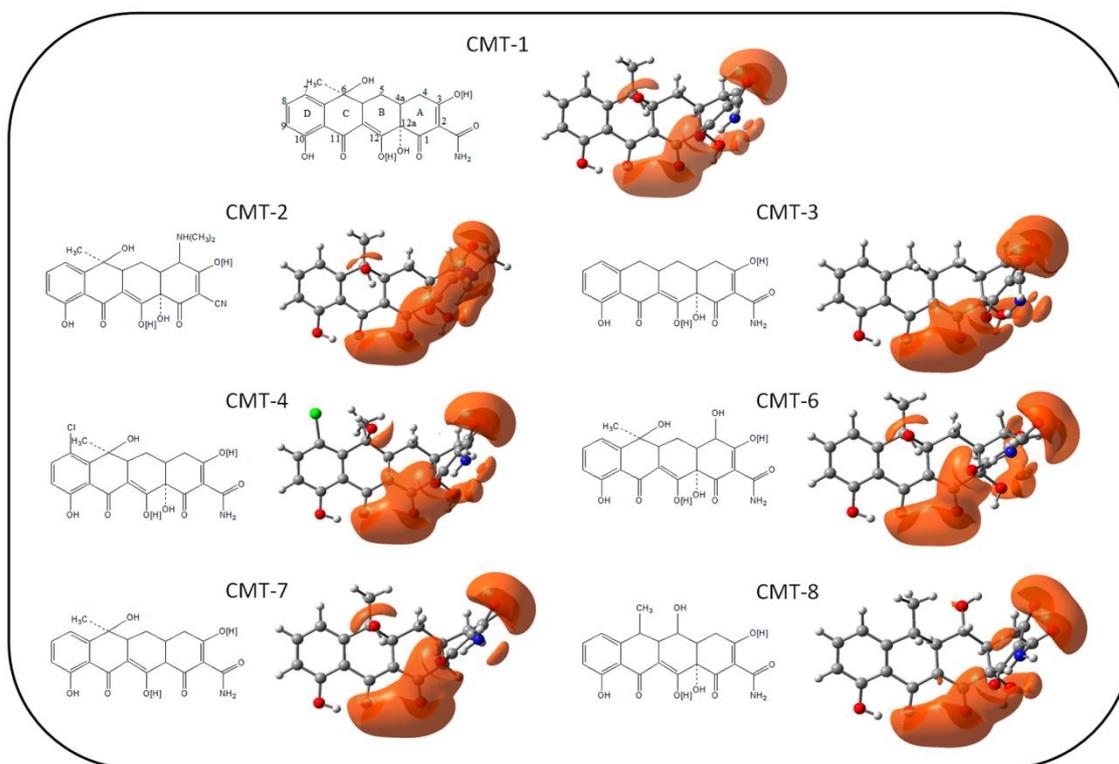


**Figura 3.10** Sobreposição do inibidor hidroxamato-reverso ancorado dentro do sítio ativo da MMP-9 (1GKC)(RowSELL *et al.*, 2002). A conformação experimental está mostrada na cor amarela, e a conformação obtida com o docking está mostrada na cor azul.

### 3.2.3 Estrutura dos ligantes CMT-n

As geometrias dos ligantes CMT-n (Figura 3.11) foram otimizadas no nível B3LYP/6-31G(d) e o mapa de potencial eletrostático foi calculado no mesmo nível e são mostrados na Figura 3.11. Nessa figura está ilustrada apenas a isossuperfície de potencial negativa, que apresenta o mesmo perfil para todos os ligantes CMT-n. De fato, esse potencial está localizado principalmente sobre os átomos de oxigênio do grupo carbonila C3-C2 no anel A da CMT, e também sobre os grupos  $\beta$ -dicetona nos carbonos C11 e C12 dos anéis B-C da CMT. Essas regiões representam um forte potencial como aceitadores de ligações de

hidrogênio, que poderia vir a estabilizar o ligante no complexo formado com sítio ativo da proteína, através das interações com as cadeias laterais dos aminoácidos da região.



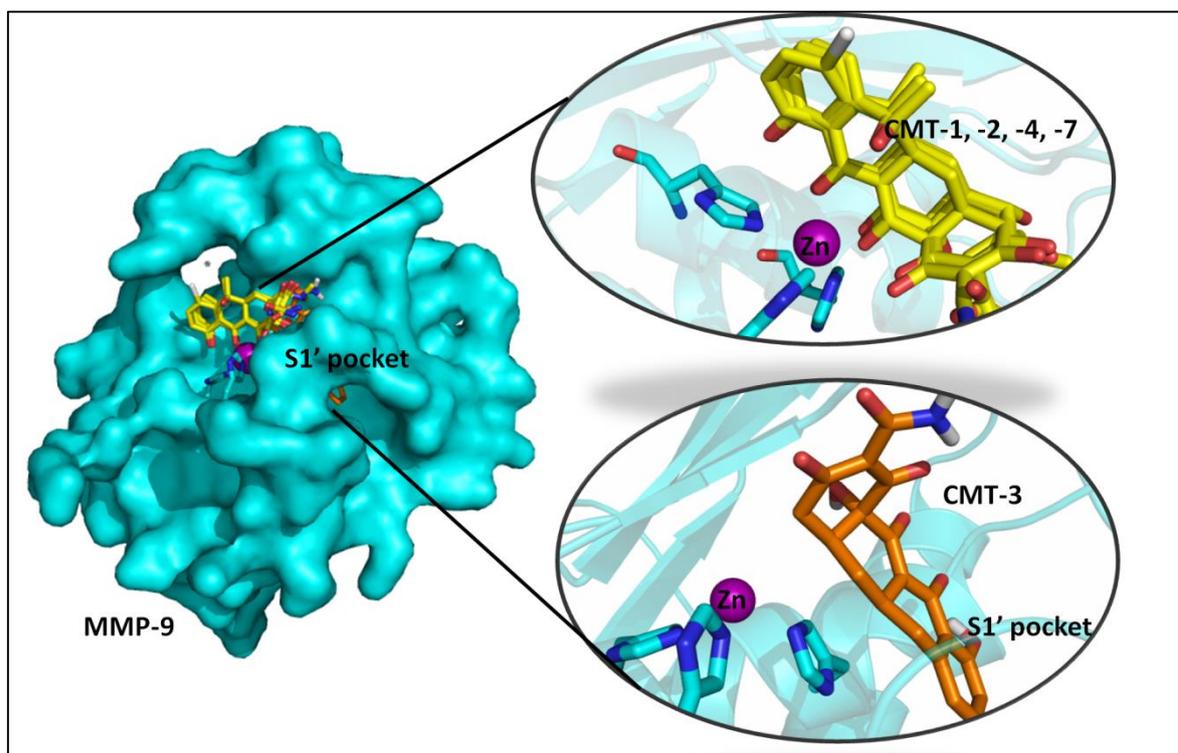
**Figura 3.11** Estruturas das tetraciclinas quimicamente modificadas e o mapa de potencial eletrostático gerado no nível de teoria B3LYP/6-31G(d).

As duas regiões com maior concentração de densidade de carga negativa são bastante importantes para a tetraciclina e todos os seus derivados. A região do anel A é a única região conhecida dessa família que apresenta flexibilidade conformacional, podendo adotar diferentes formas, de acordo com o solvente e o pH do meio (Meindl e Clark, 2005), como discutido na seção 3.1.3. Estudos envolvendo mecânica quântica e mecânica molecular para tetraciclina e alguns análogos verificaram a existência das conformações estendida, dobrada e torcida (Dos Santos *et al.*, 2003; Othersen *et al.*, 2003; Aleksandrov e Simonson, 2009). A segunda região sobre o anel B-C-D é um sítio comum nas tetraciclinas de coordenação com metais alcalinos e alcalinos terrosos (Lee e Everett, 1981; Desiqueira *et al.*, 1994; Machado *et al.*, 1995; Matos e Beraldo, 1995; Aleksandrov e Simonson, 2006). O mecanismo de ação das tetraciclinas como antibiótico passa pela interação com proteínas ribossomais como a TetR, (Scholz *et al.*, 2003) onde ocorre a coordenação dos O11-O12 com íons metálicos bivalentes Ca(II) e Mg(II). Este é também considerado o principal sítio de ligação para as

CMTs com o íon Zn(II) das MMPs. Esta ideia surge do fato do análogo CMT-5, para o qual esse sítio não está disponível para coordenação, não inibir a atividade das MMPs *in vitro* (Ryan *et al.*, 2001). Na seção 3.1 deste trabalho foram discutidos os resultados que mostram que para modelos pequenos do sítio ativo das MMPs interagindo com as CMTs a coordenação do íon Zn(II) com o sítio O11-O12 é o mais favorável para os análogos CMT-3 e CMT-8.

### 3.2.4 Modelagem molecular dos complexos MMP-2:CMT-n

A primeira etapa para explorar a interação dos complexos MMP-2:CMT-n foi aplicar o experimento de docking molecular para identificar as estruturas mais estáveis dos complexos. As CMT-n foram ancoradas dentro do sítio ativo da MMP-2 (código PDB 1QIB) e as melhores poses foram analisadas. A Figura (3.12) ilustra a isossuperfície da MMP-2 e a posição das diferentes CMT-n dentro do sítio ativo, caracterizadas como as mais estáveis, com menor energia de ligação, dentro das 100 soluções obtidas no AutoDock.



**Figura 3.12** Isossuperfície da MMP-2 com as CMT-n ancorados dentro do sítio ativo da enzima.

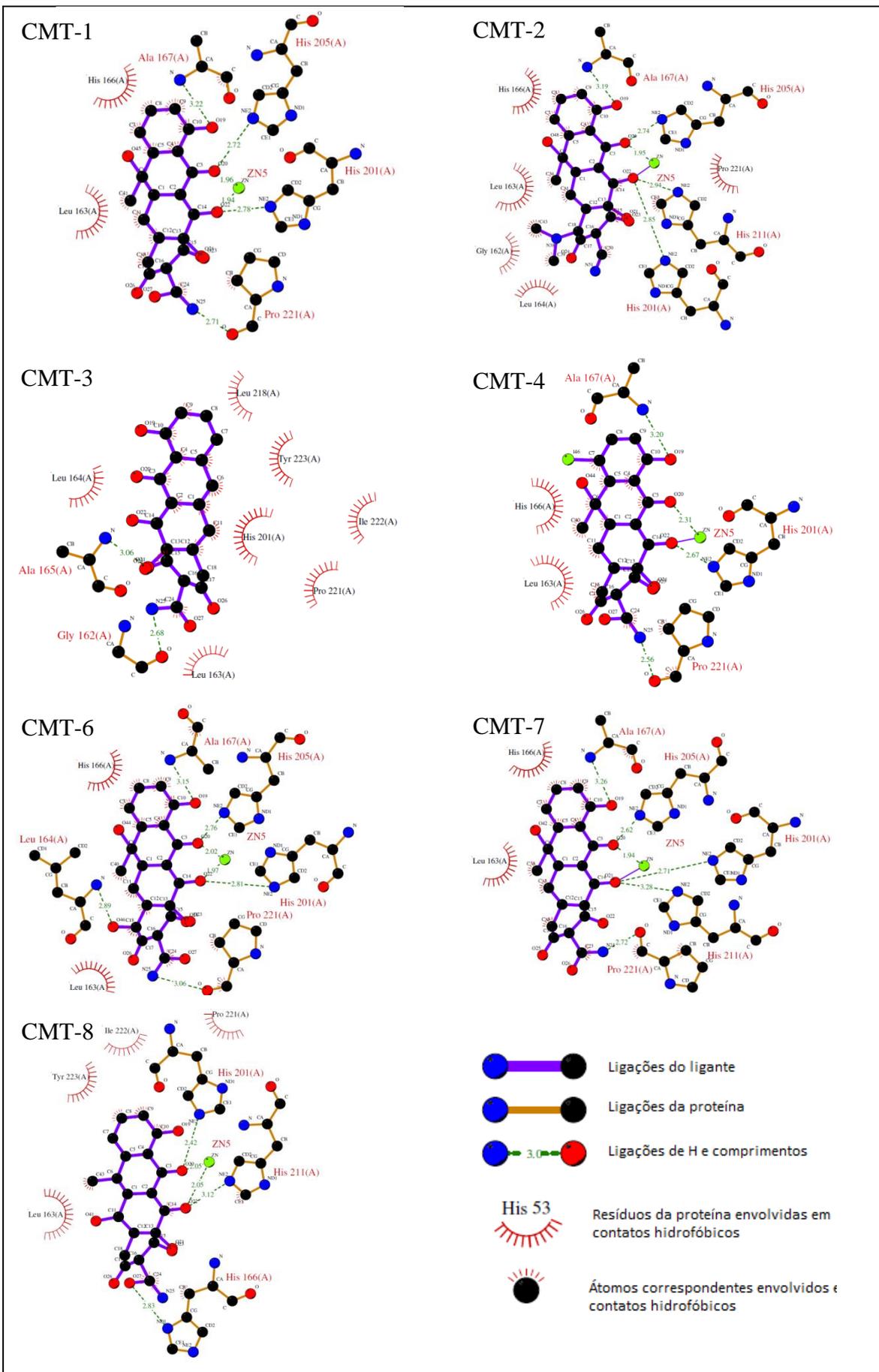
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção da CMT-3 todos os outros ligantes apresentam uma conformação semelhante dentro do sítio ativo da MMP-2. As CMT-n apresentam o sítio O11-O12 próximos do íon zinco catalítico da enzima, a distância média entre o íon Zn(II) e o átomo O11 da hidroxila e o O12 da carbonila foram  $2,01 \pm 0,17$  e  $1,91 \pm 0,11$  Å, respectivamente (Figura 3.13). Esses valores sugerem que as CMT-n estão na esfera de coordenação do metal, como observado experimentalmente para os inibidores da família dos hidroxamatos.

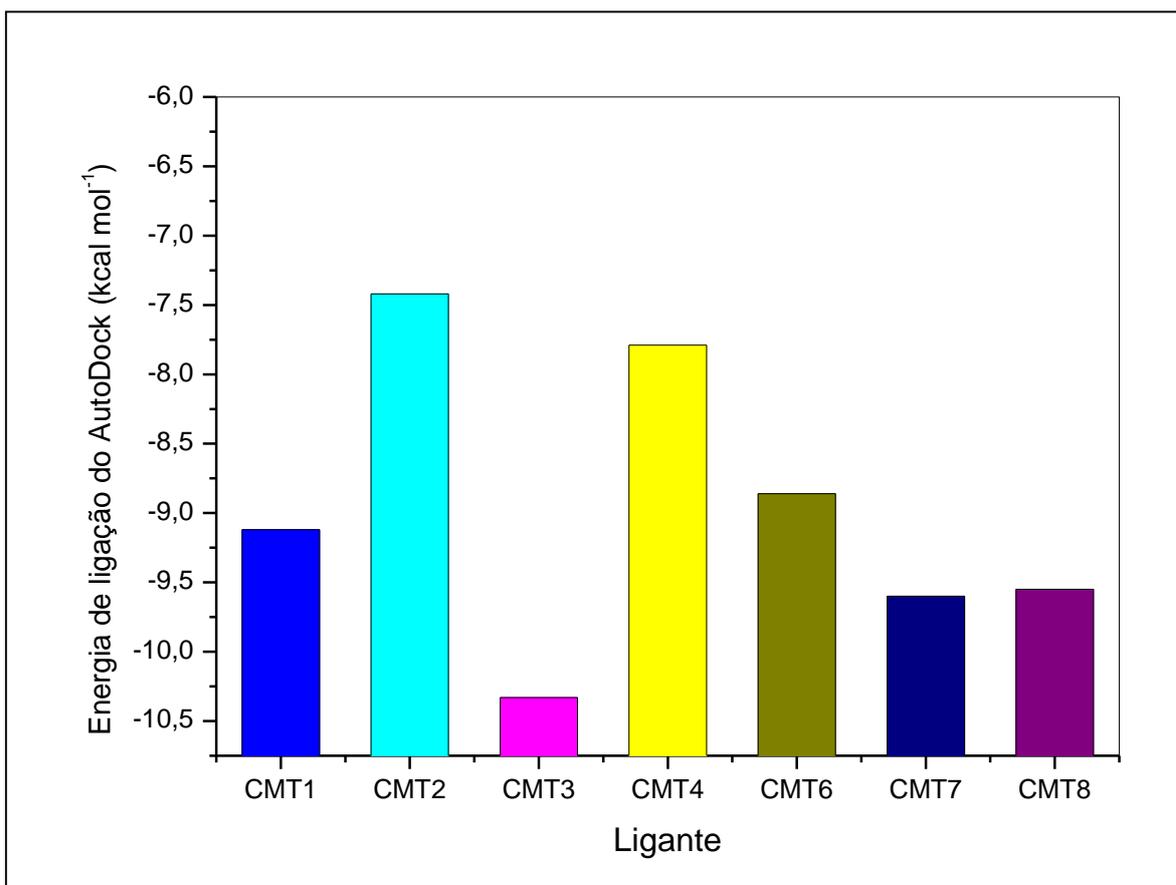
A melhor pose obtida com o docking para o ligante CMT-3 mostra a molécula dentro do bolso S1' ou bolso de seletividade já que é a principal diferença estrutural entre as diferentes MMPs, e que no caso das gelatinases tem uma forma de um canal ou túnel hidrofóbico que conduz até o solvente. Este resultado pode ser explicado pelas diferenças estruturais entre as CMT-n, uma vez que a CMT-3 é o análogo da tetraciclina com a estrutura mais simples por não apresentar nenhum substituinte nas posições C4, C6 e C7 (Figura 3.11). Entretanto a CMT-3 está envolvida numa série de interações hidrofóbicas com resíduos da proteína como mostrado na Figura 3.13. Esta observação sugere que o impedimento estérico, devido aos grupos volumosos, sobretudo na posição C6, determina como as CMT-n interagem com o sítio ativo da MMP-2. Neste ponto é importante lembrar que a segunda geração de inibidores das MMPs foi desenhada para que tivessem um substituinte capaz de interagir dentro do túnel S1' e S2', além de interagirem com o íon zinco através do grupo hidroxamato. Neste contexto, todas as CMT-n com exceção da CMT-3 possuem um substituinte na posição C6 e isso explicaria a maior especificidade e potência biológica apresentada pela CMT-3.

Uma análise das melhores soluções obtidas com o docking baseadas na energia de ligação do AutoDock (*Lowest Docked binding Energy, LDBE*) (Figura 3.14) para os complexos MMP2:CMT-n mostram que a CMT-3 ( $-10,33$  kcal mol<sup>-1</sup>) é o ligante com maior afinidade pelo sítio ativo da MMP-2, seguido pelo ligante CMT-7 ( $-9,12$  kcal mol<sup>-1</sup>). O ligante CMT-2 apresenta a menor afinidade pelo sítio ativo. Esse comportamento parece estar em acordo com testes experimentais que mostram que a CMT-3 é a mais ativa na inibição da atividade enzimática da gelatinase na linhagem de células C8161 de melanoma humano extremamente invasivo e metastático (Seftor *et al.*, 1998). Neste mesmo tipo de célula foi observado que a CMT-2 não inibia a atividade enzimática da MMP-2.

As melhores poses das CMT-n dentro do sítio ativo da MMP-2 foram caracterizadas através da metodologia de docking molecular e serão usadas como ponto de partida para um estudo mais completo da interação das CMT-n com as MMPs aplicando simulação de DM.



**Figura 3.13** Principais interações proteína-ligante nas melhores soluções do docking.



**Figura 3.14** Energia de ligação do AutoDock (*Lowest Docked binding Energy, LDBE*) para as CMT-n com a MMP-2.

### 3.3 DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO CONJUNTO DE PARÂMETROS PARA OS ÍONS ZN(II) DE ACORDO COM O CAMPO DE FORÇAS AMBER

A importância das MMPs para processos fisiológicos e patológicos já foi amplamente discutida (Gupta, 2007; Murphy e Nagase, 2008; Li *et al.*, 2009; Roy, Yang e Moses, 2009), justificando o fato de obter inibidores potentes e seletivos para MMPs poder representar uma inovação terapêutica. Mas, embora essa busca venha ocorrendo intensamente nas últimas duas décadas ainda não se obtiveram os resultados esperados. Neste sentido é sabido da necessidade de combinar metodologias teóricas sofisticadas com métodos experimentais na tentativa de identificar os fatores estruturais específicos de cada MMP. No contexto de metodologias teóricas, um dos grandes desafios é tratar em nível molecular todo o sistema alvo, com as simulações de DM representando uma forte estratégia para o estudo de sistemas macromoleculares como as MMPs.

Como descrito na seção 2.4 a DM é fundamentada na mecânica clássica, as moléculas são tratadas como um conjunto de átomos ligados e a energia é então obtida como um somatório de diferentes contribuições (ligação, ângulos, diedros, termos não ligados), sendo cada termo uma função individual previamente parametrizada para um dado conjunto de tipos de átomos. Essa função é conhecida como campo de forças da MM e é dependente dos parâmetros individuais para cada tipo de átomo. Portanto, para aplicar um determinado campo de forças na simulação de um sistema de interesse é necessário que todos os átomos do sistema possuam parâmetros (constantes de força e posições de equilíbrio) definidos para aquele campo de forças.

A maioria dos campos de força foi parametrizada para moléculas orgânicas e sistemas biológicos e raramente para metais de transição. No entanto, muitos sistemas biológicos são dependentes de metais como Fe, Mo, Co, Zn entre outros. Por isso na literatura há diversos trabalhos abordando a descrição teórica dos íons metálicos nas metaloenzimas. Aqvist e Warshel (Aqvist e Warshel, 1993) aplicaram os chamados “átomos Dummy” (modelos de átomos fictícios que permitem manter as geometrias do composto) para representar íons metálicos em diferentes metaloenzimas. Este método foi extensivamente testado e mostrou ser capaz de descrever energia livre de solvatação e estrutura de pequenos modelos contendo metais de transição como íons Mn(II) com geometria octaédrica em solução (Aqvist e Warshel, 1990), íons Zn(II) tetraédrico em anidrase carbônica humana e carboxipeptidase A (Aqvist e Warshel, 1992; Kilshtain e Warshel, 2009), sistemas binucleares de Zn(II) em metalo- $\beta$ -lactamases de bactérias (IMP-

1 e IMP-6)(Oelschlaeger, Schmid e Pleiss, 2003) e íons Mg(II) octaédrico no sítio ativo binuclear da DNA polimerase (Oelschlaeger *et al.*, 2007). A maior limitação dessa aproximação é a ausência de ligações covalentes ou vínculos na esfera de coordenação do metal para manter a geometria.

Como alternativas, duas aproximações são usadas para modelar campos de força para íons metálicos: método não-ligado (*nonbonded method*), no qual os termos não ligados de van der Waals e eletrostáticos são usados para modelar as interações metal-ligante, e o método ligado (*bonded method*), onde as interações entre o metal e o ligante/proteína são descritos por termos ligados fixando a ligação covalente (Stote e Karplus, 1995; Donini e Kollman, 2000; Hou, Zhang e Xu, 2001; Hou, Guo e Xu, 2002; Hu e Shelver, 2003; Hu, Balaz e Shelver, 2004; Zhang *et al.*, 2004). No caso de proteínas contendo íons zinco ambos os modelos já foram usados. Domini e Kollman (Donini e Kollman, 2000) realizaram cálculos com MM-PBSA para alguns ligantes complexados com diferentes MMPs usando o modelo não-ligado para os átomos de zinco. Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 2004) reportaram um estudo com simulação de DM e perturbação da energia livre para o complexo MMP-2:hidroxamato usando um modelo ligado para o zinco.

No desenvolvimento da presente tese, o objetivo era simular complexos das MMPs com inibidores CMT-n. As MMPs são dependentes de zinco e cálcio, todas as enzimas dessa família possuem pelo menos três íons Ca(II) com função estrutural e dois íons Zn(II), um deles com função estrutural (Figura 3.15a) e o segundo está no sítio catalítico da enzima e é chamado de zinco catalítico (Figura 3.15b). Para realizar o estudo era preciso adotar um modelo para tratar esses metais. Todos os íons Ca(II) foram tratados com o modelo não-ligado proposto por Aqvist (Aqvist, 1990), que vem sendo usado com sucesso em simulações envolvendo MMPs. Para o íon Zn(II) estrutural (Zn2) foi adotado um modelo ligado, onde foi tratado explicitamente as ligações do íon Zn2 com os átomos dos aminoácidos His190-N $\epsilon$ , His175-N $\epsilon$ , His203-N $\delta$  e Asp177-O $\delta$ . Para o zinco catalítico (Zn1) foi empregado um modelo híbrido ligado/não-ligado, uma aproximação na qual as ligações do íon Zn1 com os átomos dos aminoácidos His226-N $\epsilon$ , His230-N $\epsilon$  e His236-N $\epsilon$  foram tratadas explicitamente, porém as ligações do metal com o inibidor foram representadas por um modelo não-ligado. É possível considerar essa uma aproximação bastante razoável, pois representa as ligações covalentes metal/enzima e ao mesmo tempo garante a flexibilidade do inibidor diante do sítio de ligação com a enzima. O campo de forças escolhido foi o AMBER (ver seção 2.3 para mais detalhes) e foram parametrizados explicitamente ligações, ângulos e cargas associadas com os íons Zn1 e Zn2 e a interação desses com a MMP.

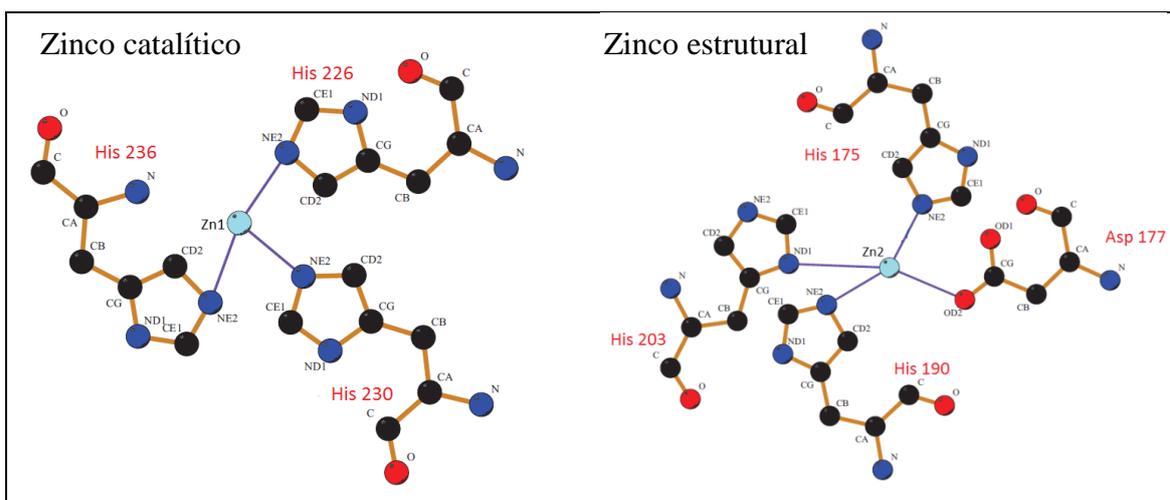
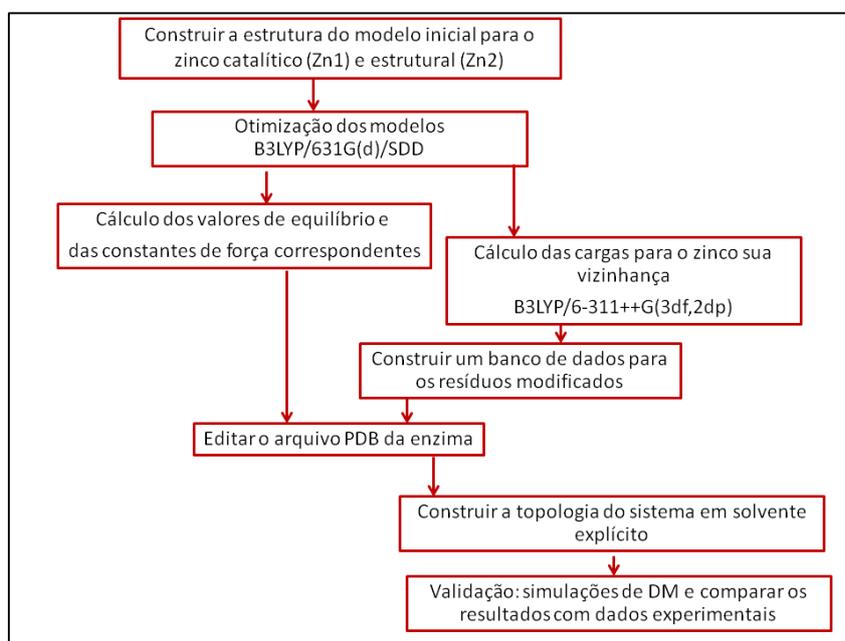


Figura 3.15 Esfera de coordenação dos íons Zn(II) das MMPs.

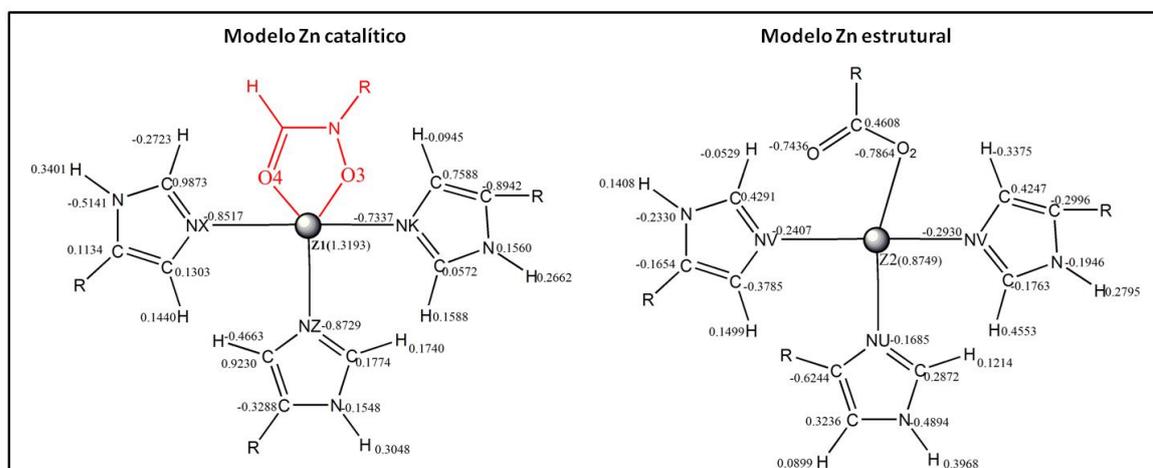
Os parâmetros constantes de força e posições de equilíbrio para os íons Zn1 e Zn2 foram calculados usando métodos quânticos, testados, validados e depositados dentro do campo de força AMBER para posteriormente serem usados nas simulações de DM para os sistemas MMP-inibidores. As etapas da parametrização estão resumidas no Esquema 3.2 e serão discutidas nesta seção.



Esquema 3.2 Etapas realizadas na parametrização dos íons Zn das MMPs.

3.3.1 Tratamento teórico

Foram construídos dois modelos moleculares, um para o zinco catalítico (Z1) e um para o zinco estrutural (Z2), a partir da estrutura cristalográfica da MMP-9 complexada com o hidroxamato-reverso (código PDB 1GKC) como ilustrado na Figura 3.16. A modelagem convencional das cadeias laterais dos aminoácidos foi utilizada, isto é, o aspartato e a histidina foram modelados por acetato e metilimidazol. O inibidor foi modelado pelo grupo funcional do hidroxamato. As curvas de energia potencial foram construídas a partir da varredura de variáveis ao redor dos valores de equilíbrio (ou *scans*) para estiramento das ligações e deformação angular, a geometria foi completamente otimizada usando o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de funções de base 6-31G(d) para os átomos dos ligantes. Para o zinco foi empregado o pseudopotencial de Stuttgart/Dresden (Andrae *et al.*, 1990) e o correspondente conjunto de bases SDD para os elétrons de valência (conjunto de bases 8s6p3d para a valência do Zn). Para o zinco catalítico (Z1) um *scan* semirrígido foi aplicado, mantendo o grupo funcional do hidroxamato fixo, isso foi feito porque o interesse era calcular parâmetros para interação zinco/enzima.



**Figura 3.16** Modelos moleculares para o zinco catalítico e estrutural da MMP e as cargas atômicas (u.a.). Para o cálculo dos parâmetros relativos às ligações e aos ângulos R=CH3 e para o cálculo das cargas R completa o aminoácido histidina e ácido glutâmico.

A constante de força da vibração da ligação ( $k_r$ ) e a constante de força associada à deformação angular ( $k_\theta$ ) foram obtidas pelo ajuste de uma função polinomial de segunda ordem para os dados de referência. Os parâmetros angulares foram calculados para o caso

em que o zinco era o átomo central, para os ângulos em que o Zn era o átomo terminal os dados foram obtidos da literatura (Tuccinardi *et al.*, 2006). Todos os parâmetros associados aos diedros que envolvem as interações Zn-ligante foram definidos como zero (Zimmer, 1995; Sousa, Sergio Filipe, Fernandes, Pedro Alexandrino e Ramos, Maria Joao, 2007). Esta aproximação tem sido utilizada com sucesso no estudo de várias metaloenzimas com o metal ligado covalentemente (Zimmer, 1995; Diaz e Suarez, 2007; Sousa, Sergio Filipe, Fernandes, Pedro Alexandrino e Ramos, Maria Joao, 2007). A razão é que simplifica o tratamento computacional do sistema, conferindo certo grau de flexibilidade para o sítio ativo, sem comprometer a descrição exata da primeira esfera de coordenação do metal. Todos os cálculos quânticos foram realizados usando o programa Gaussian09.

Para o cálculo das cargas primeiramente foi construída uma representação eletrostática adequada para o sítio catalítico e estrutural das MMPs. As cargas RESP (*Restrained ElectroStatic Potential*) (Bayly *et al.*, 1993; Cieplak *et al.*, 1995) foram derivadas do cálculo quântico no nível B3LYP/6-311++G(3df,2pd) para os íons de zinco e sua vizinhança química (Figura 3.16). Os modelos foram construídos a partir da mesma estrutura usada no cálculo da constante de forças, mas foi incluído o resíduo de aminoácido completo na esfera de coordenação do metal. Esses modelos também foram otimizados no nível B3LYP/SDD/6-31G(d). As cargas RESP para o ligante hidroxamato foram derivadas do cálculo no nível HF/6-31G(d). Depois de obtidos os parâmetros para o campo de força (constantes de força, posições de equilíbrio e as cargas) foram construídos os novos arquivos de biblioteca do AMBER descrevendo as duas esferas de coordenação dos íons zinco.

Para testar os parâmetros obtidos e verificar se eles poderiam ser usados para nossas simulações de DM, submetemos a estrutura cristalográfica da MMP-9 complexada com o hidroxamato-reverso a 12 ns de simulação de DM. O pacote de dinâmica molecular AMBER 10 foi usado em todo o processo. Para a enzima foi usado o campo de forças AMBER (Wang *et al.*, 2004; 2005) modificado com o conjunto de parâmetros calculados e para o inibidor hidroxamato foi usado o campo de força GAFF (Weiner *et al.*, 1984), o qual foi parametrizado para moléculas orgânicas. O sistema foi solvatado usando um modelo de água TIP3P em uma caixa periódica retangular com uma distância mínima de 12 Å entre a enzima e os lados da caixa. Todos os átomos de hidrogênio foram adicionados e íons de sódio foram colocados utilizando o programa Leap para neutralizar as cargas negativas do sistema.

Todo o sistema foi submetido a um protocolo de refinamento de quatro estágios antes de realizar a simulação de DM, utilizando o módulo SANDER do AMBER 10. Na primeira etapa, restrições ( $50 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) foram usadas para fixar todos os átomos do sistema exceto

as posições das moléculas de água. Em seguida, na segunda etapa, as restrições foram aplicadas apenas para os átomos pesados, e na terceira etapa foi limitado aos carbonos alfa (CA) dos aminoácidos. Na última etapa todo o sistema foi minimizado, sem forças de restrição.

Trajetórias de DM foram executadas, tomando como partida a estrutura minimizada do complexo MMP-9:hidroxamato-reverso, utilizando o módulo PMEMD incluído no pacote AMBER 10 e considerando as condições periódicas de contorno para simular um sistema contínuo. O algoritmo SHAKE(Ryckaert, Ciccotti e Berendsen, 1977) foi empregado para manter todas as ligações envolvendo átomos de hidrogênio rígidas e o passo de integração da simulação foi de 2,0 fs. O método de Particle-mesh Ewald (PME) foi usado para contabilizar as interações eletrostáticas, e o *cutoff* de 10 Å foi considerado para as interações não-ligadas. O complexo foi equilibrado por 50 ps seguido de 12 ns de simulação de DM a pressão constante (1 atm) e temperatura de 300 K. Este tempo de simulação é suficientemente grande para amostrar adequadamente as variáveis estruturais que foram parametrizadas, como comprimentos de ligação e ângulos, que apresentam uma dinâmica rápida.

Para verificar a validade dos parâmetros desenvolvidos (Sousa, Sergio Filipe, Fernandes, Pedro Alexandrino e Ramos, Maria Joao, 2007; Steinbrecher e Labahn, 2010), a trajetória da DM foi analisada com o módulo PTRAJ do AMBER 10, com maior ênfase dada para a esfera de coordenação do zinco. Esses resultados foram comparados com um conjunto de estruturas de Raios X de diferentes MMPs, bem como com pequenos modelos de sítio ativo das MMPs calculados com o método de química quântica.

### 3.3.2 Determinação dos parâmetros do potencial

Os novos parâmetros são destinados a ser uma extensão do campo de forças AMBER. Dessa forma os tipos de átomos foram definidos de acordo com o campo de forças. Para levar em consideração a especificidade das duas esferas de coordenação do zinco, em termos dos comprimentos de ligação, ângulos e cargas, um total de oito novos tipos de átomos foi introduzido para o Zn e os átomos que estão diretamente coordenados a ele. A nomenclatura está ilustrada na Figura 3.16 para a esfera do zinco catalítico e estrutural. Algumas modificações foram feitas no banco de dados do AMBER e no arquivo PDB da enzima. Para o zinco estrutural (Z2) foram definidos os novos resíduos HI1, HI2, HI3 e AS1 representando HIS190, HIS203, HIS175 e ASP177, respectivamente. Para o zinco catalítico (Z1) foram

definidos os novos resíduos HIA, HIB e HIC representando HIS401, HIS405 e HIS411, respectivamente (os números dos resíduos estão de acordo com a estrutura 1GKC).

Os parâmetros discutidos aqui foram calculados considerando a seguinte expressão do campo força AMBER para termos de ligação e angular ( $E_{lig}$  e  $E_{ang}$ ):

$$E_{total} = \sum_{sistema} E_{lig} + E_{ang} + E_{tors} + E_{vdW} + E_{ele} \quad (3.7)$$

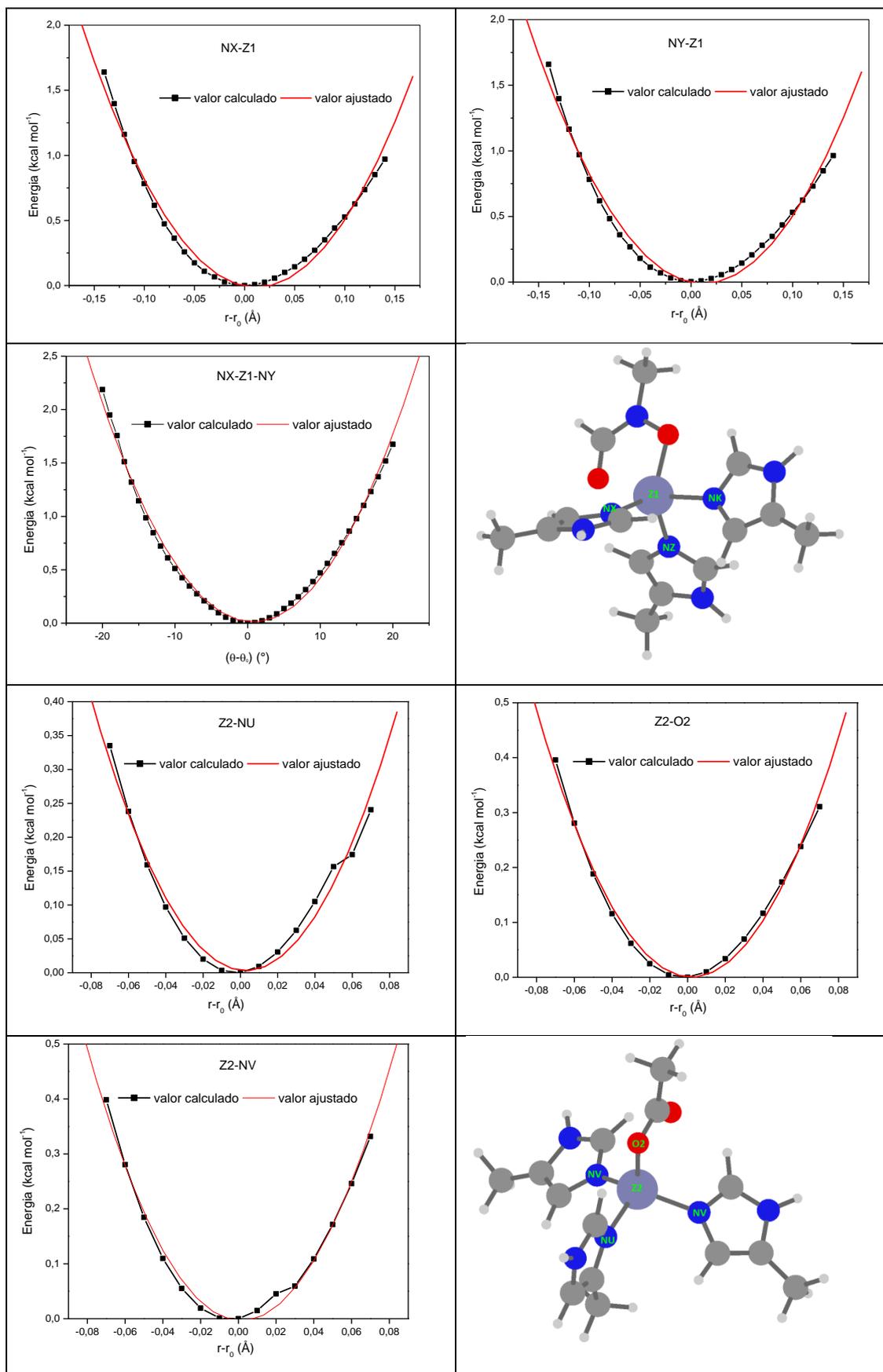
$$E_{lig} = \sum_{ligação} K_r(r - r_0)^2 \quad (3.8)$$

$$E_{ang} = \sum_{ângulo} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \quad (3.9)$$

### 3.3.2.1 Parâmetros para ligações e ângulos

Os comprimentos de ligação e ângulos que envolvem o átomo de Zn são influenciados pela natureza dos ligantes que estão na sua esfera de coordenação. Então todas as ligações contendo zinco e todos os ângulos cujo zinco era o átomo central foram parametrizados para os dois modelos, catalítico e estrutural.

As curvas de energia resultante do ajuste de uma função polinomial de segunda ordem foram usadas para o cálculo das constantes de força ( $k_r$ ) e ( $k_\theta$ ), e estão ilustradas na Figura 3.17. As estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP/SDD/6-31G(d) dos modelos usados nos cálculos também são mostradas na Figura 3.17. Os valores de equilíbrio dos comprimentos das ligações e dos ângulos foram determinados a partir desses modelos.



**Figura 3.17** Curvas usadas na parametrização das ligações e ângulos para o zinco catalítico (Z1) e estrutural (Z2) (valores de energia calculados no nível B3LYP/SDD).

Os parâmetros de ligação e ângulo determinados para as duas esferas de coordenação do zinco são apresentados na Tabela 3.5. Um total de seis ligações e sete ângulos foi parametrizado. As cargas atômicas RESP calculadas para os átomos chaves na esfera dos íons zinco estão ilustradas na Figura 3.16.

**Tabela 3.5** Parâmetros de ligação e ângulos para enzima MMP-9:hidroxamato-reverso.

Ligações	$R_{eq}$ (Å)	$K_r$ (kcal mol <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup> )
Z1-NX	2,09	66,4
Z1-NY	2,09	66,4
Z1-NZ	2,20	37,0
Ângulos	$\theta$ (°)	$K_\theta$ (kcal mol <sup>-1</sup> rad <sup>-2</sup> )
NX-Z1-NY	113,1	15,6
NX-Z1-NZ	96,33	33,0
NY-Z1-NZ	96,33	33,0
Ligações	$R_{eq}$ (Å)	$K_r$ (kcal mol <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup> )
Z2-O2	1,98	72,2
Z2-NV	2,05	78,9
Z2-NU	2,09	59,3
Ângulos	$\theta$ (°)	$K_\theta$ (kcal mol <sup>-1</sup> rad <sup>-2</sup> )
NV-Z2-NU	107,7	15,2
NV-Z2-NV	116,3	13,5
O2-Z2-NU	96,9	32,4
O2-Z2-NV	113,1	17,9

### 3.3.2.2 Parâmetros de van der Waals (vdW) e eletrostático

De acordo com diferentes estudos envolvendo metaloenzimas, os parâmetros de vdW podem ser considerados como transferíveis entre ambientes bastante semelhantes. Dessa forma, para os átomos diretamente coordenados ao zinco os parâmetros de van der Waals foram atribuídos a partir dos tipos de átomos AMBER mais próximos dos existentes no campo de forças AMBER padrão (Weiner *et al.*, 1984; Cornell *et al.*, 1995).

As cargas foram obtidas com o método RESP, para o qual as cargas são derivadas do potencial eletrostático. Foi realizado o cálculo para o zinco e a sua esfera de coordenação no

nível B3LYP/6-311++(3df,2dp) para obtenção do potencial eletrostático (*ElectroStatic Potential - ESP*). A partir do ESP gera-se a distribuição das cargas nas moléculas e o método RESP geram as cargas a partir dessa distribuição, portanto é dependente do método de cálculo usado (Guadagnini, Bruns e Desouza, 1996). Esse cálculo foi feito aplicando o funcional B3LYP por ser o mais indicado para os sistemas contendo íons metálicos (Suarez, Brothers e Merz, 2002; Yao *et al.*, 2005).

Neste processo, os modelos utilizados incluíram os carbonos alfa (CA), além dos átomos já considerados nos modelos usados para gerar as constantes de força e ilustrados na Figura 3.16. Foram construídos a partir da estrutura cristalográfica da MMP-9: hidroxamato-reverso (1GKC) e otimizados no nível B3LYP/SDD/6-31G(d). As cargas parciais para os átomos ligados aos CA foram obtidas a partir dos aminoácidos correspondentes no campo de força FF99 (Cornell *et al.*, 1995), e fixadas durante o procedimento de ajuste RESP, admitindo que não ocorra nenhuma alteração significativa nas cargas desses átomos devido à interação metal-ligante. As cargas geradas estão ilustradas para ambos os modelos do zinco estrutural e catalítico na Figura 3.16.

### 3.3.3 Validação dos parâmetros

Os dois conjuntos de parâmetros desenvolvidos para a esfera de coordenação dos átomos de Zn catalítico e estrutural foram aplicados na simulação do complexo da MMP-9: hidroxamato-reverso. Os parâmetros estruturais foram usados para validar o novo conjunto de parâmetros desenvolvidos e os resultados foram comparados com a estrutura cristalográfica. É importante mencionar que um protocolo de validação mais geral deveria envolver energias como propriedades de referência, como abordado recentemente por Warshel e colaboradores (Oelschlaeger *et al.*, 2007), no entanto, as energias de solvatação para os modelos experimentais representativos de enzimas não são facilmente disponíveis, com isso a utilização de dados estruturais na validação dos novos parâmetros tem sido feita em diversos trabalhos (Zhang *et al.*, 2004; Sousa, S. F., Fernandes, P. A. e Ramos, M. J., 2007; Lin e Wang, 2010).

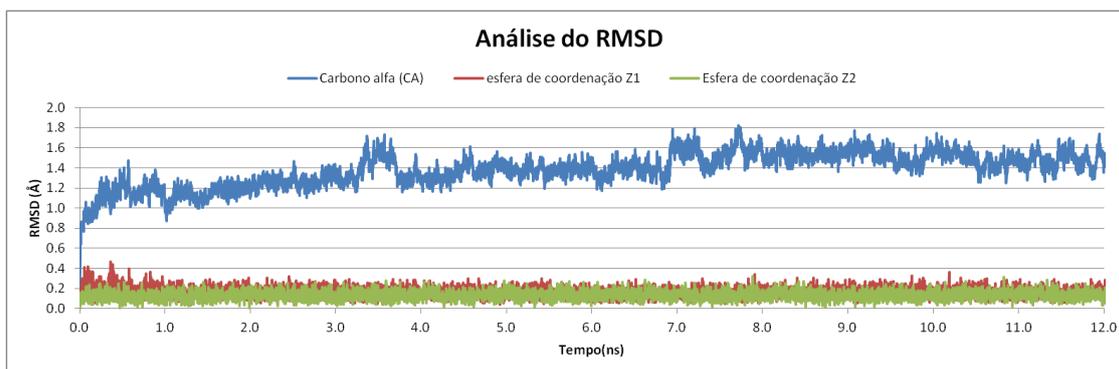
A Tabela 3.6 apresenta os valores médios obtidos da simulação de MD para as ligações e ângulos parametrizados, calculados considerando os valores instantâneos obtidos a cada 0,2 ps (após 1 ns inicial). A Figura 3.18 ilustra a variação do desvio quadrático médio (RMSD) com o tempo para os carbonos alfa e a esfera de coordenação dos íons Zn catalítico

e estrutural. A Figura 3.19 representa a variação no tempo das ligações e ângulos parametrizados para o Zn estrutural e o Zn catalítico (após 1 ns inicial).

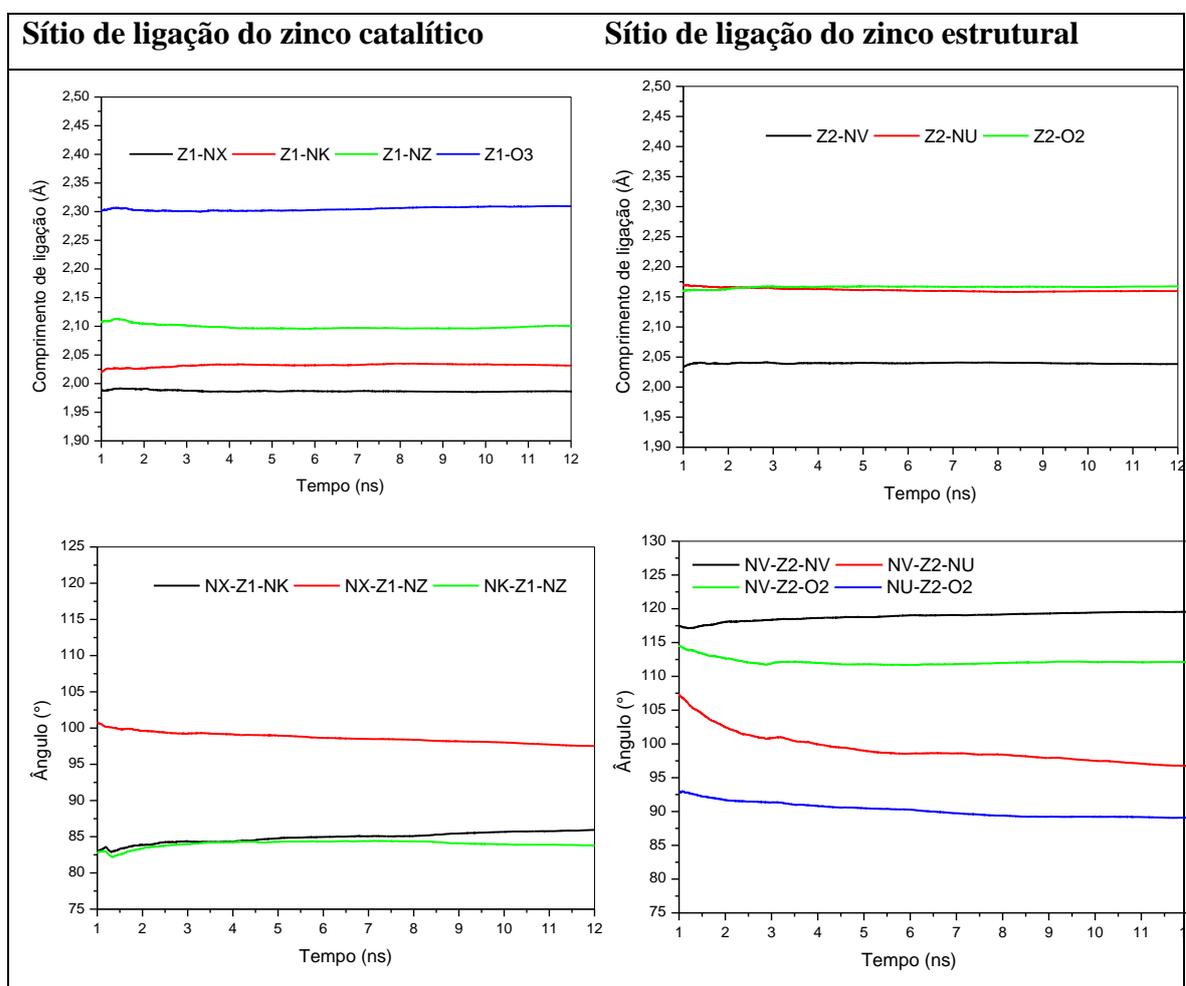
**Tabela 3.6** Os valores médios e desvios-padrão obtidos da simulação de MD para as ligações e ângulos parametrizados.

Comprimento de ligações médio $\pm$ desvio (Å)	
Zinco catalítico (Z1)	
Z1-NX	1,99 $\pm$ 0,07
Z1-NK	2,03 $\pm$ 0,06
Z1-NZ	2,10 $\pm$ 0,09
Zinco estrutural (Z2)	
Z2-NV	2,04 $\pm$ 0,06
Z2-NU	2,16 $\pm$ 0,07
Z2-O2	2,17 $\pm$ 0,06

A análise do RMSD para os átomos de carbono alfa (CA) do esqueleto peptídico e para os átomos da esfera de coordenação dos íons zinco indica que as geometrias das duas esferas de coordenação de Zn foram mantidas durante todo o tempo de simulação (Figura 3.18). O mesmo comportamento foi observado para os comprimentos de ligação e os ângulos parametrizados para as esferas de coordenação do zinco estrutural e catalítico na MMP-9 (Figura 3.19). A aproximação da mistura dos modelos ligado e não-ligado utilizadas para o íon zinco catalítico (Z1) foi satisfatória para representar a esfera de coordenação de Zn. A Figura 3.20 mostra a estrutura da MMP-9:hidroxamato-reverso (1GKC) após 12 ns de simulação utilizando parâmetros otimizados.



**Figura 3.18** Variação do desvio quadrático médio (RMSD) para os carbonos alfa e a esfera de coordenação dos íons Zn catalítico e estrutural (definida de acordo com a Figura 3.16) ao longo da simulação de MD para o complexo MMP-9:hidroxamato-reverso.

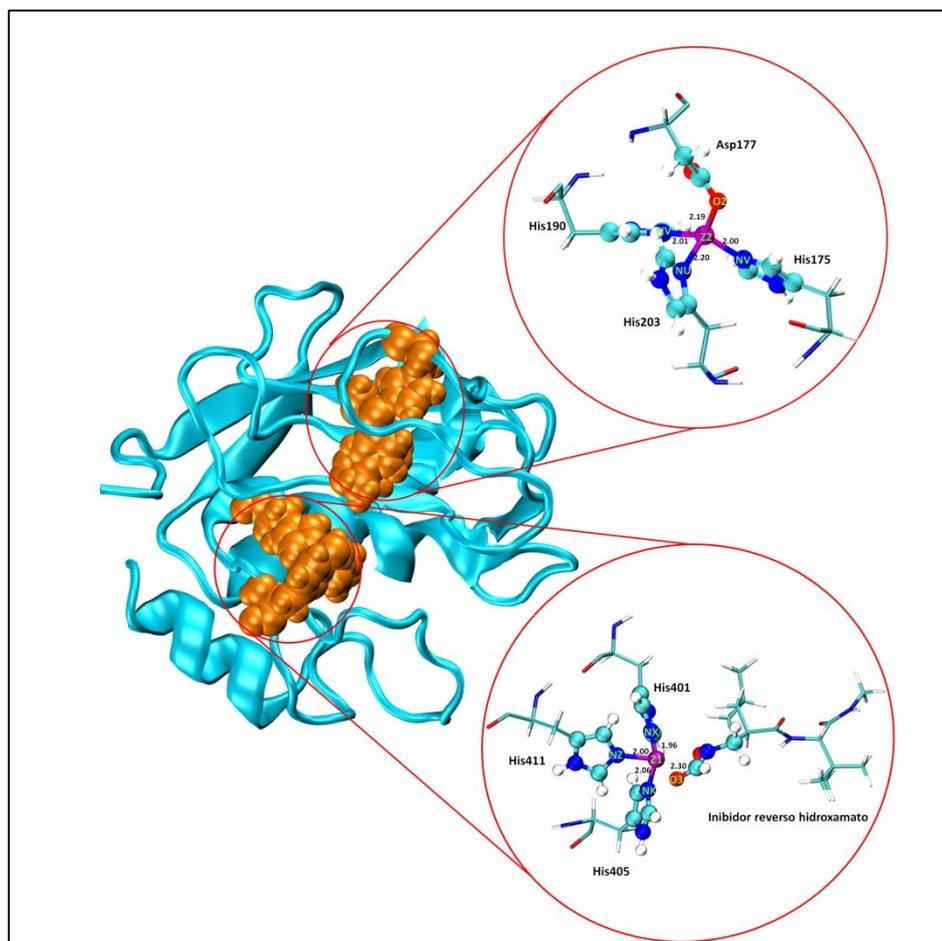


**Figura 3.19** Os valores médios acumulados da simulação de MD para as ligações e ângulos parametrizados para as esferas de coordenação dos Zn catalítico (Z1) e estrutural (Z2) na MMP-9 calculado após 1ns de simulação.

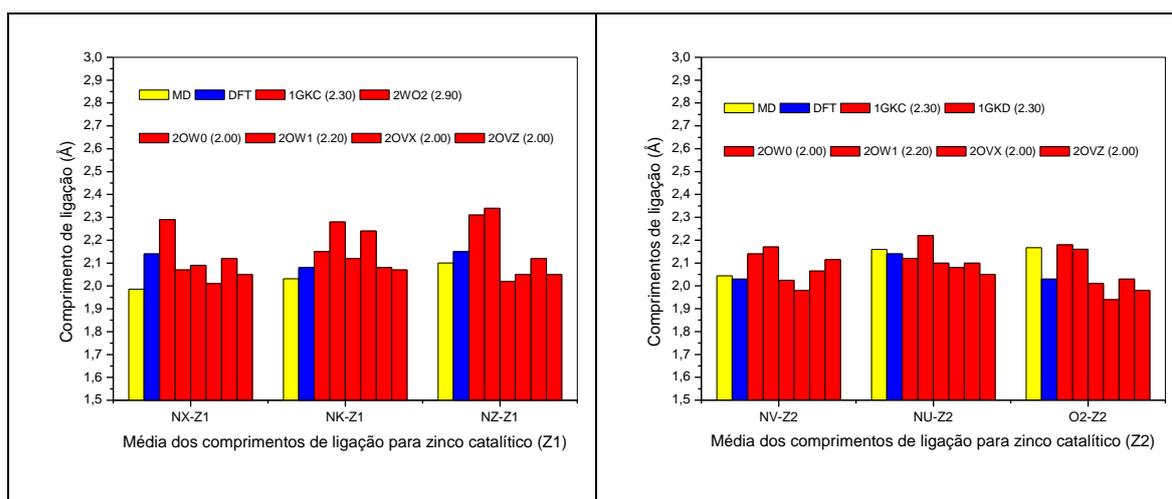
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores para os comprimentos de ligação da esfera de coordenação dos íons zinco foram comparados diretamente com dados experimentais de estruturas cristalográficas de Raios X de seis MMPs diferentes (os códigos PDB e resolução estão mostrados na Figura 3.21), bem como valores obtidos de cálculos quânticos com modelos pequenos (B3LYP/6-31G(d)). Os resultados são ilustrados na Figura 3.21 para os dois sítios de zinco. Da Figura 3.21 fica claro um bom acordo entre os resultados obtidos da DM com os parâmetros recém desenvolvidos e os resultados experimentais e quânticos. O acordo com os dados experimentais é notável, especialmente porque os valores dos comprimentos de ligação e os ângulos foram parametrizados a partir de cálculos quânticos usando pequenos modelos do sítio metálico.

Os parâmetros para representar as esferas de coordenação dos íons zinco presentes nas MMPs foram derivados de cálculos quânticos e foram aplicados com sucesso na simulação de DM do complexo MMP-9: hidroxamato-reverso. As análises dos parâmetros estruturais mostraram que os novos parâmetros calculados e o procedimento de DM são confiáveis e podem ser utilizados para estudos envolvendo MMP interagindo com inibidores. Nesse contexto esses parâmetros serão empregados no estudo da interação da MMP-2 com as tetraciclinas quimicamente modificadas, que será discutido na próxima seção.



**Figura 3.20** Estrutura de 1GKC após 12ns de simulação de dinâmica molecular utilizando o conjunto de parâmetros desenvolvidos no presente trabalho.



**Figura 3.21** Validação de parâmetros por comparação dos resultados obtidos por simulação de MD (usando o novo conjunto de parâmetros desenvolvido) com resultados de cálculos quânticos (B3LYP/6-31G(d)) e de seis estruturas cristalográficas de Raios X (código PDB com resolução indicadas entre parênteses).

### 3.4 ESTRUTURA E DINÂMICA DE INTERAÇÃO DAS TETRACICLINAS QUIMICAMENTE MODIFICADA COM A METALOPROTEINASE MMP-2

As tetraciclina vêm sendo estudadas como possíveis candidatos a inibidores das MMPs há algumas décadas. O sucesso dos derivados quimicamente modificados, as CMTs, como inibidores de colagenases foi descrito pela primeira vez em 1986 por Golub e colaboradores (Golub, Mcnamara e Ramamurthy, 1986). No entanto, até os dias de hoje não se tem descrito na literatura o exato mecanismo pelo qual essas moléculas inibem as MMPs. Em 2011 o *Pharmacological Research* publicou um número especial com uma revisão das propriedades não antibióticas da tetraciclina e derivados, sobretudo sua atividade como inibidores de MMPs (Greenwald, 2011; Griffin, Ceballos e Villarreal, 2011; Richards, Pantanowitz e Dezube, 2011).

Dentro dos possíveis mecanismos de ação para as CMTs como IMMP, a coordenação com o íon zinco pode desempenhar um papel fundamental na inibição. Os dados obtidos *in vitro* aplicando espectrofotometria sugeriram que a coordenação das CMTs com o Zn é positivamente correlacionada com a potência destes compostos (Greenwald e Golub, 2001). Portanto, o potencial inibitório das CMTs pode ser afetado por diferenças estruturais entre as moléculas.

Na seção 3.1 desta tese foi apresentado um estudo utilizando modelos moleculares simples para o zinco catalítico das MMPs, demonstrando que as estruturas das CMTs interferem significativamente no modo de coordenação com íon Zn(II). Na seção 3.2, a técnica de docking molecular foi aplicada para a obtenção dos complexos moleculares entre a MMP-2 e as CMT-n (n=1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8). Nesta seção uma avaliação mais sistemática da relação entre as propriedades moleculares das CMTs e suas interações com o sítio catalítico da MMP-2 será realizada usando simulação de dinâmica molecular, seguida da análise das propriedades dinâmicas relevantes dos complexos MMP-2:CMT-n associadas com a flexibilidade da enzima e os seus complexos. A análise qualitativa proporciona uma relação entre as alterações específicas do sítio catalítico e as mudanças dinâmicas envolvendo os resíduos de aminoácidos que compõem a enzima e a interação com as CMT-n.

De forma geral, os dados aqui descritos incluem os aspectos estruturais e dinâmicos do domínio catalítico da MMP-2 complexado com CMT-n, os quais podem ser muito relevante para o desenho baseado na estrutura de novos inibidores de MMP a partir de derivados das CMTs com melhor resposta biológica.

### 3.4.1 Tratamento teórico

Para obter uma análise mais refinada das interações moleculares entre as CMTs e o sítio ativo da MMP-2, simulações de DM foram realizadas para os sete complexos MMP-2:CMT-n obtidos como as melhores soluções do estudo de docking molecular descritos na seção 3.2.

Para o estudo dos complexos MMP-2:CMT-n foi aplicado o mesmo protocolo de DM previamente testado e validado para o complexo MMP-9: hidroxamato-reverso. Utilizou-se o campo de forças AMBER FF99 modificado com o conjunto de parâmetros desenvolvido no presente trabalho (Marcial *et al.*, 2012) especificamente para descrever a esfera de coordenação do zinco catalítico (Zn1) e do zinco estrutural (Zn2) baseados em cálculos DFT (B3LYP) (ver seção 3.3 para detalhes da parametrização). Os ligantes CMT-n foram tratados com o campo de forças GAFF e as cargas RESP foram calculados no nível B3LYP/6-31G(d).

Foram considerados os estados de protonação convencionais para todos os aminoácidos em pH 7. Todos os átomos de hidrogênio foram adicionados e íons de sódio foram colocados utilizando o programa Leap para neutralizar as cargas negativas do sistema. Cada complexo foi solvatado usando um modelo de água TIP3P em uma caixa periódica com uma distância mínima de 12 Å entre a enzima e os lados da caixa, resultando em sete diferentes sistemas compreendendo cerca de 26.546 átomos de cada complexo. O pacote de dinâmica molecular AMBER foi usado em todas as simulações de DM.

Antes de realizar as simulações de DM, foram realizados os passos de minimização utilizando o módulo SANDER do AMBER 10. Na primeira etapa, forças harmônicas (50 kcal mol<sup>-1</sup>) foram usadas para fixar todos os átomos do sistema exceto as posições das moléculas de água. Em seguida, na segunda etapa, as restrições foram aplicadas apenas para os átomos pesados, e na terceira etapa foi limitado aos carbonos alfa (CA) dos aminoácidos. Na última etapa, todo o sistema foi minimizado, sem força de restrição.

Simulações de DM foram executadas para os sete complexos MMP-2:CMT-n e para a MMP-2 livre. As estruturas minimizadas do complexos e da enzima livres foram tomadas como ponto de partida para as simulações utilizando o módulo PMEMD incluído no pacote AMBER 10 e considerando as condições periódicas de contorno para simular um sistema contínuo. O algoritmo SHAKE (Ryckaert, Ciccotti e Berendsen, 1977) foi empregado para manter todas as ligações envolvendo átomos de hidrogênio rígidas e o passo de integração da simulação foi de 2,0 fs. O método de Particle-mesh Ewald (PME) foi usado para

contabilizar as interações eletrostáticas, e o *cutoff* de 10 Å foi considerado para as interações não ligadas. Cada complexo e a enzima livre foram equilibrados por 50 ps seguidos de 12 ns de simulação de DM a pressão constante (1 atm) (um total de 96 ns de simulação de DM) e temperatura de 300K. Todas as trajetórias da DM foram analisadas com o módulo PTRAJ do AMBER 10.

A base de dados do servidor *ConSurf* (Glaser et al., 2005) foi usada para obter o grau de conservação para cada posição dos aminoácidos (*conservation score*) ao longo da sequência da MMP-2. As sequências de aminoácidos foram alinhadas de acordo com os algoritmos implementados na base de dados ConSurf-HSSP, como pode ser acessado através do link <http://consurfdb.tau.ac.il/>.

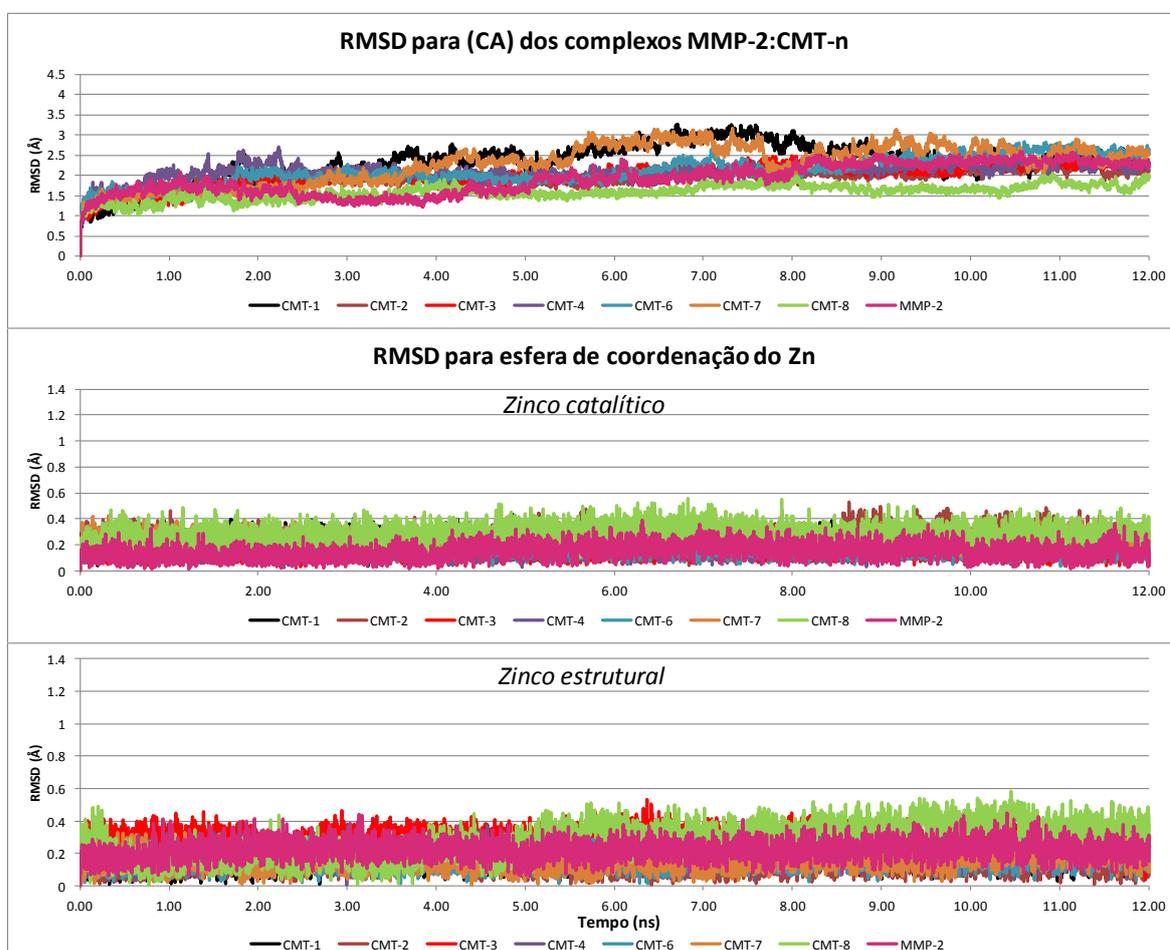
### 3.4.2 Análise dos desvios quadráticos médios

As sete estruturas dos complexos MMP-2:CMT-n previstas como mais estáveis no estudo de docking foram submetidas à simulação de DM usando um modelo ligado para o íon Zn(II) e os átomos da enzima e o modelo não-ligado para as interações dos ligantes CMT-n com zinco catalítico. Esta aproximação foi usada para dar mais flexibilidade para os ligantes, permitindo que esses inibidores pudessem coordenar ou se rearranjar no sítio ativo. O protocolo de DM utilizado foi previamente testado para o complexo da MMP-9: hidroxamato-reverso, para o qual a estrutura minimizada apresentava excelente acordo com a estrutura experimental (ver seção 3.3 para detalhes).

A Figura 3.22 ilustra os valores do desvio quadrático médio (RMSD) para os átomos de carbono alfa (CA) do esqueleto do peptídeo e para os átomos da esfera de coordenação dos íons de zinco catalítico e estrutural. O RMSD é calculado de acordo com Equação (3.4), e como descrito na seção 3.2 permite comparar duas conformações de um dado conjunto de átomos, podendo ser usado para avaliar se as estruturas geradas por uma dinâmica estão em equilíbrio ou não, usando para esse efeito a estrutura inicial do sistema como referência.

Os valores foram computados a cada 0,2 ps ao longo dos 12 ns de simulação para cada um dos complexos MMP-2:CMT-n. A análise do RMSD mostra que os sistemas dos sete complexos estão bem equilibrados e que os átomos de CA apresentam um RMSD em torno de 2,0 Å como mostrado na Figura 3.22. O RMSD para as esferas de coordenação dos íons Zn mostra valores notavelmente constantes, o que sugere que as geometrias das esferas de coordenação do Zn estrutural e catalítico são mantidas ao longo da simulação para todos os complexos MMP-2:CMT-n. Para garantir a convergência total, apenas os 6 ns finais das

simulações para os complexos foram levados em consideração para os cálculos discutidos nas seções subsequentes.



**Figura 3.22** Representação gráfica do desvio quadrático médio (RMSD) nas simulações de DM realizadas para os sete complexos MMP-2: CMT-n e para a MMP-2 livre.

### 3.4.3 Estrutura dos complexos MMP-2:CMT-n

A estrutura final obtida para os sete complexos apresenta os ligantes CMT-n dentro do sítio ativo da MMP-2, na região do zinco catalítico. As Tabelas 3.7 e 3.8 mostram alguns parâmetros estruturais para os sete complexos MMP-2:CMT-n. Na estrutura cristalográfica da MMP-2 (código PDB 1QIB)(RowSELL *et al.*, 2002) o Zn catalítico está coordenado aos átomos de nitrogênio dos três resíduos de histidina: HIS202 (N1), HIS206 (N2) e HIS212 (N3) com os comprimentos de ligação Zn-N de 2,31; 2,33 e 2,36 Å, respectivamente. Depois das simulações de DM para os complexos MMP-2:CMT-n o comprimento da ligação Zn-N varia de 1,86-2,26 Å, como mostrado na Tabela 3.7. Estas diferenças entre a distância de

ligação Zn-N são devida à mudança na vizinhança da esfera de coordenação do zinco, e também consequência da interação com os ligantes CMT-n.

As médias das distâncias de ligação de Zn-O11 e Zn-O12 para os CMT-n ligantes foram de  $2,5 \pm 0,3$  e  $2,3 \pm 0,1$  Å, respectivamente. Foram encontrados os maiores valores destes parâmetros para o complexo com a CMT-3, para o qual a distância Zn-O11 foi de cerca de 3,4 Å. Esta interação fraca é devido à posição diferente da CMT-3 no interior do sítio ativo e as interações hidrofóbicas com a região do bolso S1' da MMP-2. Os outros ligantes CMT-n apresentam distâncias Zn-ligante comparáveis aos valores para a MMP-2 complexado com o inibidor hidroxamato (Zn-O = 2,4 Å), indicando a coordenação dos ligantes CMT-1, CMT-2, CMT-4, CMT-6, CMT-7 e CMT-8 com o íon zinco.

**Tabela 3.7** Dados estruturais para os Complexos MMP-2:CMT-n obtidos da simulação de DM.

Ligante	Comprimento de ligação(Å)			Ângulo (°)			
	N1-Zn	N2-Zn	N3-Zn	N3-Zn-N1	N2-Zn-N3	N1-Zn-N2	O12-Zn-N3
CMT-1	2,00	2,23	2,19	92,17	92,17	77,84	87,79
CMT-2	1,96	2,06	2,18	84,04	99,57	86,21	91,00
CMT-3	1,92	1,97	2,06	88,25	101,12	81,77	96,27
CMT-4	2,06	1,99	2,14	84,76	99,53	90,73	87,56
CMT-6	1,92	1,99	2,13	85,98	90,80	93,46	84,05
CMT-7	1,86	1,98	1,89	84,35	95,05	86,99	97,50
CMT-8	2,02	2,02	2,16	82,39	92,44	74,78	85,54
1QIB <sup>a</sup>	2,31	2,33	2,36	103,21	103,6	96,83	-

<sup>a</sup> Os valores para 1QIB foram obtido da estrutura cristalográfica (RowSELL *et al.*, 2002).

Os ligantes CMT-1, -2, -4, -6, -7 e -8 atuam como bidentados, sugerindo um número de coordenação cinco para o íon Zn. Para avaliar a geometria do centro metálico de zinco, foi calculado o grau de trigonalidade ( $\tau$ ) para os sete complexos. Este parâmetro empírico, definido e bastante discutido na seção 3.1, é computado a partir da Equação (3.3), e de forma geral ajuda a definir a geometria de centros metálicos com número de coordenação cinco. para  $\tau=1$  a geometria possui simetria  $D_{3h}$  perfeita (bipirâmide trigonal) e para  $\tau=0$  a

geometria é  $C_{4v}$  (pirâmide de base quadrada)(Addison *et al.*, 1984). A análise do parâmetro  $\tau$ , ilustrado na Tabela 3.8, mostra que o grau de trigonalidade está próximo de 0 para a maioria dos complexos, especialmente para os complexos com os ligantes CMT-1 e CMT-2 ( $\tau = 0,02$  e  $0,07$ , respectivamente) indicando que a geometria do centro metálico é uma pirâmide de base quadrada perfeita. O complexo com a CMT-7 mostra um grau de trigonalidade =  $0,46$  e, neste caso, a geometria em torno do centro metálico é uma mistura de pirâmide de base quadrada e bipirâmide trigonal.

Neste ponto, é interessante discutir a influência do ambiente da enzima na geometria adotada pelo centro metálico. Na seção 3.1 modelos mais simples contendo somente a primeira esfera de coordenação do zinco foram investigados considerando sítios de coordenação distintos para CMT-n. Com base nos valores de  $\tau$  foi sugerido que a geometria do centro metálico dependia do sítio de coordenação do metal com a CMT e não especificamente da CMT considerada. Para os complexos que envolvem coordenação no sítio O11-O12 da CMT, o valor de  $\tau$  foi aproximadamente  $1,0$  e a geometria caracterizada como uma bipirâmide trigonal quase perfeita. No presente estudo, utilizando todo o domínio catalítico da MMP-2, a esfera de coordenação do metal apresenta uma geometria pirâmide de base quadrada ( $\tau \cong 0,1$  Tabela 3.8). Este comportamento sugere que a segunda ou terceira esferas de coordenação ao redor do centro metálico de zinco desempenham papel importante na determinação da geometria do metal.

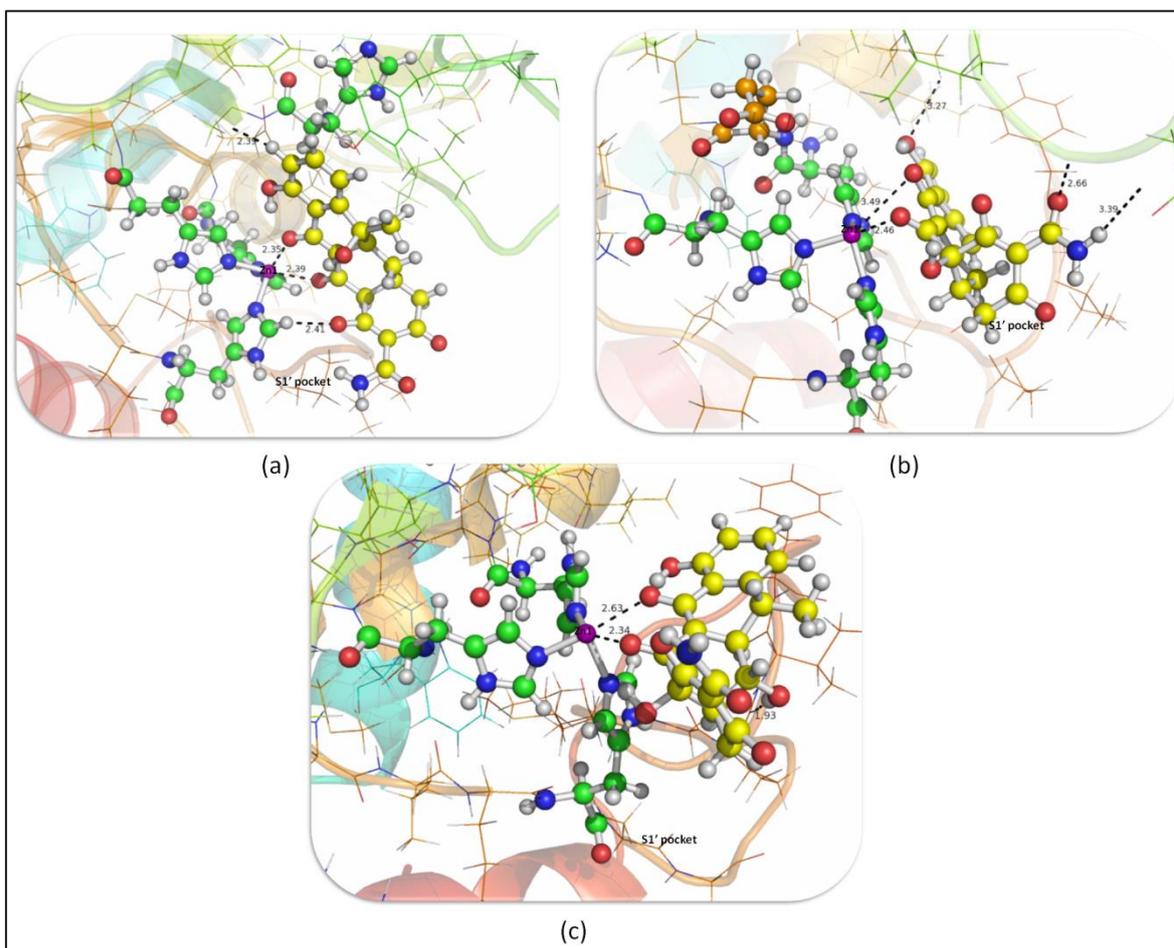
**Tabela 3.8** Parâmetros estruturais para os complexos MMP-2:CMT-n obtidos da simulação de DM.

Ligante	Comprimento de ligação (Å)			Ângulo (°)		
	O11-Zn	O12-Zn	O12-Zn-N2	O11-Zn-N1	N2-Zn-N3	$\tau$
CMT-1	2,42	2,39	165,44	166,76	92,17	0,02
CMT-2	2,53	2,32	175,08	160,62	84,04	0,07
CMT-3	3,40	2,46	155,58	70,73	88,25	-
CMT-4	2,37	2,40	152,22	160,57	84,76	0,14
CMT-6	2,50	2,24	154,30	168,82	85,98	0,24
CMT-7	2,35	2,39	161,10	133,50	84,35	0,46
CMT-8	2,63	2,34	157,14 <sup>b</sup>	149,08 <sup>c</sup>	82,39	0,13
HDX <sup>a</sup>	2,40	2,20	136,99	143,96	92,63	0,11

<sup>a</sup> Distancias para o complexo MMP-9: hidroxamato-reverso (HDX)(RowSELL *et al.*, 2002). <sup>b</sup>

Ângulo para O12-Zn-N1. <sup>c</sup> Ângulo para O12-Zn-N2.

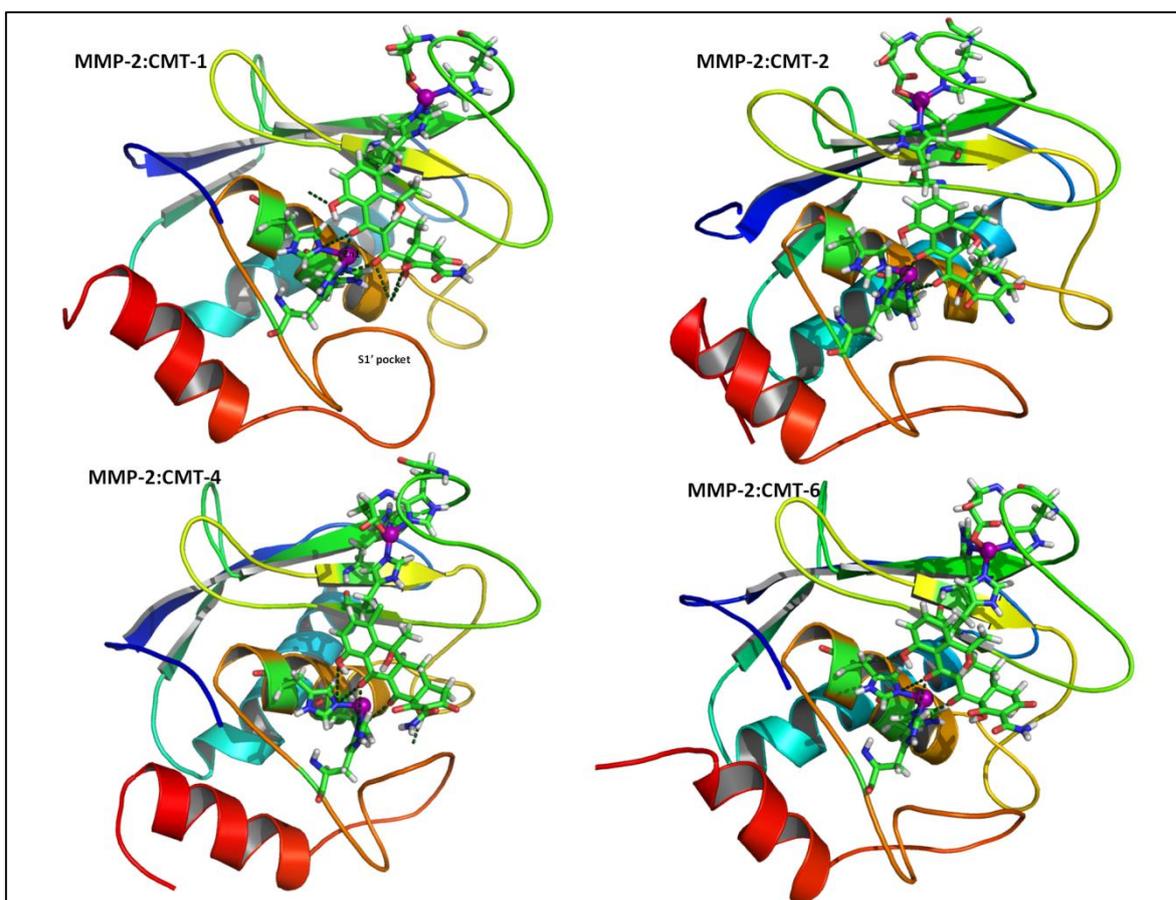
As análises estruturais anteriores para os complexos MMP-2:CMT-n deixam claro o fato de que o ligante CMT-3 tem um comportamento diferente em relação aos outros análogos sobre o modo de interação com o sítio ativo da MMP-2, como evidenciado na Figura 3.23.



**Figura 3.23** Estrutura final da DM para (a) CMT-7 e (b) CMT-3 e (c) CMT-8 complexados com o sítio ativo da MMP-2.

De fato, os resultados de testes experimentais mostram que este análogo é o mais potente como inibidor de MMPs entre as CMTs e as tetraciclinais antibióticas convencionais. A CMT-3 parece inibir a MMP-2 de uma forma competitiva, ligando e bloqueando o sítio ativo diretamente, mas pode também provocar modificações ou alterações na estrutura do sítio ativo da MMP-2 indiretamente de forma não competitiva. A Figura 3.23 destaca o sítio de coordenação dos complexos da CMT-3, CMT-7 e da CMT-8 com o sítio ativo da MMP-2 e a Figura 3.24 ilustra os complexos com a CMT-1, CMT-2, CMT-4 e CMT-6 após a simulação DM. É possível observar que a CMT-3 está incorporada dentro do sítio ativo e

ainda interage com o íon Zn através do átomo de oxigênio O12 ( $Zn-O12 = 2,4 \text{ \AA}$ ). Além disso, os átomos C6 e C7 na região superior da CMT-3 (anel D), que não possuem grupos substituintes, encontram-se perto da região hidrofóbica do sítio ativo da enzima MMP-2 e, assim, o complexo com a CMT-3 deve também ser estabilizado por contatos hidrofóbicos curtos com a sua vizinhança enzimática, principalmente os resíduos MET219-TYR223. O grupo carbonila na posição C1 está envolvido em contato polar com GLY162 ( $3,3 \text{ \AA}$ ), o grupo hidroxila do C10 faz contato hidrofóbico com a VAL198 ( $2,9 \text{ \AA}$ ) e o grupo amida no C2am também mostra um contato hidrofóbico com o ASP165 ( $3,4 \text{ \AA}$ ). Este tipo de interação tem sido observada nas estruturas cristalinas de outros complexos com as enzimas MMPs.

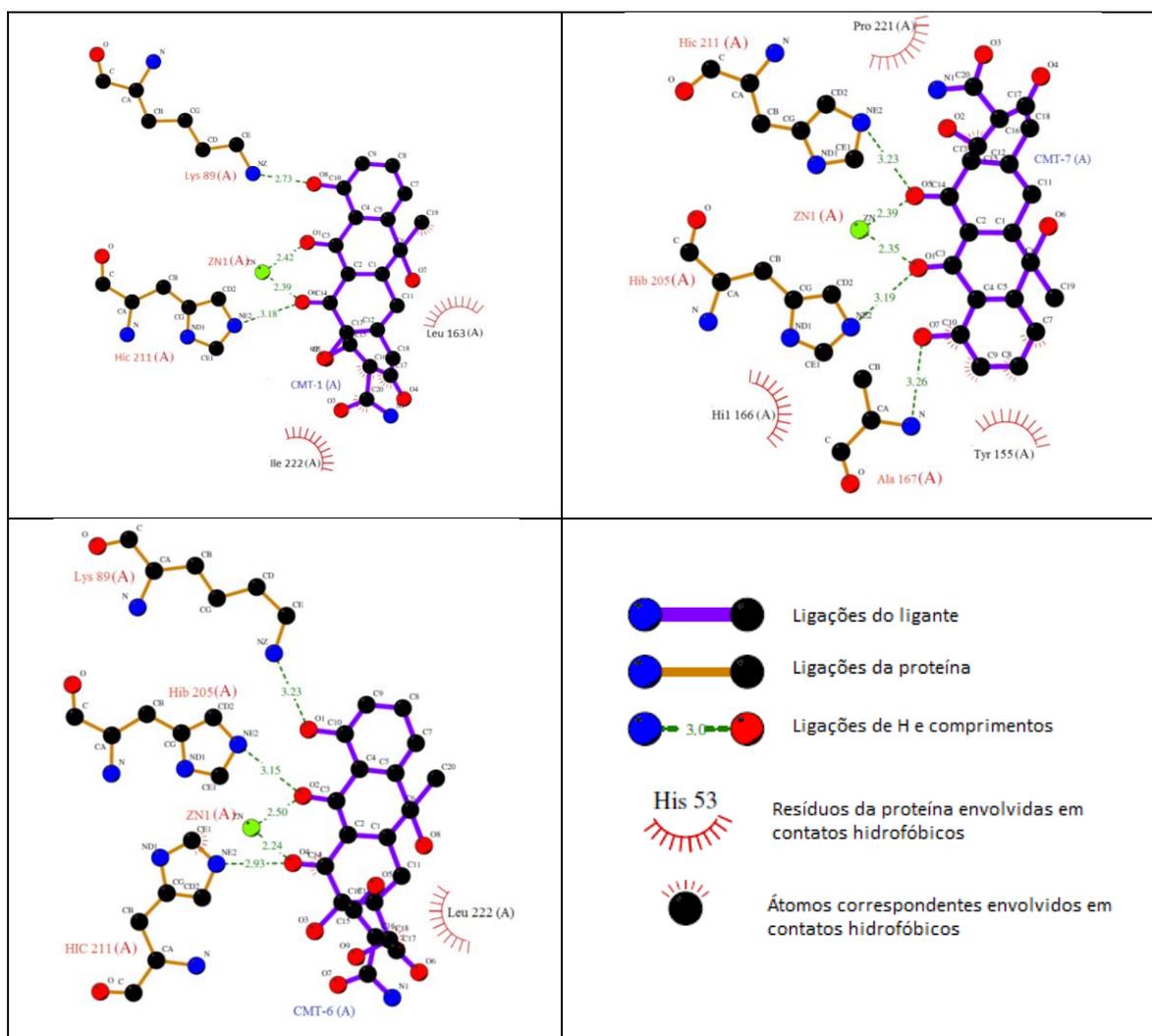


**Figura 3.24** Complexos da MMP-2:CMT-n (n=CMT-1, -2, -4 e -6) obtidos da simulação de DM.

A posição ocupada pela CMT-3 no interior do sítio ativo da MMP-2 é totalmente diferente do observado nos complexos com os outros análogos CMT-n estudados aqui. Os outros complexos apresentam os ligantes coordenados diretamente com o centro metálico através dos átomos de oxigênio O11-O12. Os ligantes CMT-1 e CMT-6 fazem ligações de

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo LYS89 como mostrado na Figura 3.25, e os ligantes CMT-4 e CMT-8 também fazem interações com a LYS89. O ligante CMT-7 forma ligação de hidrogênio com a ALA167 (3.3 Å). Além das interações de hidrogênio outras interações hidrofóbicas (ver Figura 3.25) estabilizam os complexos, como o anel D da CMT-7 que faz um contato hidrofóbico com a TYR155 que está perto do zinco estrutural da MMP-2 (ver Figura 3.23).



**Figura 3.25** Principais interações para os complexos da MMP-2 com CMT1, CMT-6 e CMT-7 após 12 ns de simulação de DM.

Aliando informações experimentais com os resultados estruturais apresentados aqui para a interação das CMT-n com o domínio catalítico da MMP-2, pode-se sugerir que a coordenação ao zinco catalítico não é a característica principal responsável pela inibição de MMPs. A ocupação do bolso S1' da MMP pode desempenhar um papel importante para a resposta biológica dos inibidores. Isto deve ser verdade para aqueles compostos que têm um

grupo hidrofóbico, o qual é essencial para conduzir a molécula dentro do sítio ativo, caso contrário, a coordenação ao zinco deve dominar a interação proteína-ligante.

#### 3.4.4 Flutuações dos desvios quadráticos médios atômicos (RMSF)

A análise por RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) permite identificar as partes do sistema (resíduos ou átomos) cuja posição sofre uma maior variabilidade ao longo de uma dinâmica. Em outras palavras, identifica as regiões mais flexíveis do sistema, isto é àquelas que se movem mais ao longo da simulação em relação à sua posição média ocupada durante o período total de simulação. Para uma partícula  $i$  e um tempo de simulação  $T$ , o valor do RMSF pode ser dado por:

$$RMSF(r) = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (r_i - \bar{r}_i)^2} \quad (3.10)$$

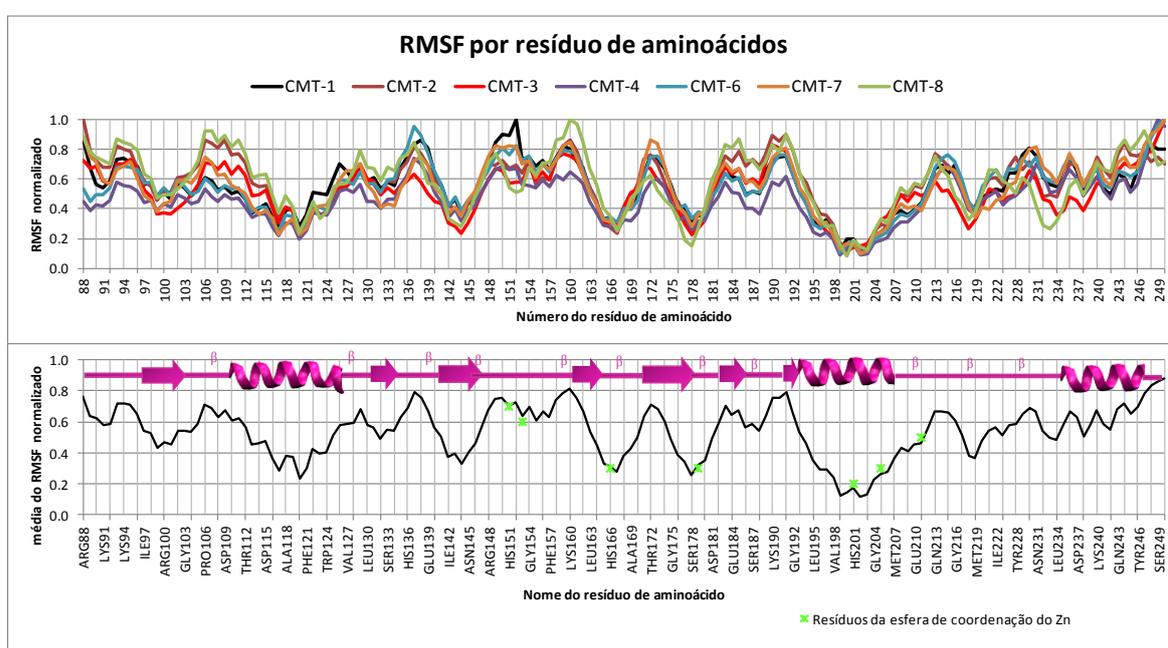
Na Equação acima  $r_i$  é a posição da partícula no instante de tempo  $t$ , enquanto  $\bar{r}_i$  é a posição média da partícula  $i$  no tempo total de simulação  $T$ .

Neste estudo, a análise do RMSF foi realizada para cada resíduo de aminoácido, considerando os átomos de carbono alfa (CA) do esqueleto peptídico, durante os últimos 6 ns de simulação. A Figura 3.26 ilustra o RMSF calculado para cada resíduo de aminoácido a partir da simulação MD para todos os complexos MMP-2:CMT-n. Os valores representados na Figura 3.26 foram normalizados tomando como referência o valor máximo para cada complexo.

A representação gráfica (Figura 3.26) do RMSF mostra que a flexibilidade do domínio catalítico de MMP-2 quando complexado com diferentes CMTs é semelhante. Entre os complexos, o MMP-2:CMT-8 apresenta, no geral as maiores flutuações, mas todos os complexos MMP-2:CMT-n apresentam o mesmo perfil geral das regiões flexíveis da enzima. Portanto, o RMSF médio para os complexos ilustrados na Figura 3.26 fornece uma visão geral da flexibilidade global do domínio catalítico da MMP-2, na presença das moléculas de tetraciclina quimicamente modificadas. Em geral, a diferença do RMSF entre as regiões mais flexíveis e menos flexíveis da enzima é notável.

Os resíduos altamente conservados no domínio catalítico da MMP-2 podem ser mostrados através da análise do grau de conservação dos resíduos. O grau de conservação

varia de 1 a 9 e foi calculado a partir dos valores dados pelo algoritmo Rate4Site (Mayrose *et al.*, 2004). O resíduo é considerado altamente conservado quando o grau de conservação é 7 ou superior, e, quando este valor é 1, considera-se variável. Considerando os diferentes complexos, exceto nos resíduos terminais, as regiões que constituem a  $\alpha$  hélices (resíduos Pro110-SER125 e MET195-LEU207) são pouco flexíveis, incluindo a última  $\alpha$  hélice compreendendo os resíduos altamente conservados HIS201, HIS205 (com grau de conservação 9), os quais estão coordenados com o íon zinco catalítico. A outra região com elevado grau de conservação, apresenta pouca flexibilidade e é constituída pela volta  $\beta$  (*turn*) LEU164-ALA168 (com grau de conservação, entre 6 e 9).



**Figura 3.26** Representação gráfica do RMSF para todos os resíduos de aminoácidos ao longo da sequência de aminoácidos do domínio catalítico da MMP-2 calculados nos últimos 6 ns das simulações de DM realizadas para os complexos MMP-2:CMT-n.

Em geral, a região da primeira cadeia composta pelos resíduos de aminoácidos ILE198-GLU203 apresentam baixa flexibilidade, os resíduos nesta região são altamente conservados, com grau de conservação variando entre 7 e 9, destacando os resíduos GLU132 e ARG142 que são altamente conservadas (grau de conservação 9). Por outro lado, as principais regiões flexíveis comprimem as regiões dos resíduos ARG148-GLU161 e SER188-GLY192. Este comportamento está de acordo com o fato dos resíduos dessas regiões serem fracamente ou moderadamente conservados, com grau de conservação entre

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 e 4, as únicas exceções são os resíduos de PHE157, ASP158 e GLY159 que apresentam grau 9. Os resíduos de aminoácidos em contato com o metal de zinco catalítico e estrutural são destacados na Figura 3.26. Eles são encontrados em regiões com baixa flexibilidade e são resíduos altamente conservados (grau de conservação entre 8 e 9), o que está de acordo com a análise RMSD para a esfera de coordenação do zinco (ver Figuras 3.23 e 3.24). A exceção são os resíduos conservados HIS151 e ASP153 que estão coordenados ao átomo de zinco estrutural e localizados em uma região de flexibilidade moderada, devido a estes resíduos estarem muito expostos ao solvente na MMP-2.

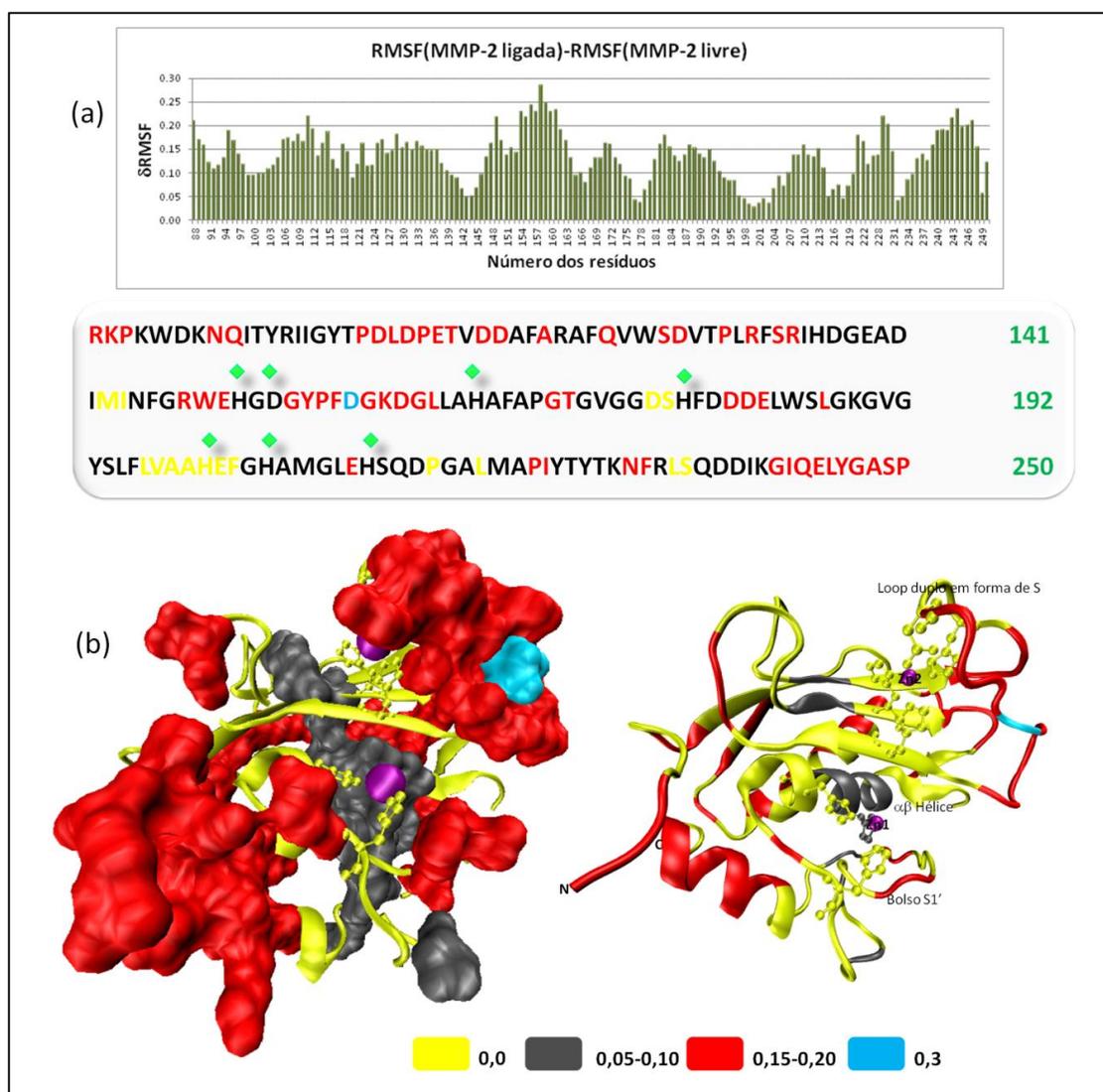
A Tabela 3.9 mostra os valores médios para o RMSF dos átomos de CA da MMP-2 livre e para a MMP-2 complexada com as CMT-n. A Figura 3.27a ilustra as diferenças entre os RMSFs ( $\delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_{\text{ligada}} - \text{RMSF}_{\text{livre}}$ ). É interessante observar que os valores do RMSF são significativamente mais elevados para os complexos do que para a estrutura livre da MMP-2, o que sugere uma influência significativa dos ligantes aumentando a flexibilidade da enzima. A Figura 3.27 mostra as regiões da enzima para as quais o RMSF é mais afetado pela coordenação com a CMT-n. Estas regiões (mostradas na cor vermelha e azul na Figura 3.27b) são constituídas principalmente pelos resíduos externos da enzima, e estão tipicamente em posições expostos ao solvente.

**Tabela 3.9** Os valores das flutuações do desvio quadrático médio (RMSF) calculados nos últimos 6 ns da simulação de DM realizada para os complexos MMP-2:CMT-n e a enzima MMP-2 livre.

	Média do RMSF (C $\alpha$ em Å)
MMP-2:CMT-1	0,56 $\pm$ 0,17
MMP-2:CMT-2	0,59 $\pm$ 0,18
MMP-2:CMT-3	0,51 $\pm$ 0,16
MMP-2:CMT-4	0,46 $\pm$ 0,15
MMP-2:CMT-6	0,55 $\pm$ 0,18
MMP-2:CMT-7	0,55 $\pm$ 0,19
MMP-2:CMT-8	0,58 $\pm$ 0,20
MMP-2	0,41 $\pm$ 0,14

A região dos resíduos 240-250 ( $\alpha$  hélice curta) na carboxila terminal apresenta uma maior flexibilidade quando a CMT-n está ligada ( $\delta\text{RMSF} > 0,15$ ) (ver Figura 3.27a). Por outro lado, as regiões perto dos átomos de zinco são completamente conservadas, como pode ser visto na cor amarela na Figura 3.27b. Este comportamento sugere uma modificação na

estrutura ou dinâmica da enzima devido a um efeito alostérico do ligante. Efeitos semelhantes foram observados em outras enzimas contendo Zn, mais notavelmente em farnesiltransferase (Sousa, Fernandes e Ramos, 2008a; b; Sousa, Fernandes e Ramos, 2009; Valente *et al.*, 2012).



**Figura 3.27** (a) Diferença da média do RMSF da MMP-2 ligada aos ligantes CMT-n e a enzima MMP-2 livre. O losango em verde destaca os aminoácidos coordenados ao centro metálico de zinco. (b) Variações nos RMSFs estão representadas na estrutura da MMP-2, mostrando as regiões em que os RMSFs são mais afetados pela coordenação.

### 3.4.5 Área da superfície molecular acessível ao solvente (SASA)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A área da superfície acessível ao solvente (*Solvent Accessible Surface Area - SASA*) de uma molécula é a área da superfície cumulativa dos átomos individuais acessível a uma molécula de solvente. Portanto, essa quantidade descreve a área na qual o contato entre a proteína e o solvente ocorre. Os átomos da proteína e as moléculas do solvente são modelados como esferas usando os raios de van der Waals correspondentes. A SASA é então calculada a partir de uma esfera de prova, que representa a molécula do solvente considerado como se essa circulasse sobre uma superfície de van der Waals da proteína. Neste trabalho, o solvente considerado foi a água e o raio da esfera de prova foi de 1,4 Å. A acessibilidade ao solvente foi calculada para as estruturas dos ligantes e todos os átomos dos resíduos de aminoácido da MMP-2.

A Tabela 3.10 mostra os valores de SASA calculados para cada molécula de CMT-n no domínio catalítico da MMP-2. A análise realizada para todos os ligantes nas simulações de DM demonstra que estas moléculas são muito expostas ao solvente. Exceto para a molécula da CMT-3, as simulações de DM realizadas para os outros ligantes mostram um SASA médio variando de 271,2-350,9 Å<sup>2</sup>, que representa mais de 50% da área da superfície total do ligante livre em solução (para os ligantes livres o SASA varia de 513,3-542,2 Å<sup>2</sup>). A estrutura da CMT-8 apresentou uma SASA médio igual a 350,9 ± 16,3 Å<sup>2</sup>, correspondendo a 68% da área da superfície da molécula da CMT-8 livre em solução que é de 516,3 ± 7,7 Å<sup>2</sup>. O complexo MMP-2:CMT-8 mostrou grande flexibilidade como mostrado na Tabela 3.8. Por outro lado, a simulação de DM realizada para a estrutura da CMT-3 apresenta um SASA médio de 190,6 ± 13,0 Å<sup>2</sup>, um valor que corresponde a apenas 38% da área da superfície total da CMT-3 livre em solução que é de 501,0 ± 7,5 Å<sup>2</sup>. Por conseguinte, este ligante apresenta mais de 60% da sua superfície molecular interagindo com a proteína. Estes dados mostram que este análogo tem um comportamento singular ao interagir com sítio catalítico da enzima MMP-2.

A Tabela 3.10 também inclui o coeficiente de partição experimental (LogP em octanol/água)(Liu *et al.*, 2001) para os compostos CMT-n. O coeficiente de partição é a razão entre a concentração de equilíbrio de uma substância dissolvida num sistema de duas fases, constituído por dois solventes imiscíveis (octanol/água). Como resultado, o LogP constitui um descritor quantitativo de hidrofobicidade. Este parâmetro físico-químico que descreve a hidrofobicidade das moléculas é útil para prever o transporte e a atividade das drogas, e pode ser relacionado com o SASA. Os valores do logP para as moléculas de CMT-n mostram que os análogos hidrofóbicos (LogP>0) apresentam valores substancialmente inferiores SASA, e os derivados hidrofílicos (LogP <0) apresentam valores de SASA mais

elevados (ver Tabela 3.10). Com exceção da CMT-8, que mostrou um valor de SASA grande e o LogP positivo. Apesar disso, os valores de SASA refletem a hidrofobicidade das moléculas de CMT-n.

**Tabela 3.10** Valores do SASA calculados para as moléculas de CMT-n nos complexos MMP-2:CMT-n e o coeficiente de partição experimental (octanol/água) para as CMT-n.

Ligante	SASA médio		SASA máximo		SASA mínimo		LogP <sup>exp a</sup>
	Å <sup>2</sup>	%	Å <sup>2</sup>	%	Å <sup>2</sup>	%	
CMT-1	280,5 ± 16,6	53,1	352,7	66,8	224,1	42,9	-0,23
CMT-2	276,0 ± 17,2	50,6	337,4	61,9	208,4	38,2	-1,36
CMT-3	190,6 ± 13,0	38,0	234,6	46,8	147,9	29,5	1,14
CMT-4	271,2 ± 20,8	50,1	338,1	62,6	216,2	40,0	0,26
CMT-6	346,4 ± 24,6	65,3	422,3	79,6	267,0	50,3	-1,27
CMT-7	259,0 ± 15,4	50,5	305,4	59,5	217,0	42,3	0,77
CMT-8	350,9 ± 16,3	68,0	416,5	80,7	296,0	57,3	0,38

<sup>a</sup>Obtido da referência. (Liu *et al.*, 2001).

A Tabela 3.11 resume os mais importantes resíduos da MMP-2 que estão em contato com as moléculas de CMT-n através de interação de van der Waals. Um total de 31 resíduos de aminoácidos foram considerados nesta análise (ver Tabela 3.11). A diferença entre os ligantes pode ser observada a partir da superfície média de contato dos resíduos de aminoácidos (em %). Os resíduos que contribuem para a superfície de contato das CMT-n são diferentes para os análogos considerados. No entanto, alguns resíduos de aminoácidos são importantes para todos os ligantes CMT-n, tais como os resíduos altamente conservados PHE157 (grau de conservação 9), o resíduo de ALA165 (grau de conservação 8) e especialmente o resíduo TYR223 altamente conservado (grau de conservação 9), que aparece como o único resíduo de aminoácido a contribuir para a superfície de contato de todas as CMT-n, contribuindo menos para os ligantes CMT-1 e CMT-6. Outros resíduos de aminoácidos estão em contato com a superfície das CMT-n incluindo os resíduos pouco conservados, a GLN213 (grau de conservação 2) e o resíduo de TYR228 (grau de conservação 2).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 3.11** Análise dos contatos das CMT-n com os 31 resíduos de aminoácidos da MMP-2, com a indicação da porcentagem média de superfície de contacto com a CMT-n para cada resíduo durante a simulação MD e o grau de conservação para cada resíduo.

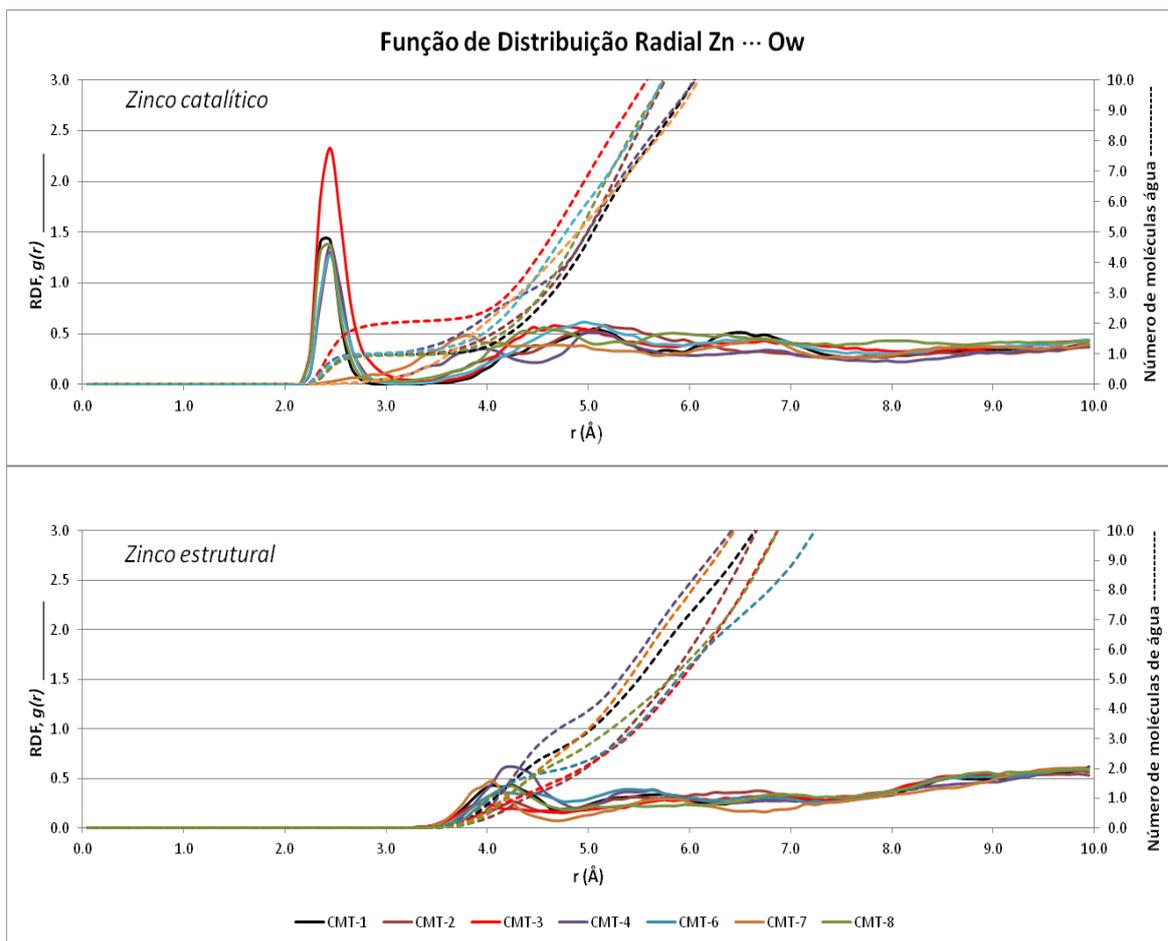
Resíduos	Superfície de contato médio dos ligantes (%)							Grau de conservação dos aminoácidos
	CMT-1	CMT-2	CMT-3	CMT-4	CMT-6	CMT-7	CMT-8	
LYS89	<b>4,0</b>	0,1	0,0	<b>2,4</b>	<b>4,0</b>	0,0	0,0	2
TYR155	<b>6,3</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1
PHE157	0,0	2,5	0,0	<b>6,0</b>	<b>5,4</b>	<b>6,7</b>	1,3	9
GLY162	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4
LEU163	<b>5,2</b>	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	4
LEU164	0,2	0,7	<b>3,7</b>	0,1	0,3	0,5	0,0	8
ALA165	0,3	<b>6,4</b>	0,0	<b>6,1</b>	<b>4,0</b>	<b>3,9</b>	0,6	8
HIS166	1,3	<b>3,2</b>	1,8	0,0	0,3	0,1	0,1	9
ALA167	1,4	0,8	0,0	0,2	0,2	0,5	0,0	9
PHE168	0,3	0,2	0,0	1,9	0,3	1,3	0,0	6
ALA169	0,0	0,1	0,0	2,1	0,8	1,5	0,0	2
PRO170	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	0,9	0,0	9
LEU195	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9
ALA199	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8
ALA200	0,0	1,0	<b>3,3</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	8
HIS201	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9
PHE203	0,0	1,0	2,6	0,1	1,6	1,1	<b>3,0</b>	6
GLY204	0,0	0,8	0,0	0,3	0,1	0,1	0,1	9
HIS205	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9
MET207	0,0	2,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,1	8
HIS211	2,6	0,0	0,0	0,0	1,6	1,6	0,0	9
SER212	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	9
GLN213	0,0	<b>2,6</b>	<b>4,2</b>	<b>2,4</b>	<b>3,5</b>	<b>2,6</b>	<b>2,8</b>	2
ALA220	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	3
PRO221	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7
ILE222	<b>4,5</b>	0,2	0,6	0,1	0,0	0,0	0,1	4
TYR223	0,1	0,6	2,7	1,8	0,3	<b>6,3</b>	1,9	9
THR227	0,0	2,3	0,4	<b>2,8</b>	0,0	0,1	<b>3,7</b>	1
TYR228	0,0	<b>6,9</b>	<b>5,6</b>	1,7	0,0	0,0	<b>3,4</b>	2
THR229	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1

### 3.4.6 Funções de distribuição radial (RDF)

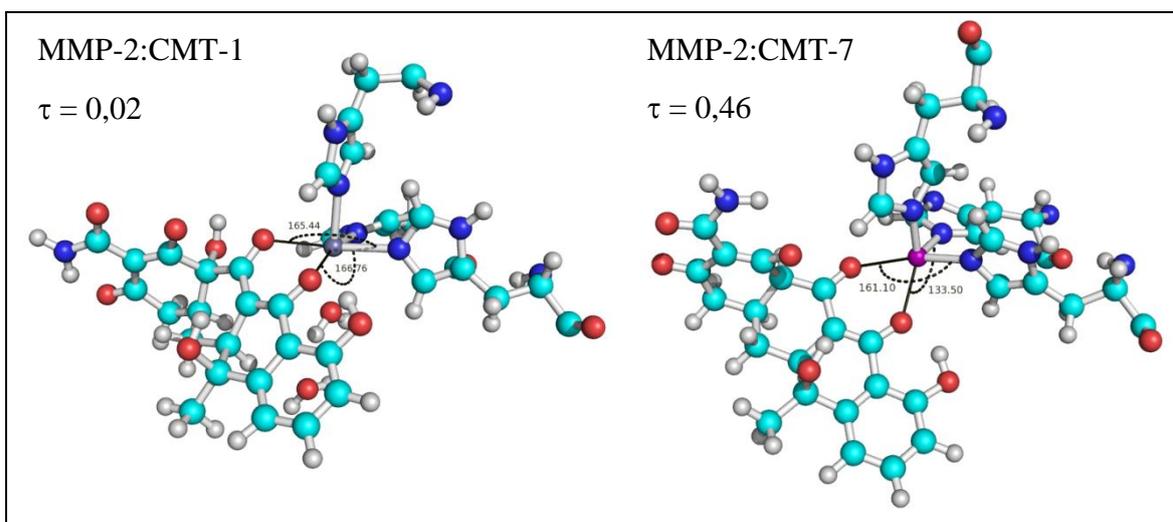
As funções de distribuição radial (*Radial Distribution Functions* - RDF) permitem contabilizar a correlação na distribuição espacial de moléculas resultantes do conjunto de forças que atuam numa simulação, indicando a densidade de átomos que é possível encontrar a uma dada distância de um átomo de referência. Esta propriedade é de especial utilidade no estudo de sistemas biomoleculares em solvente explícito, pois permite saber como é a distribuição das moléculas de solvente (água) em torno de determinado átomo do sistema biomolecular.

No presente estudo, a análise da função de distribuição radial em torno do metal foi realizada afim de obter uma visão sobre a distribuição das moléculas de água em torno das moléculas de CMT-n e dos íons de zinco. A função de correlação de pares  $g(r)$  para  $Zn \cdots Ow$  (oxigênio na água) é representada na Figura 3.28, para ambos os átomos de zinco catalítico e estrutural, chamados de Zn1 e Zn2, respectivamente. Da análise visual da Figura 3.28 é possível ver que somente o íon Zn1 é acessível pelo solvente, com um pico centrado em 2,45 Å para todos os complexos MMP-2:CMT-n (exceto CMT-7), correspondentes a 1-2 moléculas de água na camada de solvatação. O complexo MMP-2:CMT-3 apresenta duas moléculas de água na esfera de coordenação do Zn1, enquanto que para os outros análogos apenas uma molécula de água atinge a esfera de coordenação Zn1. Isto pode ser explicado com base no modo de ligação distinto da CMT-3 com a proteína, que não está coordenada diretamente ao zinco, por consequência a exposição do metal para o solvente é bem maior.

O complexo MMP-2:CMT-7 não apresenta uma molécula de água na região de esfera de coordenação do zinco (2,45 Å) como os outros complexos e este comportamento é devido à geometria do complexo de zinco com o ligante CMT-7. A geometria do metal pode ser caracterizada pelo grau de trigonalidade ( $\tau$ ) do centro de metal de zinco como descrito na seção 3.1 e ilustrado no esquema 3.1. A análise do parâmetro  $\tau$  (ver Tabela 3.8) mostra que o grau de trigonalidade está próximo de 0 para a maioria dos complexos (CMT-1 e CMT-2 apresentam  $\tau = 0,02$  e  $0,07$ , respectivamente) indicando que a geometria do centro metálico é uma pirâmide de base quadrada perfeita. O complexo com a CMT-7 mostra um grau de trigonalidade = 0,46 e, neste caso, a geometria em torno do centro metálico é uma mistura de pirâmide de base quadrada e bipirâmide trigonal, como ilustrado na Figura 3.29. Isto sugere que a geometria de zinco leva a um impedimento estérico para as moléculas de água se aproximarem da região.



**Figura 3.28** Representação gráfica da função de distribuição radial  $g(r)$  e do número de moléculas de água em função da distância de interação entre  $Zn \cdots Ow$  (oxigênio da água) calculado para o zinco catalítico e estrutural em todos os complexos MMP-2:CMT-n.



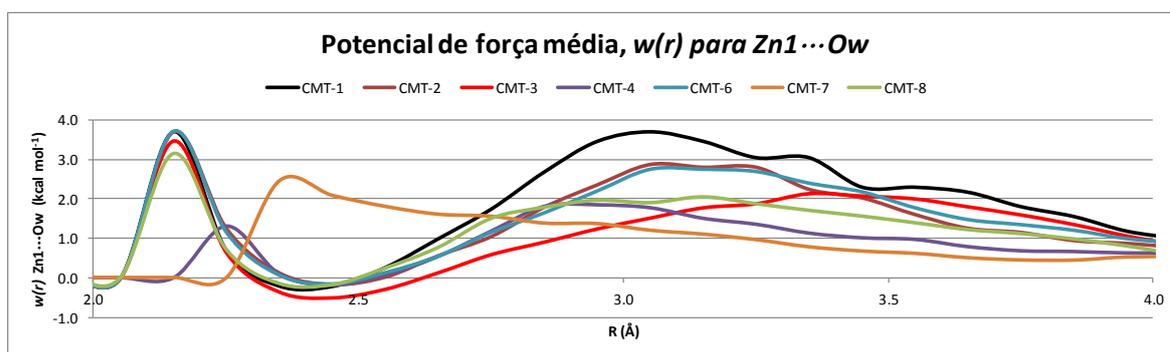
**Figura 3.29** Esfera de coordenação para os complexos MMP-2:CMT1 e MMP-2:CMT7 após 12 ns de simulação de DM.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de auxiliar na análise da interação Zn-água, o potencial de força média,  $w(r)$ , foi calculado para o par atômico Zn...Ow em todos os complexo MMP-2:CMT-n. Para duas moléculas que interagem no interior de um conjunto de N moléculas (mantendo a temperatura T constante),  $w(r)$  pode ser calculado a partir da  $g(r)$  como na Equação (3.11) e representa a interação entre duas moléculas a uma distância  $r$  quando as outras N-2 moléculas restantes são uma média sobre todas as configurações (Mcquarrie, 2000).

$$g(r) = e^{-w(r)/RT} \quad (3.11)$$

Os resultados obtidos para os complexos MMP-2:CMT-n são mostrados na Figura 3.30, com  $w(r)$  calculado em torno da esfera de coordenação Zn1 num raio de 2-4 Å. A distância média Zn...Ow é 2,45 Å, e mais evidente para o complexo com a CMT-3. Portanto, além do número maior de moléculas de água na esfera de coordenação Zn1 para o complexo a CMT-3, mostradas na RDF, essa interação é mais forte.



**Figura 3.30** Potencial de força média,  $w(r)$ , calculado para os pares Zn...Ow em função da distância R. Apenas o Zn catalítico, ou seja, Zn1, foi considerado.

Com base nos resultados anteriores, uma análise mais profunda do solvente em torno do centro de zinco foi realizada. Foram mapeadas todas as moléculas de solvente ao redor do átomo do zinco catalítico nos últimos 6 ns de simulação de DM para cada complexo MMP-2:CMT-n, considerando uma distância Zn...Ow limite de 2,45 Å. A esta distância, 3000 configurações foram extraídas a partir da simulação DM. A Figura 3.30 ilustra a probabilidade de encontrar uma molécula de água interagindo com a esfera de coordenação do zinco. A probabilidade média de encontrar uma molécula de água varia entre 40-70%, exceto para o ligante CMT-7 em que o zinco catalítico não parece interagir com as moléculas do solvente (ver RDF na Figura 3.28) devido a geometria do metal. Isso significa que, pelo

menos, uma molécula de água permanece próxima do zinco ( $Zn \cdots Ow < 2,45 \text{ \AA}$ ) ao longo do tempo de simulação. O número médio de moléculas de água que visitam a esfera de coordenação do zinco (numa distância de  $2,45 \text{ \AA}$ ) no complexo com a CMT-3 é dois (Figura 3.28), mas o tempo de permanência dessa segunda molécula é mais curto em comparação com a primeira.

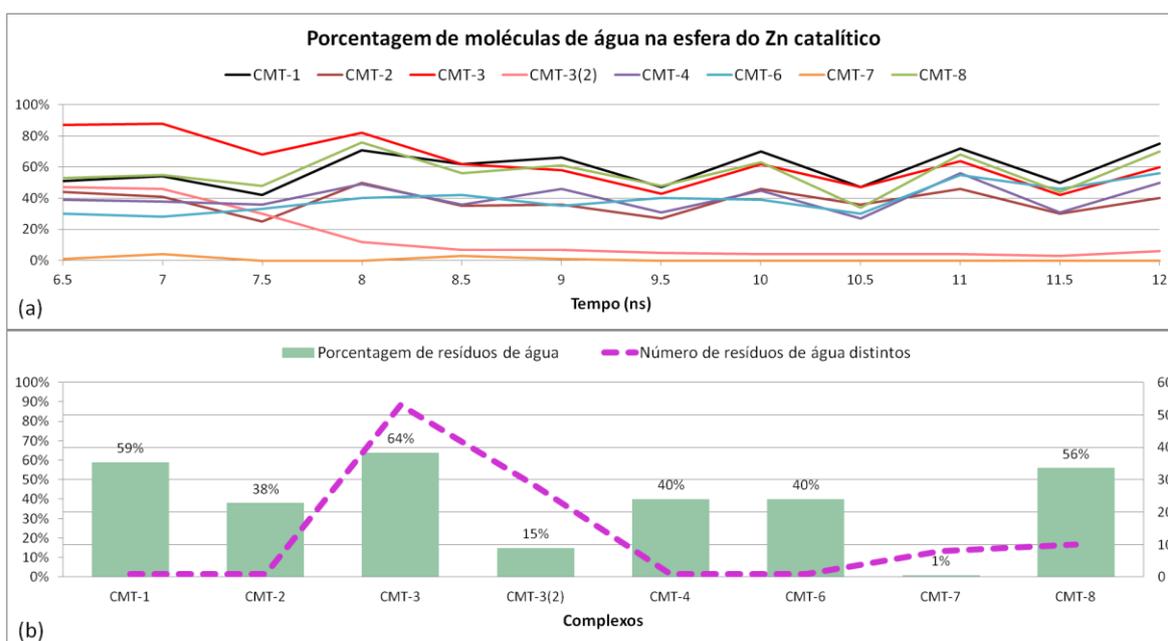
A presença de moléculas de água na esfera de coordenação do metal é comum em enzimas dependentes de Zn (Vallee e Auld, 1990; Tamames *et al.*, 2007; Sousa, Fernandes e Ramos, 2009; Sousa, Lopes, *et al.*, 2009; Chakrabarti *et al.*, 2011). No caso da enzima MMP-2, a molécula de água desempenha um papel importante no mecanismo catalítico, e comumente, quando a enzima está coordenada com um inibidor, a molécula de água estabiliza a cadeia lateral protonada do resíduo de GLU202. As análises das RDFs (Figura 3.28) mostram os primeiros picos de cada CMT a  $2,45 \text{ \AA}$ , que é uma distância muito grande para que a molécula de água esteja realmente coordenada ao centro metálico, pois a distância média de uma ligação Zn-OH<sub>2</sub> é de  $2,22 \text{ \AA}$ , de acordo com um estudo elaborado para proteínas de Zn depositadas no PDB (Tamames *et al.*, 2007).

A Figura 3.31 ilustra a probabilidade média de encontrar uma molécula de água até  $2,45 \text{ \AA}$  do zinco durante os últimos 6 ns de simulação para cada complexo. A linha tracejada representa o número de moléculas de água distintas que visitam a esfera de coordenação do zinco. Curiosamente, para o análogo CMT-3 um grande número de diferentes moléculas de água visitam a esfera de coordenação do zinco, esse comportamento é devido ao espaço disponível na esfera de coordenação do zinco no complexo MMP-2:CMT-3. Portanto, mesmo que a probabilidade de encontrar uma molécula de água próxima do Zn no complexo MMP-2:CMT-3 seja grande (64%), a troca de água é muito rápida. Para os outros complexos a probabilidade média é superior a 40% e inferior a 60%, no entanto, a mobilidade da água é baixa, o que pode ser devido à interação da água com os ligantes CMT-n (por exemplo, em ligações de hidrogênio) ocupando a esfera de coordenação do zinco.

A partir da análise anterior, e com base em trabalhos descritos na literatura é possível concluir que as moléculas de CMT-n se coordenam ao zinco catalítico no sítio ativo da MMP-2 resultando numa geometria pentacoordenada para o metal. Dessa forma as moléculas de água solvatam essa região próxima ao ligante, que é bastante exposto ao solvente como mostrado na análise do SASA (ver seção 3.4.5), desempenhando papel na estabilização da cadeia lateral protonada do resíduo GLU202 sem alterar a esfera de coordenação do zinco. A CMT-3 atua como um ligante distinto das demais CMT-n estudadas

aqui, pois além de interagir com o zinco também interage com o bolso S1' da enzima, e portanto o centro metálico fica exposto ao solvente.

Nesta seção foi apresentada uma visão atomística da estrutura e dinâmica do domínio catalítico da MMP-2 complexado com sete CMTs diferentes (CMT-n), com base nas trajetórias da dinâmica molecular dos complexos MMP-2:CMT-n em solução aquosa. A análise comparativa dos vários aspectos moleculares relevantes dos diferentes complexos da MMP-2 com os derivados CMT-n foi realizada com o intuito de elucidar o efeito dos ligantes sobre a estrutura da enzima. Os resultados ajudaram a compreender as diferenças estruturais entre os modos de ligação dos compostos relacionados e a elucidar o mecanismo pelo qual essas moléculas inibem a atividade das enzimas da família das MMPs. Entretanto, para uma análise completa da interação das CMT-n com a MMP-2 é necessário avaliar a energia de interação proteína-ligante, que será discutido em detalhes na próxima seção.



**Figura 3.31** (a) Porcentagem de moléculas de água ao redor do átomo Zn1 calculada a cada 500ps nos últimos 6ns de simulação de DM. (b) Percentual médio de água a partir dos últimos 6ns de simulação e Ow de resíduos distintos (átomo de oxigênio de diferentes resíduos de água) que visitam a esfera do zinco.

### 3.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE RELATIVA DOS COMPLEXOS CMT-N COM A METALOPROTEINASE MMP-2

O principal objetivo deste estudo é descrever quantitativamente a interação molecular das tetraciclinas quimicamente modificadas com o sítio catalítico de MMPs. Os resultados descritos e discutidos nesta tese já evidenciaram importantes aspectos, sobretudo estruturais, envolvidos nesse mecanismo. A influência ou a dependência da natureza dessa interação com a estrutura das diferentes CMTs ficou evidente com os estudos que combinaram experimentos de docking molecular e simulação de dinâmica molecular. Essas análises foram complementadas com uma avaliação energética dos complexos MMP-2:CMT-n resultantes aplicando os métodos de cálculo de energia de associação; o MM-PBSA (*molecular mechanics/Poisson-Boltzmann surface area*) e o método da integração termodinâmica (*Thermodynamic integration* - TI). Esses métodos são amplamente usados em estudos de interação proteína-ligante com resultados muito positivos e confiáveis, ambos já foram descritos na seção 2.5. Os resultados da análise energética da interação das CMT-n com o domínio catalítico da MMP-2 serão descritos nesta seção.

#### 3.6.1 Tratamento teórico

Para discutir a estabilidade relativa dos complexos MMP-2:CMT-n foram calculadas a energia livre de ligação relativa ( $\Delta\Delta G_{\text{lig}}$ ) para todos os sistemas. Os valores do  $\Delta\Delta G_{\text{lig}}$  foram calculados usando o método mais rigoroso da integração termodinâmica (TI) (Steinbrecher e Labahn, 2010) e também usando um método mais rápido computacionalmente, o MM-PBSA (Kollman *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2005). Na verdade, ambos os métodos são indicados para prever a energia livre de interação proteína-ligante. O método MM-PBSA calcula a energia livre de ligação com base na análise das conformações obtidas da simulação DM e utiliza um modelo de solvente contínuo. O ponto fraco desse método é sua restrição às simulações para os estados inicial e final do processo (antes e depois da ligação), sem incluir qualquer estado intermediário, como é feito no formalismo TI (Steinbrecher e Labahn, 2010). Por outro lado, a abordagem do MM-PBSA tem a vantagem de considerar grandes mudanças estruturais num baixo tempo computacional (Kollman *et al.*, 2000; Swanson, Henchman e Mccammon, 2004; Kuhn *et al.*, 2005). No presente estudo, o método TI foi aplicado apenas para dois análogos da CMT-n, a CMT-3 e a CMT-8, para os demais ligantes foi empregado o MM-PBSA. A escolha da CMT-3 e da CMT-8 baseou-se na

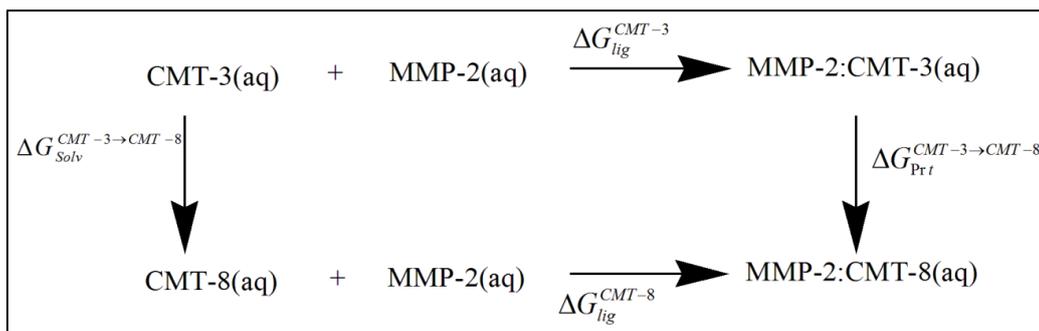
resposta biológica elevada desses derivados (Lokeshwar, Escatel e Zhu, 2001). Outro fator importante é que a CMT-3 é o derivado da tetraciclina com a estrutura mais simples e a CMT-8 é o derivado com a estrutura mais próxima da doxiciclina (ver Figura 1.4).

A ideia básica é utilizar o resultados do método TI para calibrar um protocolo no MM-PBSA para ser aplicado nos cálculos de todos os sistemas. O objetivo deste trabalho foi ranquear as afinidades de ligação das CMT-n com a enzima MMP-2, em vez de dar previsões precisas das energias livre absoluta de ligação de cada composto com a proteína. Desse modo, a utilização de métodos rigorosos como TI ou FEP para validar os resultados com métodos mais rápidos como o MM-PBSA parece ser uma estratégia inteligente e pode ser útil para prever a energia livre de ligação para grandes sistemas, especialmente aqueles sem dados experimentais disponíveis. Esta estratégia metodológica já foi descrita na literatura com resultados aceitáveis (Perez, Fernandes e Ramos, 2010; Martins *et al.*, 2013).

*Integração termodinâmica*- Um objetivo importante da química computacional é a previsão exata de energia livre em sistemas moleculares. Como descrito na seção 2.5.1, o TI é um dos métodos mais rigorosos para calcular a energia livre relativa. O método TI permite o cálculo da diferença de energia livre entre dois estados. A diferença de energia livre entre os estados pode ser obtida diretamente a partir da integral de configuração (Equação (3.12)). A partir desta Equação a energia livre entre dois estados de um dado sistema pode ser obtida utilizando a aproximação do parâmetro de acoplamento ( $\lambda$ ). O parâmetro de acoplamento varia de 0 a 1 correspondendo para o estado inicial A e o estado final B, respectivamente. Basicamente, a diferença de energia livre  $\Delta G_{A \rightarrow B}$  é a integral de 0-1 sobre o valor de esperado de  $\partial V(\lambda)/\partial \lambda$ , onde V é a energia potencial. A integral da Equação (3.12) pode ser executada numericamente através de um número discreto de  $\lambda$  pontos.

$$\Delta G_{A \rightarrow B}^{TI} = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \quad (3.12)$$

O método TI foi aqui utilizado para prever a diferença de energia livre de ligação entre os ligantes CMT-3 e CMT-8 ligado no sítio ativo da MMP-2. A diferença na energia livre de Gibbs relativa  $\Delta \Delta G_{lig}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  foi avaliada usando o ciclo termodinâmico apresentado no Esquema 3.3.



**Esquema 3.3** Ciclo termodinâmico usado para calcular a diferença de energia livre entre os ligantes CMT-3 e CMT-8 na enzima MMP-2. O  $\Delta G_{lig}^{CMT-3}$  e  $\Delta G_{lig}^{CMT-8}$  são as energias livre de ligação para os ligantes CMT-3 e CMT-8, respectivamente. O  $\Delta G_{solv}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  e  $\Delta G_{prt}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  são as energias livre de transformação da CMT-3 em CMT-8 em solução e ligado dentro da enzima MMP-2, respectivamente.

Do ciclo termodinâmico ilustrado no esquema 3.3. obtêm-se a Equação (3.13).

$$\Delta \Delta G_{lig}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8} = \Delta G_{lig}^{CMT-8} - \Delta G_{lig}^{CMT-3} = \Delta G_{prt}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8} - \Delta G_{solv}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8} \quad (3.13)$$

Na qual os valores de  $\Delta G_{prt}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  e  $\Delta G_{solv}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  devem ser calculados. Estes valores individuais não têm nenhum significado, pois eles se referem às diferenças de energia livre entre moléculas distintas. No entanto, a diferença na energia livre de ligação entre os complexos da CMT-3 e da CMT-8 é significativa.

Duas transformações diferentes precisam ser simuladas, uma envolvendo a mutação na proteína,  $\Delta G_{prt}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  e a outra mutação no ligante livre,  $\Delta G_{solv}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$ . Por razões de estabilidade da simulação, estas duas transformações de energia foram divididas, cada uma, em três outras distintas: a primeira em que as cargas dos átomos que desaparecerão são removidas ( $\Delta G^1$ ); uma segunda etapa os potenciais de van der Waals e raios são transformados (grupos que desaparecem ou dissociação do ligante ao mesmo tempo em que aparece o novo grupo) ( $\Delta G^2$ ) e, finalmente, na terceira etapa as cargas dos novos átomos são adicionadas e aumentam gradualmente ( $\Delta G^3$ ). Também foram utilizados os potenciais *softcore* (Simonson, 1993) na subetapa 2, que são potenciais de Lennard-Jones modificados especificamente para melhorar a convergência do cálculo de TI no caso de aparecer ou desaparecer átomos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Agora é possível expressar os valores de  $\Delta G_{prt}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$ ,  $\Delta G_{solv}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  e  $\Delta \Delta G_{lig}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  como uma função de  $\Delta G^1$ ,  $\Delta G^2$  e  $\Delta G^3$ , e obter assim as equações 3.14, 3.15 e 3.16.

$$\Delta G_{prt}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8} = (\Delta G_{prt}^1 + \Delta G_{prt}^2 + \Delta G_{prt}^3) \quad (3.14)$$

$$\Delta G_{solv}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8} = (\Delta G_{solv}^1 + \Delta G_{solv}^2 + \Delta G_{solv}^3) \quad (3.15)$$

$$\Delta \Delta G_{lig}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8} = (\Delta G_{prt}^1 + \Delta G_{prt}^2 + \Delta G_{prt}^3) - (\Delta G_{solv}^1 + \Delta G_{solv}^2 + \Delta G_{solv}^3) \quad (3.16)$$

A energia livre de cada subetapa da transformação foi calculada usando as ferramentas de integração termodinâmicas do módulo SANDER do pacote AMBER 10. A simulação de cada subetapa foi realizada em solvente explícito e com condições periódicas de contorno para nove valores de  $\lambda$  (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 e 0,9). Para cada subetapa de cada transformação foi executada uma minimização, uma equilibração a volume constante, e por último a etapa de produção a pressão constante. As contribuições da energia livre ( $\partial V / \partial \lambda$ ) foram coletadas de forma independente para cada valor de  $\lambda$  na fase de produção.

Para a simulação de cada subetapa de cada transformação utilizou-se o campo de forças AMBER FF99 modificado com o conjunto de parâmetros desenvolvido no presente trabalho (Marcial *et al.*, 2012). Os ligantes CMT-3 e CMT-8 foram tratados com o campo de forças GAFF e as cargas RESP foram derivadas do cálculo no nível B3LYP/6-31G(d). Foram considerados os estados de protonação convencionais para todos os aminoácidos, em pH 7. Todos os átomos de hidrogênio foram adicionados, e íons de sódio foram colocados utilizando o programa Leap para neutralizar as cargas negativas do sistema. Cada complexo foi solvatado usando um modelo de água TIP3P em uma caixa periódica com uma distância mínima de 12 Å entre a enzima e os lados da caixa. O passo de integração da simulação foi de 1,0 fs junto com o algoritmo SHAKE (Ryckaert, Ciccotti e Berendsen, 1977). O método de Particle-mesh Ewald (PME) foi usado para contabilizar as interações eletrostáticas, e o *cutoff* de 9 Å foi considerado para as interações não ligadas. Cada valor de  $\lambda$  para cada etapa foram equilibrados por 50 ps seguido de 100ps de simulação de DM a pressão constante (1 atm) e temperatura de 300K.

O efeito da histerese na energia livre também foi avaliado através da realização das mutações no sentido direto e reverso. O tempo total de simulação para a mutação da CMT-3 para a CMT-8 foi de 7.800 ps. Esta transformação foi realizada na proteína e em solução, bem como nos sentidos direto e reverso, sendo o tempo total de simulação 15.600 ps para as espécies livres e ligadas na proteína.

*MM-PBSA*- As estruturas representativas (*snapshots*) dos complexos e dos ligantes coletados ao longo das trajetórias de dinâmica molecular foram tratados utilizando a metodologia *MM-PBSA* (Kollman *et al.*, 2000) para calcular a energia livre de ligação do complexo proteína-ligante em solução aquosa. Como discutido na seção 2.5.3 a energia livre de ligação é descrita pela seguinte equação:

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{PB} + \Delta G_{n\tilde{a}o-polar} \quad (3.17)$$

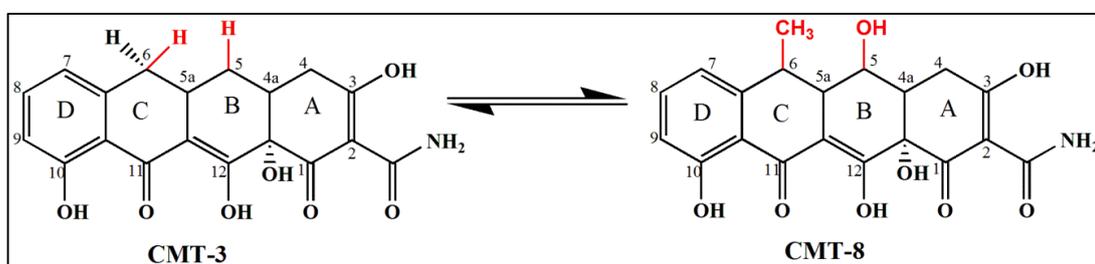
Os termos do lado direito ( $\Delta G_{PB} + \Delta G_{n\tilde{a}o-polar}$ ) na Equação (3.17) são as contribuições das energias livres de solvatação  $\Delta G_{solv}$ . O termo  $\Delta G_{PB}$  é a diferença na contribuição eletrostática para a energia livre de solvatação devido a interação com o ligante, que é estimada pela resolução da Equação de Poisson-Boltzmann (PB). O termo  $\Delta G_{n\tilde{a}o-polar}$  representa a diferença na contribuição apolar ou hidrofóbica para a energia de solvatação após a interação com o ligante, e é calculada a partir das diferenças na área da superfície acessível ao solvente da proteína e dos ligantes, livres e complexados. O  $\Delta E_{MM}$  é a energia da mecânica molecular para as moléculas, obtida pela soma das energias internas (isto é: energia de ligação,  $E_{int}$ ; a energia eletrostática,  $E_{ele}$  e interações de van der Waals,  $E_{vdw}$ ) das estruturas representativas das trajetórias da dinâmica molecular.

Todos os termos da Equação (3.17) são médias obtidas a partir de um conjunto de *snapshots* extraídos das simulações de DM em solvente explícito. Os valores foram obtidos por meio do módulo *pbsa* incluído no pacote AMBER 10. Os *snapshots* foram extraídos a cada 20 ps de simulação, resultando num total de 300 snapshots que foram utilizados para o cálculo da energia para cada ligante. No total foram 2.100 cálculos de energia executados com o módulo SANDER do AMBER 10. Não foram calculadas as contribuições entrópicas para a energia livre. Considerando a semelhança entre os ligantes CMT-n assumiu-se que as contribuições entrópicas para o  $\Delta\Delta G_{lig}$  se cancelariam.

Neste trabalho, os resultados obtidos com o método MM-PBSA estão em bom acordo com os valores calculados com o método TI para o processo CMT-3→CMT-8, dando suporte ao protocolo usado no MM-PBSA, com constante dielétrica externa e interna de 80,0 e 4,00, respectivamente. Um protocolo semelhante foi recentemente descrito para prever o reconhecimento do substrato na protease HIV-1 e mostrou resultados precisos (Perez, Fernandes e Ramos, 2010).

### 3.6.2 Análise da energia Livre

O método TI foi aplicado para calcular a energia livre relativa de ligação entre os complexos proteína-ligante, MMP-2:CMT-3 e MMP-2:CMT-8. Estes cálculos envolveram a transformação virtual do ligante CMT-3 em CMT-8, o que implica uma substituição dos átomos de H da posição C6 e C5 pelos grupos OH e CH<sub>3</sub>, respectivamente (Figura 3.32). Os valores de  $\langle \partial(\lambda)/\partial\lambda \rangle$  estão representados na Figura 3.33 como função de  $\lambda$  para as três transformações consideradas. Para verificar a dependência dos resultados na direção da mutação (histerese), também são apresentadas as curvas correspondentes à mutação na direção reversa (CMT-8→CMT-3).

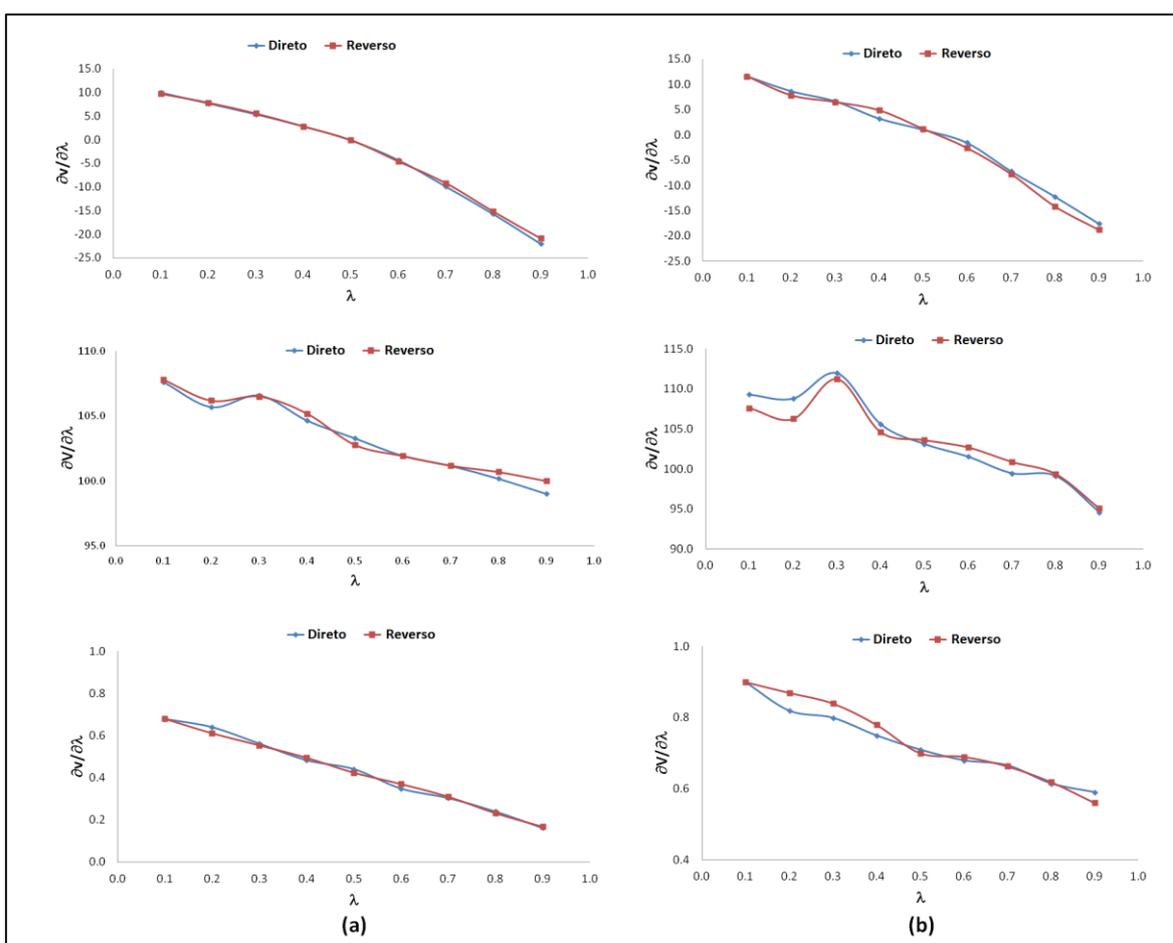


**Figura 3.32** Mutação estrutural do ligante CMT-3 para o ligante CMT-8.

Da Figura 3.33 é possível notar que as curvas das transformações em água são levemente mais suaves do que aquelas para a mutação do ligante na proteína, esse comportamento é esperado devido a complexidade conformacional do ligante no complexo proteína-ligante em comparação com uma solução isotrópica. As transformações de vdW no complexo mostra as maiores flutuações de  $\partial V(\lambda)/\partial\lambda$ , a curva de energia livre para a subetapa 2 do complexo é a mais irregular (ver Figura 3.33). Executar simulações mais longas para as transformações no complexo poderia suavizar as curvas de energia livre, no entanto a

maior parte das curvas de energia livre TI são curvas suaves e a histerese é muito baixa, mostrando a reversibilidade dos processos.

A energia livre para a transformação do ligante CMT-3 em CMT-8 livres em solução  $\Delta G_{solv}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  foi de 100,3 kcal mol<sup>-1</sup> e quando estão ligados na proteína  $\Delta G_{prt}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  foi de 103,0 kcal mol<sup>-1</sup>. Portanto a diferença na energia livre de ligação entre a CMT-3 e a CMT-8 foi de 2,7 kcal mol<sup>-1</sup> em favor da CMT-3. A energia livre para a mesma mutação calculada em sentido reverso para os ligantes livres  $\Delta G_{solv}^{CMT-8 \rightarrow CMT-3}$  foi de -100,9 kcal mol<sup>-1</sup> e o valor quando estão no ambiente da proteína  $\Delta G_{prt}^{CMT-8 \rightarrow CMT-3}$  foi de -98,8 kcal mol<sup>-1</sup> e então o valor de  $\Delta\Delta G_{lig}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8} = 3,1$  kcal mol<sup>-1</sup>.



**Figura 3.33** Valores de  $\partial V(\lambda)/\partial \lambda$  (kcal mol<sup>-1</sup>) em função de  $\lambda$  para cada transformação no sentido direto e reverso. (a) Subetapas 1, 2 e 3 para a transformação dos ligantes livre em solução (b) Subetapas 1, 2 e 3 para a transformação dos ligantes no ambiente da proteína.

Dos valores obtidos é possível observar uma boa convergência e consistência dos cálculos TI. A maior contribuição para a diferença de energia livre de ligação resulta de

interações eletrostáticas (primeira e terceira transformação), o que é consistente com as características dos grupos envolvidos na transformação, por exemplo, a perda de solvatação no grupo hidroxila polar (presente na CMT-8 e trocado por hidrogênios na CMT-3) pode influenciar fortemente a energia livre relativa.

Para avaliar as afinidades de ligação dos compostos CMT-n com o sítio ativo da MMP-2 em solução aquosa foi usada a metodologia MM-PBSA. A constante dielétrica interna foi ajustada a fim de reproduzir o valor de energia livre relativa obtida com o método TI. Esta calibração do método MM-PBSA foi feita apenas para o processo CMT-3→CMT-8. Com o método de TI, o valor médio obtido para  $\Delta\Delta G_{lig}^{CMT-3 \rightarrow CMT-8}$  nas direções direta e reversa foi de 2,9 kcal mol<sup>-1</sup> e com o MM-PBSA, com uma constante dielétrica interna igual a 4,0, o valor correspondente foi de 2,6 kcal mol<sup>-1</sup>.

As contribuições do MM-PBSA referentes aos termos descritos na Equação (3.17) foram calculados para um conjunto de 300 *snapshots* coletados ao longo dos últimos 6 ns da simulação de DM. A Tabela 3.12 mostra as diferentes contribuições descritas na Equação (3.15) para os complexos MMP-2:CMT-n, incluindo as energias  $\Delta E_{ele}$  e  $\Delta E_{vdw}$  em fase gasosa e as energias  $\Delta G_{PB}$  e  $\Delta G_{n\grave{a}o-polar}$  em solução. Os desvios padrão para os ligantes CMT-7 e CMT-8 estão incluídos na Tabela 3.12. As energias em fase gasosa favorecem a ligação e a energia livre de solvatação polar desfavorece a energia livre de ligação para todos os complexos. Apenas a contribuição do solvente não-polar se encontra ligeiramente negativa para a formação do complexo.

Como mostrado na Tabela 3.12, a energia livre de ligação é dominada pelos termos de solvatação eletrostáticos e polares. Especialmente no caso do análogo CMT-4, que tem um átomo de Cl ligado na posição C7 (ver Figura 1.4) e é o menos lipofílico entre todos os análogos das CMTs. Em parte, a magnitude dos termos eletrostáticos é devida à carga dos ligantes (-2e) na forma totalmente ionizada que foi considerada neste estudo. A energia livre de ligação é a soma dos quatro primeiros termos da Tabela 3.12. Essas contribuições referentes a cada um desses termos estão ilustradas na Figura 3.32. Analisando a Figura 3.32 é possível observar que a energia em fase gasosa e o efeito do solvente são quase equivalentes, resultando em uma pequena energia livre de ligação.

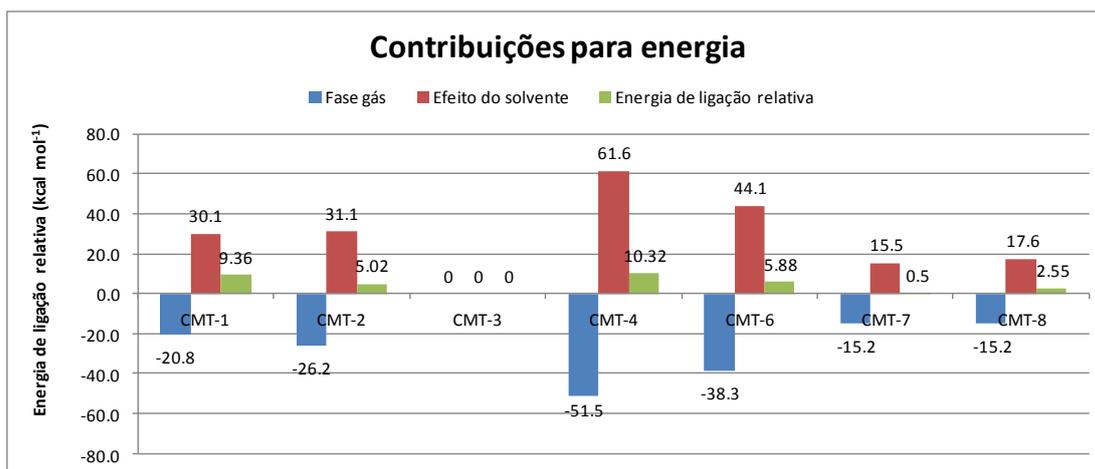
**Tabela 3.12** Contribuições para as energias de ligação calculadas usando a metodologia MM-PBSA para os complexos MMP-2:CMT-n.

Ligante	Termos de energia (kcal mol <sup>-1</sup> )								Desvio	
	CMT-1	CMT-2	CMT-3	CMT-4	CMT-6	CMT-7	CMT-8	CMT-9	CMT-10	
$\Delta E_{Ele}$	-74,1	-	-	-	-95,31	-	-	9,68	20,01	
$\Delta E_{vdw}$	-	-	-	-16,17	-11,33	-	-	2,74	2,93	
$\Delta G_{PB}$	87,28	89,14	57,67	119,1	100,57	72,55	73,73	8,99	18,67	
$\Delta G_{\text{não-polar}}$	-3,9	-4,74	-4,41	-4,12	-3,17	-3,68	-2,8	0,22	0,2	
$\Delta E_{Ele} + \Delta G_{PB}$	13,18	15,75	22,27	15,48	5,26	6,05	3,76			
$\Delta G_{lig}$	-5,76	-10,1	-	-4,8	-9,24	-	-	2,61	2,58	
<sup>a</sup> $\Delta \Delta G_{lig}$	9,36	5,02	0	10,32	5,88	0,5	2,55			

<sup>a</sup> O  $\Delta \Delta G_{lig}$  foi calculado com o complexo mais estável como referência, isto é, a CMT-3.

A partir dos valores  $\Delta G_{lig}$ , a ordem de afinidade para os três complexos mais estáveis é CMT-3 > CMT-7 > CMT-8, cujas diferenças de energia estão dentro do desvio padrão (~ 3 kcal mol<sup>-1</sup>). É interessante notar que estes complexos apresentam os menores valores de penalidade pela dessolvatação ( $\Delta G_{PB} + \Delta G_{SA}$ ), principalmente, a CMT-3, que é o análogo mais hidrofóbico entre as CMTs, em contraste com o análogo CMT-4 que é o mais hidrofílico e apresentou o maior valor para a energia de solvatação (ver Tabela 3.12). Dessa forma, além dos modos de ligação proteína-ligante discutidos anteriormente, a hidrofobicidade pode também ser uma característica molecular importante a ser considerada para a relação estrutura-atividade para as CMTs como inibidores de MMP.

Curiosamente, no estudo descrito na seção 3.1 com cálculos DFT (Marcial *et al.*, 2011), usando apenas a primeira esfera de coordenação do zinco catalítico, os complexos com a CMT-3 e com a CMT-8 foram determinados como os mais estáveis em solução aquosa no nível DFT. Este resultado está em acordo com os resultados descritos nesta seção para o sistema semelhante, mas incluindo todo esqueleto da proteína e aplicando métodos clássicos de cálculo (DM, TI e MM-PBSA).



**Figura 3.34** Contribuições relativas (calculadas tomando o análogo CMT-3 como referência) para a energia livre de Gibbs para a MMP-2 e CMT-n obtidas com cálculos MM-PBSA após calibração com TI.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Nas últimas décadas houve uma corrida por inibidores de MMPs seletivos e potentes (Nutti, Tuccinardi e Rossello, 2007). Embora tenha havido um avanço no desenho de inibidores, nenhum dos compostos da primeira e segunda geração mantiveram os resultados pré-clínicos em estudos mais avançados. A inibição terapêutica de MMPs tem sido um desafio, como é evidenciado pelo fato da doxiciclina (metastat®)(Jacobsen *et al.*), um antibiótico da metade do século XX, ser o único medicamento anti-MMP aprovado pela FDA. Por essa razão novas propostas de inibidores tendo sido alvos de estudos como alternativa às primeiras gerações de inibidores. A atividade anticolagenase das tetraciclina quimicamente modificadas foi descoberta no fim da década de 80 e desde então novos análogos foram obtidos e vêm sendo alvo de pesquisas, sobretudo como antimetastáticos, estando o análogo CMT-3 em fase II de testes clínicos. Apesar de promissoras, pouco é conhecido sobre o exato mecanismo de ação dessa classe de moléculas, o que motivou o estudo desenvolvido nesta tese.

Neste contexto, com o objetivo de contribuir com a elucidação do mecanismo de interação das tetraciclina quimicamente modificadas (CMTs) com as metaloproteinasas de matriz (MMPs), metodologias teóricas foram aplicadas através de cálculos *ab initio* para avaliar o processo de coordenação das CMTs com íon Zn(II), para isso foram utilizados dois modelos moleculares para a esfera de coordenação do metal, incluindo moléculas de água (modelo químico) e aminoácidos (modelo biológico), os quais mimetizam o sítio ativo da enzima MMP-9. O modelo químico indicou que o modo de coordenação dependia do estado de ionização do ligante. O sítio O11-O12-O1 foi mais favorável em pH alto e baixo (formas LH<sub>2</sub> e L<sup>2-</sup>), já o sítio O3-Oam-O1 foi preferido em meio neutro (forma LH<sup>-</sup>).

O modelo biológico [Zn(L)(His)<sub>3</sub>] incluía os ligantes na sua forma totalmente desprotonada (L= CMT-1, CMT-3, CMT-4, CMT-7 e CMT-8). Desse conjunto de CMTs, as mais importantes são a CMT-3, a qual tem demonstrado significativa atividade como inibidora de MMP-2 e MMP-9 e a CMT-8 que é o derivado mais próximo da doxiciclina. Para esses análogos, o sítio de coordenação VI(O11-O12) foi o mais favorável em solução aquosa (log β >15). Este resultado sugere que a CMT-3 e a CMT-8 se coordenariam mais fortemente ao sítio ativo da MMP-9 do que as outras CMTs.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grau de trigonalidade ( $\tau$ ) para o centro metálico dos complexos com CMT-8 e CMT-3 foi calculado e a geometria foi classificada como uma bipirâmide trigonal levemente destorcida ( $\tau \sim 0,8$ ). Para os outros derivados o  $\log \beta$  variou entre 9-13 quando o sítio VI foi considerado, o que sugere que a presença da hidroxila na posição C6 reduz a estabilidade do modo VI e favorece os sítios II e V. Para o ligante CMT-1 e CMT-4, os quais diferem apenas pelo grupo na posição C7, o modo II foi o mais favorável e o  $\log \beta$  foi igual a 18,3 e 23,0, respectivamente. Esses resultados ampliam a discussão de que a atividade das CMTs como inibidoras de MMPs está diretamente relacionada à sua estrutura. Nesse sentido, é fundamental uma investigação do comportamento dessas moléculas no ambiente molecular da proteína.

Na presente tese, foram combinadas as metodologias de docking molecular, simulação de dinâmica molecular e métodos de cálculo de energia para uma completa investigação da interação de diferentes CMTs com o domínio catalítico da MMP-2. Para estudar as MMPs e seus complexos, por meio do campo de força AMBER, foi proposto um novo conjunto de parâmetros para os átomos de zinco estrutural e catalítico presentes nas MMPs.

A metodologia de docking molecular foi primeiramente utilizada para caracterizar as melhores posições dos ligantes CMT-n dentro do sítio ativo da MMP-2. Os primeiros resultados mostram que as CMT-n ocupam a esfera de coordenação do íon zinco catalítico, com exceção do análogo CMT-3 que aparece no interior do bolso S1' da enzima. Este comportamento é devido, principalmente, à estrutura mais simples da CMT-3 que não tem nenhum substituinte nas posições C4, C5, C6 e C7. As alterações estruturais e energéticas das simulações de DM forneceram uma explicação para a estabilidade dos complexos formados. Os complexos MMP-2:CMT-n foram estabilizados pela interação do sítio O11-O12 do ligante com o íon zinco catalítico e ainda por ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos aminoácidos da enzima. A análise da esfera de coordenação do metal sugere uma geometria pirâmide de base quadrada para o zinco nos complexos com as CMT-1, -2, -4, -6 e -8. A CMT-3 revelou uma afinidade elevada pela MMP-2, além de interagir com íon zinco, através do sítio O11, está envolvida em contatos hidrofóbicos e interações de van der Waals com aminoácidos do bolso S' da enzima. Por fim, a análise de energia livre de ligação sugere uma maior afinidade entre o análogo CMT-3 com o sítio ativo da MMP-2, seguido pela CMT-7 e CMT-8, cuja diferença de energia varia apenas de 3 kcal mol<sup>-1</sup>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados citados acima sugerem que a coordenação ao zinco catalítico pode não ser essencial para a inibição das MMPs por CMTs, sendo que a ocupação do bolso S1' seria uma característica molecular mais importante para a resposta biológica da CMT. Esta interação com o bolso S1' já foi observada para outros inibidores de MMPs da segunda e terceira geração, os quais foram desenhados com novos substituintes para que além de coordenarem ao zinco, bloqueando o sítio ativo da enzima, também pudessem interagir com regiões de maior especificidade das MMPs. Essa capacidade de interagir com o bolso S1' faz com que os compostos sejam mais seletivos. Nesse contexto, o estudo apresentado na presente tese sugere que o análogo CMT-3 pode ser o mais ativo entre as CMTs devido a sua capacidade de interagir com região específica da MMP e com o íon zinco catalítico. Esse resultado está em acordo com experimentos que mostram que a CMT-3 é um inibidor mais potente entre as CMTs, e que parece inibir a MMP-2 de forma competitiva, ligando e bloqueando o sítio ativo diretamente, mas também pode modificar ou alterar a região do sítio ativo da MMP-2 (não competitiva).

Acreditamos ter contribuído com a proposta de empregar metodologias teóricas no estudo de processos químicos relevantes, como reações envolvendo moléculas de fármacos (CMTs) e alvos biológicos (MMPs). Em geral, podemos ressaltar que os resultados obtidos, em nível molecular, apresentados nesta tese, possam contribuir fortemente na elucidação das observações experimentais de ensaios *in vitro* e *in vivo* e no desenho de novos análogos das CMTs com maior potencial biológico. O novo conjunto de parâmetros desenvolvido para os átomos de zinco em acordo com o campo de forças AMBER pode ser usado no estudo de simulações de MMPs interagindo com diferentes inibidores. Esses parâmetros estão disponíveis na literatura para toda a comunidade acadêmica. Nosso objetivo futuro é propor novos análogos das CMTs, sobretudo da CMT-3, e investigar a interação com as gelatinases e outras MMPs com a finalidade de obter compostos potentes e seletivos, usando sempre os protocolos testados e validados nesta tese.

4.2 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

**Chemically modified tetracyclines as inhibitors of MMP-2 matrix metalloproteinase:  
A molecular and structural study**

Bruna L. Marcial, Sergio F. Sousa, Helio F. Dos Santos e Maria J. Ramos

*XXXVIII Congresso de Químicos Teóricos de Expressão Latina, 2012, Natal-RN*

**Molecular modeling study of MMP-9 matrix metalloproteinase and their chemically  
modified tetracycline inhibitors**

Bruna L. Marcial, Sergio F. Sousa, Helio F. Dos Santos e Maria J. Ramos

*IV Simpósio de estrutura eletrônica e dinâmica molecular, 2012, Pirenópolis-GO*

**Interaction of chemically modified tetracyclines with catalytic zn(II) ion in MMPs**

Bruna L. Marcial, Luis A. S. Costa, Cleber. P. A. Anconi, Wagner. B. De Almeida e Helio F. Dos Santos

*5th Theoretical Biophysics International Symposium, 2011, Ilha da Madeira-PT*

**Force field parameterization for Zn(II) present in metalloproteinases**

Bruna L. Marcial, Ingrid L. Barbosa e Helio F. Dos Santos

*XVI Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2011, Ouro Preto-MG*

**Cálculos Híbridos e simulação dinâmica molecular da CMT3 como Inibidora da  
metaloenzima MMP-9**

Bruna L. Marcial, Cleber. P. A. Anconi e Helio F. Dos Santos

*V Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2010, Petrópolis- RJ*

**Estudo teórico da estrutura e propriedades de um novo complexo de platina(II) com a  
tetraciclina quimicamente modificada denominada CMT-3**

Bruna L. Marcial, Luis A. S. Costa, Cleber. P. A. Anconi, Wagner. B. De Almeida e Helio F. Dos Santos

*23º Encontro Regional da SBQ-MG, 2009, Juiz de Fora-MG*

4.3 ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

**Structural and Dynamics Analysis of Matrix Metalloproteinases MMP-2 complexed with Chemically Modified Tetracyclines (CMTs)**

Bruna L. Marcial, Sergio F. Sousa, Helio F. Dos Santos e Maria J. Ramos

*Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (2013) submetido

**Chemically Modified Tetracyclines (CMTs) as Inhibitors of MMP-2 Matrix Metalloproteinase: A Molecular and Structural Study**

Bruna L. Marcial, Sergio F. Sousa, Ingrid L. Barbosa, Helio F. Dos Santos e Maria J. Ramos

*The Journal of Physical Chemistry B* (2012) 116: 13644-13654

**Interaction of chemically modified tetracyclines with catalytic Zn(II) ion in matrix metalloproteinase: evidence for metal coordination sites**

Bruna L. Marcial, Luis A. S. Costa, Cleber. P. A. Anconi, Wagner. B. De Almeida e Helio F. Dos Santos

*Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, & Modeling* (2011) 128:377-388

**Tetraciclina e gliciliciclina: Uma visão geral**

Elene C. P. Maia, Priscila P. Silva, Wagner B. De Almeida, Hélio F. Dos Santos, Bruna L. Marcial, Reinaldo Ruggiero e Wendell Guerra

*Química Nova* (2010) 33:700-706

**Structure and properties of the new complex of the platinum(II) with the chemically modified tetracycline CMT-3: A theoretical study,**

Bruna L. Marcial, Luis A. S. Costa, Wagner. B. De Almeida e Helio F. Dos Santos

*Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* (2009) 916: 94-104

## REFERÊNCIAS

ACHARYA, M. R. et al. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. **Drug Resistance Updates**, 2004. v. 7, n. 3, p. 195-208.

ADAMO, C.; BARONE, V. Exchange functionals with improved long-range behavior and adiabatic connection methods without adjustable parameters: The mPW and mPW1PW models. **Journal of Chemical Physics**, Jan 8 1998. v. 108, n. 2, p. 664-675.

ADDISON, A. W. et al. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper(II) Compounds Containing Nitrogen Sulfur Donor Ligands - the Crystal and Molecular-Structure of Aqua[1,7-Bis(N-Methylbenzimidazol-2'-Yl)-2,6-Dithiaheptane]Copper(II) Perchlorate. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, 1984. n. 7, p. 1349-1356.

AJAY; MURCKO, M. A. Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, Dec 22 1995. v. 38, n. 26, p. 4953-4967.

ALEKSANDROV, A.; SIMONSON, T. The tetracycline : Mg<sup>2+</sup> complex: A molecular mechanics force field. **Journal of Computational Chemistry**, 2006. v. 27, n. 13, p. 1517-1533.

\_\_\_\_\_. Molecular Mechanics Models for Tetracycline Analogs. **Journal of Computational Chemistry**, 2009. v. 30, n. 2, p. 243-255.

ALLINGER, N. L. Conformational-analysis .130. Mm2 - hydrocarbon force-field utilizing v1 and v2 torsional terms. **Journal of the American Chemical Society**, 1977 1977. v. 99, n. 25, p. 8127-8134.

AMBER10. University of California, San Francisco.: D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R.C.Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B.Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossváry, K.F.Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X.Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D.H. Mathews, M.G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, and P.A. Kollman 2008.

ANDRAE, D. et al. Energy-adjusted abinitio pseudopotentials for the 2nd and 3rd row transition-elements. **Theoretica Chimica Acta**, Apr 1990. v. 77, n. 2, p. 123-141.

AQVIST, J. Ion water interaction potentials derived from free-energy perturbation simulations. **Journal of Physical Chemistry**, Oct 18 1990. v. 94, n. 21, p. 8021-8024.

AQVIST, J.; WARSHEL, A. Free-energy relationships in metalloenzyme-catalyzed reactions - calculations of the effects of metal-ion substitutions in staphylococcal nuclease. **Journal of the American Chemical Society**, Apr 11 1990. v. 112, n. 8, p. 2860-2868.

\_\_\_\_\_. Computer-simulation of the initial proton-transfer step in human carbonic anhydrase-i. **Journal of Molecular Biology**, Mar 5 1992. v. 224, n. 1, p. 7-14.

## REFERENCIAS

- \_\_\_\_\_. Simulation of enzyme-reactions using valence-bond force-fields and other hybrid quantum-classical approaches. **Chemical Reviews**, Nov 1993. v. 93, n. 7, p. 2523-2544.
- ASLESON, G. L.; FRANK, C. W. C-13 Nuclear Magnetic-Resonance Spectral Analysis of Tetracycline Hydrochloride and Related Antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, 1975. v. 97, n. 21, p. 6246-6248.
- ATKINS, P. W.; PAULA, J. D. **Físico-Química** Rio de Janeiro: LTC, 2012. p.
- BAIROCH, A.; APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999. **Nucleic Acids Research**, Jan 1 1999. v. 27, n. 1, p. 49-54.
- BARONE, V.; COSSI, M.; TOMASI, J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. **Journal of Chemical Physics**, 1997. v. 107, n. 8, p. 3210-3221.
- BAYLY, C. I. et al. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges - the resp model. **Journal of Physical Chemistry**, Oct 7 1993. v. 97, n. 40, p. 10269-10280.
- BECKE, A. D. Density functional calculations of molecular-bond energies. **Journal of Chemical Physics**, Apr 15 1986. v. 84, n. 8, p. 4524-4529.
- \_\_\_\_\_. Correlation-energy of an inhomogeneous electron-gas - a coordinate-space model. **Journal of Chemical Physics**, Jan 15 1988a. v. 88, n. 2, p. 1053-1062.
- \_\_\_\_\_. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic-Behavior. **Physical Review A**, 1988b. v. 38, n. 6, p. 3098-3100.
- \_\_\_\_\_. A new mixing of hartree-fock and local density-functional theories. **Journal of Chemical Physics**, Jan 15 1993. v. 98, n. 2, p. 1372-1377.
- \_\_\_\_\_. Density-functional thermochemistry .4. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing. **Journal of Chemical Physics**, Jan 15 1996. v. 104, n. 3, p. 1040-1046.
- BEEMAN, D. Some multistep methods for use in molecular-dynamics calculations. **Journal of Computational Physics**, 1976 1976. v. 20, n. 2, p. 130-139.
- BOHM, H. J. Prediction of binding constants of protein ligands: A fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Jul 1998. v. 12, n. 4, p. 309-323.
- CANCES, E.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. **Journal of Chemical Physics**, 1997. v. 107, n. 8, p. 3032-3041.
- CEPERLEY, D. M.; ALDER, B. J. Ground-state of the electron-gas by a stochastic method. **Physical Review Letters**, 1980 1980. v. 45, n. 7, p. 566-569.

## REFERENCIAS

- CEPERLEY, D. M.; WHITLOCK, P. A.; KALOS, M. H. Greens-function monte-carlo method for fermions. **Bulletin of the American Physical Society**, 1979 1979. v. 24, n. 7, p. 849-849.
- CERQUEIRA, N. M. F. S. A. et al. vsLab-An Implementation for Virtual High-Throughput Screening Using AutoDock and VMD. **International Journal of Quantum Chemistry**, May 2011. v. 111, n. 6, p. 1208-1212.
- CHAKRABARTI, B. et al. An Insight to Conserved Water Molecular Dynamics of Catalytic and Structural Zn<sup>+2</sup> ions in Matrix Metalloproteinase 13 of Human. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, Feb 2011. v. 28, n. 4, p. 503-516.
- CHARIFSON, P. S. et al. Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. **Journal of Medicinal Chemistry**, Dec 16 1999. v. 42, n. 25, p. 5100-5109.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2001. v. 65, n. 2, p. 232-+.
- CIEPLAK, P. et al. Application of the multimolecule and multiconformational resp methodology to biopolymers - charge derivation for dna, rna, and proteins. **Journal of Computational Chemistry**, Nov 1995. v. 16, n. 11, p. 1357-1377.
- CLENDENINN, N. J.; APPELT, K. **Matrix Metalloproteinase inhibitors in Cancer Therapy**. Totowa: Humana Press, 2001. 262 p.
- CORNELL, W. D. et al. A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids, and organic-molecules. **Journal of the American Chemical Society**, May 17 1995. v. 117, n. 19, p. 5179-5197.
- COSSI, M. et al. New developments in the polarizable continuum model for quantum mechanical and classical calculations on molecules in solution. **Journal of Chemical Physics**, 2002. v. 117, n. 1, p. 43-54.
- COX, B. N.; LLOYD, P. Calculation of coulomb correlation energy uff for lanthanide series of rare-earth metals. **Journal of Physics F-Metal Physics**, 1975 1975. v. 5, n. 11, p. L197-L199.
- CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. Chicester, England: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. p.
- CURTISS, L. A. et al. Gaussian-3 (G3) theory for molecules containing first and second-row atoms. **Journal of Chemical Physics**, 1998. v. 109, n. 18, p. 7764-7776.
- DAURA, X.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Parametrization of aliphatic CH<sub>n</sub> united atoms of GROMOS96 force field. **Journal of Computational Chemistry**, Apr 15 1998. v. 19, n. 5, p. 535-547.

## REFERENCIAS

- DESIQUEIRA, J. M. et al. Metal-Complexes of Anhydrotetracycline .1. a Spectrometric Study of the Cu(II) and Ni(II) Complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1994. v. 83, n. 3, p. 291-295.
- DHANARAJ, V. et al. X-ray structure of gelatinase A catalytic domain complexed with a hydroxamate inhibitor. **Croatica Chemica Acta**, Sep 1999. v. 72, n. 2-3, p. 575-591.
- DIAZ, N.; SUAREZ, D. Molecular dynamics simulations of matrix metalloproteinase 2: Role of the structural metal ions. **Biochemistry**, Aug 7 2007. v. 46, n. 31, p. 8943-8952.
- DIAZ, N.; SUAREZ, D.; SORDO, T. L. Quantum chemical study on the coordination environment of the catalytic zinc ion in matrix metalloproteinases. **Journal of Physical Chemistry B**, 2006. v. 110, n. 47, p. 24222-24230.
- DITCHFIELD, R. Self-Consistent Perturbation-Theory of Diamagnetism .1. Gauge-Invariant Lcao Method for Nmr Chemical-Shifts. **Molecular Physics**, 1974. v. 27, n. 4, p. 789-807.
- DONINI, O. A. T.; KOLLMAN, P. A. Calculation and prediction of binding free energies for the matrix metalloproteinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, Nov 2 2000. v. 43, n. 22, p. 4180-4188.
- DOS SANTOS, H. F.; DE ALMEIDA, W. B.; ZERNER, M. C. Conformational analysis of the anhydrotetracycline molecule: A toxic decomposition product of tetracycline. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1998a. v. 87, n. 2, p. 190-195.
- \_\_\_\_\_. Theoretical near UV and VIS electronic spectra for the Zn-II-anhydrotetracycline complex. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2**, 1998b. n. 11, p. 2519-2525.
- DOS SANTOS, H. F. et al. Structure and properties of the 5a,6-anhydrotetracycline-platinum(II) dichloride complex: A theoretical ab initio study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2006. v. 100, n. 10, p. 1594-1605.
- DOS SANTOS, H. F. et al. The conformational and tautomeric equilibrium of 5a,6-anhydrotetracycline in aqueous solution at pH 7. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, May 2003. v. 626, p. 305-319.
- DUARTE, H. A. Chemical reactivity indexes from density functional theory: Formalism and perspectives. **Quimica Nova**, Jul-Aug 2001. v. 24, n. 4, p. 501-508.
- DUARTE, H. A. et al. Importance of tautomers in the chemical behavior of tetracyclines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1999. v. 88, n. 1, p. 111-120.
- EASTWOOD, J. W.; HOCKNEY, R. W.; LAWRENCE, D. N. P3m3dp - the 3-dimensional periodic particle-particle-particle-mesh program. **Computer Physics Communications**, 1980. v. 19, n. 2, p. 215-261.
- EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física quântica, átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas**. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1988. p.

## REFERENCIAS

ELDRIDGE, M. D. et al. Empirical scoring functions .1. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Sep 1997. v. 11, n. 5, p. 425-445.

ELKINS, P. A. et al. Structure of the C-terminally truncated human ProMMP9, a gelatin-binding matrix metalloproteinase. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, 2002. v. 58, p. 1182-1192.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh ewald method. **Journal of Chemical Physics**, Nov 15 1995. v. 103, n. 19, p. 8577-8593.

FDA. Food and Drug Administration. 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em: 24 maio. 2013.

FRISCH, M. J. et al. Gaussian 09. Wallingford - CT:Gaussian Inc, 2009.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, 1980 1980. v. 36, n. 22, p. 3219-3228.

GILSON, M. K.; HONIG, B. Calculation of the total electrostatic energy of a macromolecular system - solvation energies, binding-energies, and conformational-analysis. **Proteins-Structure Function and Genetics**, 1988 1988. v. 4, n. 1, p. 7-18.

GLASER, F. et al. The ConSurf-HSSP database: The mapping of evolutionary conservation among homologs onto PDB structures. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, Feb 15 2005. v. 58, n. 3, p. 610-617.

GOHLKE, H.; HENDLICH, M.; KLEBE, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, Jan 14 2000. v. 295, n. 2, p. 337-356.

GOLUB, L. M.; MCNAMARA, T. F.; RAMAMURTHY, N. S. A non-antibacterial chemically modified tetracycline (cmt) inhibits mammalian collagenase activity - preliminary-observations. **Journal of Dental Research**, Mar 1986. v. 65, p. 227-227.

GOLUB, L. M. et al. Tetracyclines Inhibit Connective-Tissue Breakdown - New Therapeutic Implications for an Old Family of Drugs. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, 1991. v. 2, n. 3, p. 297-322.

GREENWALD, R. A. Special Issue: Clinical Applications of Non-Antibacterial Tetracyclines Preface. **Pharmacological Research**, Feb 2011. v. 63, n. 2, p. 97-97.

GREENWALD, R. A.; GOLUB, L. M. Biologic properties of non-antibiotic, chemically modified tetracyclines (CMTs): A structured, annotated bibliography. **Current Medicinal Chemistry**, 2001. v. 8, n. 3, p. 237-242.

GRIFFIN, M. O.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. J. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: Possible mechanisms of action. **Pharmacological Research**, Feb 2011. v. 63, n. 2, p. 102-107.

## REFERENCIAS

- GU, Y. et al. Inhibition of breast cancer cell extracellular matrix degradative activity by chemically modified tetracyclines. **Annals of Medicine**, 2005. v. 37, n. 6, p. 450-460.
- GUADAGNINI, P. H.; BRUNS, R. E.; DE SOUZA, A. A. Atomic charges in molecules. **Quimica Nova**, Mar-Apr 1996. v. 19, n. 2, p. 148-155.
- GUERRA, W. et al. Three new complexes of platinum(II) with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2006. v. 17, n. 8, p. 1627-1633.
- GUMBART, J. C.; ROUX, B.; CHIPOT, C. Standard Binding Free Energies from Computer Simulations: What Is the Best Strategy? **Journal of Chemical Theory and Computation**, Jan 2013. v. 9, n. 1, p. 794-802.
- GUPTA, S. P. Quantitative structure - Activity relationship studies on zinc-containing metalloproteinase inhibitors. **Chemical Reviews**, 2007. v. 107, n. 7, p. 3042-3087.
- HAMPRECHT, F. A. et al. Development and assessment of new exchange-correlation functionals. **Journal of Chemical Physics**, Oct 15 1998. v. 109, n. 15, p. 6264-6271.
- HAY, P. J.; WADT, W. R. Abinitio Effective Core Potentials for Molecular Calculations - Potentials for the Transition-Metal Atoms Sc to Hg. **Journal of Chemical Physics**, 1985. v. 82, n. 1, p. 270-283.
- HIMO, F. Quantum chemical modeling of enzymes active sites and reaction mechanisms. **Theoretical Chemical Accounts**, 2006. v. 116, p. 232-240.
- HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, 1964 1964. v. 136, n. 3B, p. B864-&.
- HOLMES, S. et al. CMT3 alters mitochondrial function in murine osteoclast lineage cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2008. v. 365, n. 4, p. 840-845.
- HONIG, B.; NICHOLLS, A. Classical electrostatics in biology and chemistry. **Science**, May 26 1995. v. 268, n. 5214, p. 1144-1149.
- HOU, T. J.; GUO, S. L.; XU, X. J. Predictions of binding of a diverse set of ligands to gelatinase-A by a combination of molecular dynamics and continuum solvent models. **Journal of Physical Chemistry B**, May 30 2002. v. 106, n. 21, p. 5527-5535.
- HOU, T. J.; ZHANG, W.; XU, X. J. Binding affinities for a series of selective inhibitors of gelatinase-A using molecular dynamics with a linear interaction energy approach. **Journal of Physical Chemistry B**, Jun 7 2001. v. 105, n. 22, p. 5304-5315.
- HU, X.; BALAZ, S.; SHELVER, W. H. A practical approach to docking of zinc metalloproteinase inhibitors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, Mar 2004. v. 22, n. 4, p. 293-307.

## REFERENCIAS

HU, X.; SHELVER, W. H. Docking studies of matrix metalloproteinase inhibitors: zinc parameter optimization to improve the binding free energy prediction. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, Nov 2003. v. 22, n. 2, p. 115-126.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. 2013. Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 24 maio. 2013. .

ISHCHENKO, A. V.; SHAKHNOVICH, E. I. Small molecule growth 2001 (SMoG2001): An improved knowledge-based scoring function for protein-ligand interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, Jun 20 2002. v. 45, n. 13, p. 2770-2780.

ISLAM, M. M. et al. A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. **American Journal of Pathology**, 2003. v. 163, n. 4, p. 1557-1566.

JACOBSEN, J. A. et al. To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 72-94.

JANSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. New York John Wiley, 1999. 624 p.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADORIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, Nov 13 1996. v. 118, n. 45, p. 11225-11236.

JORGENSEN, W. L.; TIRADORIVES, J. The opls potential functions for proteins - energy minimizations for crystals of cyclic-peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, Mar 16 1988. v. 110, n. 6, p. 1657-1666.

JOURDEN, J. L. M.; COHEN, S. M. Enzymatic activation of a matrix metalloproteinase inhibitor. **Chemical Communications**, v. 46, n. 8, p. 1241-1243.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules (vol 9, pg 646, 2002). **Nature Structural Biology**, Oct 2002. v. 9, n. 10, p. 788-788.

KILSHTAIN, A. V.; WARSHEL, A. On the origin of the catalytic power of carboxypeptidase A and other metalloenzymes. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, Nov 15 2009. v. 77, n. 3, p. 536-550.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review**, 1965 1965. v. 140, n. 4A, p. 1133-&.

KOLLMAN, P. Free-energy calculations - applications to chemical and biochemical phenomena. **Chemical Reviews**, Nov 1993. v. 93, n. 7, p. 2395-2417.

KOLLMAN, P. A. et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. **Accounts of Chemical Research**, Dec 2000. v. 33, n. 12, p. 889-897.

## REFERENCIAS

- KOTHARI, M.; SIMON, S. R. Chemically modified tetracyclines inhibit VEGF secretion by breast cancer cell. **Cytokine**, 2006. v. 35, n. 3-4, p. 115-125.
- KRIEGER, J. B. et al. **Construction of an accurate self-interaction-corrected correlation energy functional based on an electron gas with a gap**. 1999. 463-477 p.
- KUHN, B. et al. Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, Jun 16 2005. v. 48, n. 12, p. 4040-4048.
- KUKOL, A. **Molecular Modeling of Proteins**. Totowa USA: Human Press, 2008. p.
- KUMAR, V. et al. **Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.
- KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, 1982 1982. v. 161, n. 2, p. 269-288.
- KUNZ, A.-P. E. et al. New functionalities in the GROMOS biomolecular simulation software. **Journal of Computational Chemistry**, Jan 30 2012. v. 33, n. 3, p. 340-353.
- LAMB, M. L.; JORGENSEN, W. L. Computational approaches to molecular recognition. **Current Opinion in Chemical Biology**, Dec 1997. v. 1, n. 4, p. 449-457.
- LEE, C. T.; YANG, W. T.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. **Physical Review B**, 1988. v. 37, n. 2, p. 785-789.
- LEE, H. et al. Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia. **Neurobiology of Disease**, 2009. v. 34, n. 2, p. 189-198.
- LEE, J. Y.; EVERETT, G. W. Binding of Mn(II) by Tetracycline - a C-13 Nmr Spin-Lattice Relaxation Study. **Journal of the American Chemical Society**, 1981. v. 103, n. 17, p. 5221-5225.
- LEVINE, I. **Quantum Chemistry**. New Jersey: 2000. 739 p.
- LEYPOLD, C. F. et al. How does Mg<sup>2+</sup> affect the binding of anhydrotetracycline in the TetR protein? **Photochemical & Photobiological Sciences**, 2004. v. 3, n. 1, p. 109-119.
- LI, N. G. et al. Selective Matrix Metalloproteinase Inhibitors for Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, 2009. v. 16, n. 29, p. 3805-3827.
- LIN, F.; WANG, R. Systematic Derivation of AMBER Force Field Parameters Applicable to Zinc-Containing Systems. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Jun 2010. v. 6, n. 6, p. 1852-1870.
- LINDER, D. P.; RODGERS, K. R. A theoretical study of imidazole- and thiol-based zinc binding groups relevant to inhibition of metzincins. **Journal of Physical Chemistry B**, 2004. v. 108, n. 36, p. 13839-13849.

## REFERENCIAS

- LIU, Y. et al. The lipophilicity, pharmacokinetics, and cellular uptake of different chemically-modified tetracyclines (CMTs). **Current Medicinal Chemistry**, 2001. v. 8, n. 3, p. 243-252.
- LOKESHWAR, B. L.; ESCATEL, E.; ZHU, B. Q. Cytotoxic activity and inhibition of tumor cell invasion by derivatives of a chemically modified tetracycline CMT-3 (COL-3). **Current Medicinal Chemistry**, 2001. v. 8, n. 3, p. 271-279.
- LUTY, B. A. et al. A MOLECULAR MECHANICS GRID METHOD FOR EVALUATION OF LIGAND-RECEPTOR INTERACTIONS. **Journal of Computational Chemistry**, Apr 1995. v. 16, n. 4, p. 454-464.
- M. NELSON, W. H., AND; GREENWALD, R. A. **Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine**. Switzerland: Springer Basel AG, 2001. p.
- MACHADO, F. C. et al. Metal-Complexes of Anhydrotetracycline .2. Absorption and Circular-Dichroism Study of Mg(Ii), Al(Iii), and Fe(Iii) Complexes - Possible Influence of the Mg(Ii) Complex on the Toxic Side-Effects of Tetracycline. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 1995. v. 60, n. 3, p. 163-173.
- MACKERELL, A. D. Developments in the CHARMM all-atom empirical energy function for biological molecules. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, Aug 23 1998. v. 216, p. U696-U696.
- MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **Journal of Physical Chemistry B**, Apr 30 1998. v. 102, n. 18, p. 3586-3616.
- MACKERELL, A. D.; WIORKIEWICZKUCZERA, J.; KARPLUS, M. An all-atom empirical energy function for the simulation of nucleic-acids. **Journal of the American Chemical Society**, Dec 6 1995. v. 117, n. 48, p. 11946-11975.
- MARCIAL, B. L. et al. Interaction of chemically modified tetracyclines with catalytic Zn(II) ion in matrix metalloproteinase: evidence for metal coordination sites. **Theoretical Chemistry Accounts**, Feb 2011. v. 128, n. 3, p. 377-388.
- MARCIAL, B. L. et al. Reactivity of 5a,6-Anhydrotetracycline Platinum(II) Complex with Biological Nucleophiles: a Theoretical Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2008. v. 19, n. 8, p. 1437-1449.
- \_\_\_\_\_. Structure and properties of the new complexes of platinum (II) with the chemically modified tetracycline CMT-3: A theoretical DFT study. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, 2009. v. 916, n. 1-3, p. 94-104.
- MARCIAL, B. L. et al. Chemically Modified Tetracyclines as Inhibitors of MMP-2 Matrix Metalloproteinase: A Molecular and Structural Study. **Journal of Physical Chemistry B**, Nov 22 2012. v. 116, n. 46, p. 13644-13654.
- MARTINS, S. A. et al. Computational Alanine Scanning Mutagenesis: MM-PBSA vs TI. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Mar 2013. v. 9, n. 3, p. 1311-1319.

## REFERENCIAS

- MASSOVA, I.; KOLLMAN, P. A. Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, 2000. v. 18, p. 113-135.
- MATOS, S.; BERALDO, H. Metal-Complexes of Anhydrotetracycline .3. an Absorption and Circular-Dichroism Study of the Ni(II), Cu(II) and Zn(II) Complexes in Aqueous-Solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 1995. v. 6, n. 4, p. 405-411.
- MAYROSE, I. et al. Comparison of site-specific rate-inference methods for protein sequences: Empirical Bayesian methods are superior. **Molecular Biology and Evolution**, Sep 2004. v. 21, n. 9, p. 1781-1791.
- MCQUARRIE, D. A. **Statistical Mechanics**. Sausalito, CA, U.S.A.: University Science Book, 2000. p.
- MEINDL, K.; CLARK, T. Conformations and tautomers of 5a,6-anhydrotetracycline. **Journal of Physical Chemistry B**, 2005. v. 109, n. 9, p. 4279-4284.
- MENG, E. C. et al. Evaluating docked complexes with the hint exponential function and empirical atomic hydrophobicities. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Jun 1994. v. 8, n. 3, p. 299-306.
- MIHASAN, M. What in silico molecular docking can do for the 'bench-working biologists'. **Journal of Biosciences**, Dec 2012. v. 37, n. 6, p. 1089-1095.
- MORGON, N. H.; CUSTODIO, R. The Density-Functional Theory. **Química Nova**, 1995. v. 18, n. 1, p. 44-55.
- MORGON, N. H.; KOUTINHO, K. E. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Computacional**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. 540 p.
- MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, Nov 15 1998. v. 19, n. 14, p. 1639-1662.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, Dec 30 2009. v. 30, n. 16, p. 2785-2791.
- MULLIKEN, R. S. Criteria for construction of good self-consistent-field molecular orbital wave functions, and significance of lcao-mo population analysis. **Journal of Chemical Physics**, 1962. v. 36, n. 12, p. 3428-&.
- MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, 2008. v. 29, n. 5, p. 290-308.
- MURRAY, C. W.; AUTON, T. R.; ELDRIDGE, M. D. Empirical scoring functions. II. The testing of an empirical scoring function for the prediction of ligand-receptor binding

## REFERENCIAS

affinities and the use of Bayesian regression to improve the quality of the model. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Sep 1998. v. 12, n. 5, p. 503-519.

NCI. National Cancer Institute. 2013. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/>>. Acesso em: 24 maio. 2013.

NELSON, M.; HILLEN, W.; GREENWALD, R. A. **Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine**. Boston: Birkhäuser, 2001. 336 p.

NUTI, E.; TUCCINARDI, T.; ROSSELLO, A. Matrix metalloproteinase inhibitors: New challenges in the era of post broad-spectrum inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, 2007. v. 13, n. 20, p. 2087-2100.

OELSCHLAEGER, P. et al. Magnesium-cationic dummy atom molecules enhance representation of DNA polymerase beta in molecular dynamics simulations: Improved accuracy in studies of structural features and mutational effects. **Journal of Molecular Biology**, Feb 16 2007. v. 366, n. 2, p. 687-701.

OELSCHLAEGER, P.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Modeling domino effects in enzymes: Molecular basis of the substrate specificity of the bacterial metallo-beta-lactamases IMP-1 and IMP-6. **Biochemistry**, Aug 5 2003. v. 42, n. 30, p. 8945-8956.

OTHERSEN, O. G. et al. Conformations and tautomers of tetracycline. **Journal of Physical Chemistry B**, Dec 11 2003. v. 107, n. 49, p. 13743-13749.

OTHERSEN, O. G.; LANIG, H.; CLARK, T. Systematic surface scan of the most favorable interaction sites of magnesium ions with tetracycline. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2003. v. 46, n. 26, p. 5571-5574.

\_\_\_\_\_. The structure of 5a,6-anhydrotetracycline and its Mg<sup>2+</sup> complexes in aqueous solution. **Journal of Molecular Modeling**, 2006. v. 12, n. 6, p. 953-963.

OTHERSEN, O. G. et al. SCRF-DFT and NMR comparison of tetracycline and 5a, 6-anhydrotetracycline in solution. **Journal of Physical Chemistry B**, 2006. v. 110, n. 48, p. 24766-24774.

PDB. Protein Data Bank. 2013. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/>>. Acesso em 10 maio. 2013.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Physical Review Letters**, Oct 28 1996. v. 77, n. 18, p. 3865-3868.

PERDEW, J. P.; YUE, W. Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy - generalized gradient approximation. **Physical Review B**, Jun 15 1986. v. 33, n. 12, p. 8800-8802.

PERDEW, J. P.; ZUNGER, A. Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. **Physical Review B**, 1981 1981. v. 23, n. 10, p. 5048-5079.

## REFERENCIAS

PEREZ, M. A. S.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Substrate Recognition in HIV-1 Protease: A Computational Study. **Journal of Physical Chemistry B**, Feb 25 2010. v. 114, n. 7, p. 2525-2532.

PINSUWAN, S. et al. Spectrophotometric determination of acidity constants of 4-dedimethylamino sancycline (Col-3), a new antitumor drug. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1999. v. 88, n. 5, p. 535-537.

PREWO, R.; STEZOWSKI, J. J. Chemical-Structural Properties of Tetracycline Derivatives .3. Integrity of Conformation of Non-Ionized Free Base. **Journal of the American Chemical Society**, 1977. v. 99, n. 4, p. 1117-1121.

RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T. Multiple automatic base selection: Protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Jul 1997. v. 11, n. 4, p. 369-384.

RAREY, M. et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of Molecular Biology**, Aug 23 1996. v. 261, n. 3, p. 470-489.

RASSOLOV, V. A. et al. 6-31G\*basis set for third-row atoms. **Journal of Computational Chemistry**, 2001. v. 22, n. 9, p. 976-984.

REED, A. E.; CURTISS, L. A.; WEINHOLD, F. Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. **Chemical Reviews**, Sep-Oct 1988. v. 88, n. 6, p. 899-926.

RICHARDS, C.; PANTANOWITZ, L.; DEZUBE, B. J. Antimicrobial and non-antimicrobial tetracyclines in human cancer trials. **Pharmacological Research**, Feb 2011. v. 63, n. 2, p. 151-156.

ROCCHIA, W.; ALEXOV, E.; HONIG, B. Extending the applicability of the nonlinear Poisson-Boltzmann equation: Multiple dielectric constants and multivalent ions. **Journal of Physical Chemistry B**, Jul 19 2001. v. 105, n. 28, p. 6507-6514.

ROUSELL, S. et al. Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. **Journal of Molecular Biology**, May 24 2002. v. 319, n. 1, p. 173-181.

ROY, R.; YANG, J.; MOSES, M. A. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, Nov 2009. v. 27, n. 31, p. 5287-5297.

RYAN, M. E. et al. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: Inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. **Current Medicinal Chemistry**, Feb 2001. v. 8, n. 3, p. 305-316.

RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - molecular-dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, 1977 1977. v. 23, n. 3, p. 327-341.

## REFERENCIAS

- SANDLER, C. et al. Chemically modified tetracyclines induce apoptosis in cultured mast cells. **International Immunopharmacology**, 2005. v. 5, n. 11, p. 1611-1621.
- SCHMID, N. et al. Architecture, implementation and parallelisation of the GROMOS software for biomolecular simulation. **Computer Physics Communications**, Apr 2012. v. 183, n. 4, p. 890-903.
- SCHOLZ, O. et al. Teaching TetR to recognize a new inducer. **Journal of Molecular Biology**, May 30 2003. v. 329, n. 2, p. 217-227.
- SCHREIBER, H.; STEINHAUSER, O. Taming cutoff induced artifacts in molecular-dynamics studies of solvated polypeptides - the reaction field method. **Journal of Molecular Biology**, Dec 5 1992. v. 228, n. 3, p. 909-923.
- SCOTT, W. R. P. et al. The GROMOS biomolecular simulation program package. **Journal of Physical Chemistry A**, May 13 1999. v. 103, n. 19, p. 3596-3607.
- SEFTOR, R. E. B. et al. Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, 1998. v. 16, n. 3, p. 217-225.
- SHEN, L. C. et al. Anti-invasion and anti-tumor growth effect of doxycycline treatment for human oral squamous-cell carcinoma - In vitro and in vivo studies. **Oral Oncology**, 2010. v. 46, n. 3, p. 178-184.
- SIMONSON, T. Free-energy of particle insertion - an exact analysis of the origin singularity for simple liquids. **Molecular Physics**, Oct 10 1993. v. 80, n. 2, p. 441-447.
- SIMONSON, T.; ARCHONTIS, G.; KARPLUS, M. Free energy simulations come of age: Protein-ligand recognition. **Accounts of Chemical Research**, Jun 2002. v. 35, n. 6, p. 430-437.
- SLATER, J. C. Magnetic effects and the Hartree-Fock equation. **Physical Review**, 1951 1951. v. 82, n. 4, p. 538-541.
- SOUSA, S. F. et al. Comparative Analysis of the Performance of Commonly Available Density Functionals in the Determination of Geometrical Parameters for Zinc Complexes. **Journal of Computational Chemistry**, 2009. v. 30, n. 16, p. 2752-2763.
- SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, Oct 1 2006. v. 65, n. 1, p. 15-26.
- \_\_\_\_\_. Effective tailor-made force field parameterization of the several Zn coordination environments in the puzzling FTase enzyme: opening the door to the full understanding of its elusive catalytic mechanism. **Theoretical Chemistry Accounts**, Jan 2007. v. 117, n. 1, p. 171-181.
- SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. General performance of density functionals. **Journal of Physical Chemistry A**, 2007. v. 111, n. 42, p. 10439-10452.

## REFERENCIAS

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Enzyme flexibility and the catalytic mechanism of farnesyltransferase: Targeting the relation. **Journal of Physical Chemistry B**, Jul 24 2008a. v. 112, n. 29, p. 8681-8691.

\_\_\_\_\_. Molecular dynamics analysis of farnesyltransferase: A closer look into the amino acid behavior. **International Journal of Quantum Chemistry**, Sep 2008b. v. 108, n. 11, p. 1939-1950.

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Molecular dynamics simulations on the critical states of the farnesyltransferase enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, May 1 2009. v. 17, n. 9, p. 3369-3378.

SOUSA, S. F. et al. The Zinc proteome: a tale of stability and functionality. **Dalton Transactions**, 2009. n. 38, p. 7946-7956.

SRINIVASAN, J. et al. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate - DNA helices. **Journal of the American Chemical Society**, Sep 23 1998. v. 120, n. 37, p. 9401-9409.

STEINBRECHER, T.; LABAHN, A. Towards Accurate Free Energy Calculations in Ligand Protein-Binding Studies. **Current Medicinal Chemistry**, Mar 2010. v. 17, n. 8, p. 767-785.

STEZOWSKI, J. J. Chemical-Structural Properties of Tetracycline Derivatives .1. Molecular-Structure and Conformation of Free Base Derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, 1976. v. 98, n. 19, p. 6012-6018.

STOTE, R. H.; KARPLUS, M. Zinc-binding in proteins and solution - a simple but accurate nonbonded representation. **Proteins-Structure Function and Genetics**, Sep 1995. v. 23, n. 1, p. 12-31.

STOUTEN, P. F. W. et al. An effective solvation term based on atomic occupancies for use in protein simulations. **Molecular Simulation**, 1993 1993. v. 10, n. 2-6, p. 97-&.

STRAATSMA, T. P.; MCCAMMON, J. A. Computational alchemy. **Annual Review of Physical Chemistry**, 1992 1992. v. 43, p. 407-435.

SUAREZ, D.; BROTHERS, E. N.; MERZ, K. M. Insights into the structure and dynamics of the dinuclear zinc beta-lactamase site from *Bacteroides fragilis*. **Biochemistry**, May 28 2002. v. 41, n. 21, p. 6615-6630.

SWANSON, J. M. J.; HENCHMAN, R. H.; MCCAMMON, J. A. Revisiting free energy calculations: A theoretical connection to MM/PBSA and direct calculation of the association free energy. **Biophysical Journal**, Jan 2004. v. 86, n. 1, p. 67-74.

SZABO, A. O., N. . **Modern Quantum Chemistry - Introduction to Advanced Electronic Structure Theory** New York: Dover Pubs., 1996. 481 p.

TAMAMES, B. et al. Analysis of zinc-ligand bond lengths in metalloproteins: Trends and patterns. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, 2007. v. 69, p. 466-475.

## REFERENCIAS

- TANNOR, D. J. et al. Accurate first principles calculation of molecular charge-distributions and solvation energies from ab-initio quantum-mechanics and continuum dielectric theory. **Journal of the American Chemical Society**, Dec 28 1994. v. 116, n. 26, p. 11875-11882.
- TIRONI, I. G. et al. A generalized reaction field method for molecular-dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**, Apr 1 1995. v. 102, n. 13, p. 5451-5459.
- TOCHOWICZ, A. et al. Crystal structures of MMP-9 complexes with five inhibitors: Contribution of the flexible arg424 side-chain to selectivity. **Journal of Molecular Biology**, 2007. v. 371, n. 4, p. 989-1006.
- TU, G. G. et al. Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, 2008. v. 15, n. 14, p. 1388-1395.
- TUCCINARDI, T. et al. Amber force field implementation, molecular modelling study, synthesis and MMP-1/MMP-2 inhibition profile of (R)and (S)-N-hydroxy-2-(N-isopropoxybiphenyl-4-ylsulfonamido)-3-methylbutanamid es. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2006. v. 14, n. 12, p. 4260-4276.
- VALENTE, M. et al. Dehydration of a polyether type extraction agent and of the corresponding K<sup>+</sup> complex: insights into liquid-liquid extraction mechanisms by quantum chemical methods. **Journal of Molecular Modeling**, Nov 2012. v. 18, n. 11, p. 4909-4915.
- VALLEE, B. L.; AULD, D. S. Active-site zinc ligands and activated h<sub>2</sub>o of zinc enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Jan 1990. v. 87, n. 1, p. 220-224.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; DAURA, X.; MARK, A. E. Computation of free energy. **Helvetica Chimica Acta**, 2002 2002. v. 85, n. 10, p. 3113-3129.
- VERLET, L. Computer experiments on classical fluids .i. Thermodynamical properties of lennard-jones molecules. **Physical Review**, 1967 1967. v. 159, n. 1, p. 98-&.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: John Wiley 1995. 1361 p.
- VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin-density calculations - a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, 1980 1980. v. 58, n. 8, p. 1200-1211.
- WANG, J. M. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, Jul 15 2004. v. 25, n. 9, p. 1157-1174.
- \_\_\_\_\_. Development and testing of a general amber force field (vol 25, pg 1157, 2004). **Journal of Computational Chemistry**, Jan 15 2005. v. 26, n. 1, p. 114-114.
- WANG, R. X.; LAI, L. H.; WANG, S. M. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Jan 2002. v. 16, n. 1, p. 11-26.

## REFERENCIAS

- WANG, W. et al. Biomolecular simulations: Recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 2001 2001. v. 30, p. 211-243.
- WARSHHEL, A. Molecular dynamics simulations of biological reactions. **Accounts of Chemical Research**, Jun 2002. v. 35, n. 6, p. 385-395.
- WARWICKER, J.; WATSON, H. C. Calculation of the electric-potential in the active-site cleft due to alpha-helix dipoles. **Journal of Molecular Biology**, 1982 1982. v. 157, n. 4, p. 671-679.
- WEINER, S. J. et al. A new force-field for molecular mechanical simulation of nucleic-acids and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, 1984 1984. v. 106, n. 3, p. 765-784.
- WESSELS, J. M. et al. The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>: A spectroscopic study. **Journal of Physical Chemistry B**, 1998. v. 102, n. 46, p. 9323-9331.
- WHEELER, D. L. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, Jan 1 2005. v. 33, p. D39-D45.
- WIBERG, K. B. Application of the couple-santry-segan CNDO method to the cyclopropylcarbinyl and cyclobutyl Cation and to bicyclobutano. **Tetrahedron** 1968. v. 24, p. 1083-196.
- YAO, L. S. et al. A molecular dynamics exploration of the catalytic mechanism of yeast cytosine deaminase. **Journal of Physical Chemistry B**, Apr 21 2005. v. 109, n. 15, p. 7500-7510.
- YORK, D. M. et al. Toward the accurate modeling of dna - the importance of long-range electrostatics. **Journal of the American Chemical Society**, May 3 1995. v. 117, n. 17, p. 5001-5002.
- ZHANG, W. et al. Binding affinity of hydroxamate inhibitors of matrix metalloproteinase-2. **Journal of Molecular Modeling**, Apr 2004. v. 10, n. 2, p. 112-120.
- ZHAO, Y.; SCHULTZ, N. E.; TRUHLAR, D. G. Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Mar-Apr 2006. v. 2, n. 2, p. 364-382.
- ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. Hybrid meta density functional theory methods for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions: The MPW1B95 and MPWB1K models and comparative assessments for hydrogen bonding and van der Waals interactions. **Journal of Physical Chemistry A**, Aug 19 2004. v. 108, n. 33, p. 6908-6918.

## REFERENCIAS

\_\_\_\_\_. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functional and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. **Theoretical chemical accounts**, 2008. v. 120, p. 215-241.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. **Theoretical Chemistry Accounts**, May 2008. v. 120, n. 1-3, p. 215-241.

ZIEGLER, T. Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics. **Chemical Reviews**, Jul-Aug 1991. v. 91, n. 5, p. 651-667.

ZIMMER, M. Bioinorganic molecular mechanics. **Chemical Reviews**, Dec 1995. v. 95, n. 8, p. 2629-2649.

ZWANZIG, R. W. High-temperature equation of state by a perturbation method .1. Nonpolar gases. **Journal of Chemical Physics**, 1954 1954. v. 22, n. 8, p. 1420-1426.