

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HELEN NATHALIA THOMPSON

***INVESTIGAÇÃO COMPUTACIONAL DAS DOENÇAS PRIÔNICAS:
INFLUÊNCIA DOS CAMPOS DE FORÇA E DOS ESTADOS DE PROTONAÇÃO NA
CONVERSÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR.***

Tese de Doutorado

Porto Alegre
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HELEN NATHALIA THOMPSON

***INVESTIGAÇÃO COMPUTACIONAL DAS DOENÇAS PRIÔNICAS:
INFLUÊNCIA DOS CAMPOS DE FORÇA E DOS ESTADOS DE PROTONAÇÃO NA
CONVERSÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA PRÍON CELULAR.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química.

Prof. Dr. Hubert Karl Stassen
Orientador

Prof. Dr. Laurent Emmanuel Dardenne
Coorientador (LNCC)

Porto Alegre, agosto de 2018.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre agosto de 2012 e agosto de 2018, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Hubert Karl Stassen e Co-orientação do Professor Doutor Laurent Emmanuel Dardenne. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Paolo Roberto Livotto

Prof. Dr. Maximiliano Segala

Prof. Dr. Luís Fernando Saraiva
Timmers

Prof^a. Dr^a Leandra Franciscato
Campo

Hubert Karl Stassen
Prof. Dr. Orientador

Laurent Emmanuel Dardenne
Prof. Dr. Co-orientador

Helen Nathalia Thompson
Aluno

*Dedico esta tese de doutorado
aos meus pais, irmãos e ao meu marido,
Thiago Posser.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Dr. Hubert K. Stassen, por todo o apoio ao longo da minha jornada na pós-graduação em química da UFRGS.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Laurent E. Dardenne, pelas valiosas discussões sobre a tese.

Ao professor Dr. Paulo Augusto Netz pelo auxílio na discussão dos resultados.

Aos colegas de laboratório, pelo conhecimento compartilhado. Em especial, à Vanessa Petry do Canto pelo apoio nas madrugadas de redação da tese.

A Daniela e ao Vinícius pelo apoio inestimável nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, por me servir de inspiração profissional e por sempre ter incentivado os meus estudos.

A minha mãe, eterno porto seguro.

Aos meus irmãos, familiares e amigos pela lealdade e suporte nos momentos difíceis.

Ao meu marido, Thiago, que me acompanha desde os primeiros anos da graduação, pelos constantes amor, incentivo e compreensão.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Muito obrigada!

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein (1879-1955)

Lista de Trabalhos gerados a partir dessa Tese

Resumos publicados em anais de congressos:

1. **THOMPSON, H. N. ; Thompson, Claudia Elizabeth ; Dardenne, L. E. ; Netz, P. A. ; Caceres, Rafael de Andrade; Stassen, H. K. ;** Descobrimo a estrutura tridimensional de Prions; I CINA – Congresso Internacional sobre Nanotecnologia & IV Simpósio sobre Nanotecnologia e suas Aplicações; 2016.
2. **THOMPSON, H. N. ; Thompson, Claudia Elizabeth ; Dardenne, L. E. ; Netz, P. A. ; STASSEN, H. K.** Prion Protein Conversion Triggered by Acidic Condition: an Investigation Through Multiple Molecular Dynamic Simulations. In: VIII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2016, Petrópolis, RJ. Anais da VIII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos. Petrópolis, RJ, 2016.
3. **THOMPSON, H. N.; Dardenne, L. E.; Netz, P. A.; Stassen, H.;** Comparison between SPME and GRF Methods for simulations of Prion Protein Fragments; 10 Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists – WATOC 2014.
4. **THOMPSON, H. N.; Netz, P. A; Stassen, H.** The Long-range Electrostatic Interactions in the Process of Conformational Conversion of Cellular Prion Protein. XVII Simpósio Brasileiro de Química Teórica. 2013.
5. **THOMPSON, H. N. ; Netz, P. A; Stassen, H.** Structural Changes in Cellular Prion Protein Simulated at Low pH. XXXVIII Congress of Theoretical Chemists of Latin Expression. 2012.
6. **THOMPSON, H. N.; Netz, P. A; Stassen, H.** Influence of Protonation States of Histidine Residues in the Process of Conformational Conversion of Cellular Prion Protein. VI Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem. 2012.
7. **THOMPSON, H. N.; Netz, P. A; Stassen, H.** Mudanças Estruturais na Proteína Prion Celular Induzidas por Alteração de pH. V Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 2010, Petrópolis. Anais da V EMMSB, 2012.

Artigos aceitos para publicação:

Prion Protein conversion triggered by Acidic Condition: a Molecular Dynamics study through different Force Fields; Helen Nathalia Thompson^{1*}; Claudia Elizabeth Thompson²; Rafael de Andrade Caceres³; Laurent Emmanuel Dardenne⁴; Paulo Augusto Netz¹; Hubert Karl Stassen¹, Journal of Computational Chemistry.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Príons	4
3.1.1 Histórico e incidência das doenças priônicas	4
3.1.2 Encefalopatias espongiformes transmissíveis.....	7
3.1.3 Estrutura e regulação do gene Prnp	10
3.1.4 Distribuição de PrP ^C	12
3.1.5 Estrutura de PrP ^C	14
3.1.6 Funções de PrP ^C	17
3.1.7 PrP ^C x PrP ^{Sc}	19
3.1.8 Mecanismos de conversão estrutural	20
3.1.9 Conexão com outras desordens neurodegenerativas.....	22
3.1.10 Modelos de PrP ^{Sc}	23
3.2 Estados de Protonação – PROPKA.....	27
3.3 Dinâmica Molecular.....	29
3.3.1 Da representação quântica à clássica.....	30
3.3.2 Ensemble e ergodicidade	31
3.3.3 Equações de Movimento.....	33
3.3.4 Campos de Força	35
3.3.4.1 CHARMM27	37
3.3.4.2 AMBER.....	38
3.3.4.3 OPLS.....	40

3.3.4.4	GROMOS.....	40
3.3.4.5	Comparação dos Campos de Força	42
4.	METODOLOGIA	45
4.1	Bancos de dados	45
4.2	Protocolo de Simulação	45
4.3	Análises	47
4.3.1	Análise estrutural de proteínas	48
4.3.2	Análise de componentes principais (PCA).....	49
4.3.3	Superfície de energia livre	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Influência dos Campos de Força	52
5.1.1	Avaliação geral de todos os campos de força	52
5.1.1.1	Estabilidade das simulações e análises de componentes principais	53
5.1.1.2	Evolução de estruturas secundárias.....	56
5.1.1.3	Número de resíduos em estruturas secundárias	63
5.1.1.4	Ligações de hidrogênio.....	65
5.1.1.5	Flexibilidade de resíduos de aminoácidos	70
5.1.2	Análises adicionais para os campos de força selecionados	71
5.1.2.1	Estabilidade das simulações.....	72
5.1.2.2	Número de resíduos em estruturas secundárias	74
5.1.2.3	Superfície de energia livre.....	76
5.1.2.4	Ligações de hidrogênio.....	77
5.1.2.5	Direcionalidade da cauda N-terminal	81
5.1.2.6	Estruturas representativas das simulações.....	82

5.1.3	Discussão Parcial.....	84
5.2	Retorno ao pH neutro	87
5.2.1	Estabilidade das simulações e análise de componentes principais.....	88
5.2.2	Evolução de estruturas secundárias.....	91
5.2.3	Número de resíduos em estruturas secundárias.....	93
5.2.4	Ligações de hidrogênio	94
5.2.5	Flexibilidade de resíduos de aminoácidos	95
5.2.6	Direcionalidade da cauda N-terminal.....	97
5.2.7	Discussão Parcial.....	99
6.	CONCLUSÕES.....	101
7.	PERSPECTIVAS	103
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
9.	ANEXOS.....	115
9.1	Anexo A1: Função de energia do campo de força AMBER.....	115
9.2	Anexo A2: Função de energia do campo de força OPLS.....	116
9.3	Anexo A3: Função de energia do campo de força CHARMM27.....	117
9.4	Anexo A4: Definição de estruturas secundárias.....	118
10.	APÊNDICES	120
10.1	Apêndice A1: Média e desvio padrão de RMSD de $C\alpha$ entre as cinco réplicas para cada um dos campos de força entre 90 e 100 ns de simulação.....	120
10.2	Apêndice A2: RMSD de $C\alpha$ para o fragmento proteico N-terminal (109-143) ao longo do tempo de simulação.....	123
10.3	Apêndice A3: RMSD de $C\alpha$ para o fragmento proteico C-terminal (144-219) ao longo do tempo de simulação.....	124
10.4	Apêndice A4: Análise de componentes principais para o campo de força GROMOS96 53a6.....	125

10.5	Apêndice A5: Análise de componentes principais para o campo de força AMBER99SB.....	126
10.6	Apêndice A6: Análise de componentes principais para o campo de força GROMOS96 43a1.....	127
10.7	Apêndice A7: Análise de componentes principais para o campo de força AMBER99SB-ILDN.....	128
10.8	Apêndice A8: Análise de componentes principais para o campo de força OPLS-AA/L.....	129
10.9	Apêndice A9: Análise de componentes principais para o campo de força CHARMM27.....	130
10.10	Apêndice A10: RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força GROMOS96 53a6.....	131
10.11	Apêndice A11: RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força AMBER99SB.....	132
10.12	Apêndice A12: RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força GROMOS96 43a1.....	133
10.13	Apêndice A13: RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força AMBER99SB-ILDN.....	134
10.14	Apêndice A14: RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força OPLS-AA/L.....	135
10.15	Apêndice A15: RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força CHARMM27.....	136
10.16	Apêndice A16: Projeção bidimensional da superfície de energia livre.....	137
10.17	Apêndice A17: RMSD de C α para o fragmento N-terminal (109-143) ao longo do tempo de simulação.....	138
10.18	Apêndice A18: RMSD de C α para o fragmento C-terminal (144-219) ao longo do tempo de simulação.....	139

Lista de Figuras

Figura 1: Quatro pessoas afetadas por Kuru (uma doença priônica), mantidas de pé com o auxílio de estacas de madeira.	4
Figura 2: Incidência da doença da vaca louca (EEB) no Reino Unido e em países da União Europeia e fora dela, incluindo Canadá, Israel, Liechtenstein, Japão, Suíça e Estados Unidos.	5
Figura 3: Incidência da doença de <i>Creutzfeldt-Jakob</i> no Brasil entre 2005 e 2013	6
Figura 4: Incidência da doença de <i>Creutzfeldt-Jakob</i> por faixa etária no Brasil entre 2005 e 2013.	7
Figura 5: Características histopatológicas dos três principais subtipos de doenças genéticas de príons.	9
Figura 6: Estrutura do gene <i>Prnp</i> : domínios regulatórios da região promotora, localização (pode variar conforme espécie) dos elementos responsáveis dentro do gene e fatores de transcrição (MTF-1, Oct-1, NGF1-B, MEF-2, NFAT-1, AhR, MRE e HSE).	12
Figura 7: Imuno-histoquímica PrP usando o anticorpo monoclonal 3F4.	14
Figura 8: A) Estrutura primária da proteína PrP ^C de camundongo. B) PrP ^C ancorada em membrana via GPI.	15
Figura 9: Relação evolutiva entre espécies vertebradas baseada na sequência primária de PrP ^C	17
Figura 10: Diferenças esquemáticas entre as estruturas terciárias de PrP ^C (predita por RMN) e PrP ^{Sc}	20
Figura 11: Modelos de mecanismos de formação de PrP-res: A) modelo heterodímero; B) modelo de polimerização dependente de semente de nucleação (catalítico ou não catalítico).	21
Figura 12: Modelos propostos para a estrutura de PrP ^{Sc} . A) Modelo de folhas- β estendidas; B) Modelo β -hélice; C) Modelo β -espiral. Para facilitar a comparação, a mesma atribuição de cores para motivos estruturais foi usada em todas as imagens	25
Figura 13: Ciclagem constitutiva da proteína príon celular passando por diferentes condições de pH	26
Figura 14: Curva de titulação, indicando os valores de pK _a dos grupos α -amino e α -carboxílico e o pK _a do grupo ionizável da cadeia lateral para o aminoácido histidina.	27
Figura 15: Escalas de tempo envolvidas na simulação de sistemas químicos e biológicos. ..	29
Figura 16: Espaço de fases sendo percorrido numa simulação de dinâmica molecular	32
Figura 17: Fluxograma simplificado de uma típica simulação de dinâmica molecular	34

Figura 18: Proteína príon celular do hamster Sírio (PDB ID: 2PrP): A) Sequência primária; B) Estrutura terciária, destacando-se: fitas- β e três α -hélices (HA, HB e HC).....	45
Figura 19: Relação angular (ângulo α) entre o acceptor de hidrogênio (A), o doador de hidrogênio (D) e o átomo de hidrogênio (H).....	48
Figura 20: Ciclagem constitutiva da proteína príon celular passando por diferentes condições de pH.....	52
Figura 21: RMSD de C_{α} , para o fragmento proteico inteiro (109-219), ao longo do tempo de simulação.....	54
Figura 22: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força GROMOS96 53a6.....	57
Figura 23: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força AMBER99SB.....	58
Figura 24: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força GROMOS96 43a1.....	59
Figura 25: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força AMBER99SB-ILDN.....	60
Figura 26: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força OPLS-AA/L.....	61
Figura 27: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força CHARMM27.....	62
Figura 28: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de resíduos de aminoácidos envolvidos em folhas- β entre 90 e 100 ns de simulação para o fragmento 109-219.	64
Figura 29: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de resíduos de aminoácidos envolvidos em α -hélices entre 90 e 100 ns de simulação para o fragmento 109-219.....	64
Figura 30: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intermoleculares, calculados para os últimos 10 ns de simulação para o fragmento 109-219... ..	65
Figura 31: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares totais para o fragmento 109-219, calculados para os últimos 10 ns de simulação.....	66

Figura 32: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal para o fragmento 109-219, calculados para os últimos 10 ns de simulação.	67
Figura 33: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal para o fragmento 144-219, calculados para os últimos 10 ns de simulação.	68
Figura 34: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal para o fragmento 109-143, calculados para os últimos 10 ns de simulação.	69
Figura 35: RMSF de C α para o intervalo de 0 a 100 ns de simulação para o fragmento 109-219.	71
Figura 36: RMSD de C α em função do tempo de simulação.	73
Figura 37: Número de resíduos de aminoácidos por estrutura secundária em função do tempo de simulação (obtido pelo programa DSSP).	75
Figura 38: Superfície de energia livre.	76
Figura 39: Distância entre os átomos de oxigênio e hidrogênio dos resíduos de aminoácidos MET129 e TYR163 ao longo do tempo de simulação.	78
Figura 40: Distância entre os átomos de oxigênio e hidrogênio dos resíduos de aminoácidos GLY131 e MET161 ao longo do tempo de simulação.	79
Figura 41: Distância entre os átomos de C α do resíduo MET109 e as extremidades N-terminal (ASN172, curvas pretas) e C-terminal (THR193, curvas vermelhas) da α -hélice HB ao longo das simulações.	82
Figura 42: Imagens das estruturas tridimensionais dos instantes de tempo correspondentes a 0 e 100 ns e do cluster representativo de cada uma das simulações para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB	83
Figura 43: Ciclagem constitutiva da proteína príon celular passando por diferentes condições de pH.	87
Figura 44: RMSD de C α para o fragmento proteico inteiro (109-219) ao longo do tempo de simulação.	88
Figura 45: Análise de componentes principais.	90
Figura 46: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força GROMOS96 53a6.	91
Figura 47: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força AMBER99SB.	92

Figura 48: Média e desvio padrão do número de resíduos em A) α -hélices; B) folhas- β	93
Figura 49: RMSF de C α para o campo de força GROMOS96 53a6 para intervalos de tempo específicos.....	96
Figura 50: RMSF de C α para o campo de força AMBER99SB para intervalos de tempo específicos.....	97
Figura 51: Distância entre os átomos de C α do resíduo MET109 e as extremidades N-terminal (ASN172) e C-terminal (THR193) da α -hélice HB ao longo das simulações.....	98

Lista de Tabelas

Tabela 1: Doenças priônicas em humanos e animais.....	8
Tabela 2: Mutações somáticas e hereditárias relacionadas a doenças priônicas.....	10
Tabela 3: Distribuição da proteína príon celular detectadas em diferentes órgãos do corpo humano	13
Tabela 4: Estruturas tridimensionais para a proteína príon celular para diferentes organismos, incluindo alguns fragmentos peptídicos.....	16
Tabela 5: As principais propriedades bioquímicas de PrP ^C e PrP ^{Sc}	19
Tabela 6: Doenças potencialmente associadas à formação de agregados proteicos.....	23
Tabela 7: Níveis de resolução na modelagem de sistemas biomoleculares	30
Tabela 8: Média e desvio padrão de RMSD de C α entre as cinco réplicas para cada um dos campos de força entre 90 e 100 ns de simulação.....	54
Tabela 9: Ligações de hidrogênio da cadeia principal envolvendo contatos de folhas- β para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB em condição neutra e ácida.....	73
Tabela 10: Média e desvio padrão de RMSD de C α entre as cinco réplicas para cada um dos campos de força entre 90 e 100 ns de simulação.....	89
Tabela 11: Média e desvio padrão do número de ligações de hidrogênio.....	95

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMBER	Campo de força ou pacote de programas de simulação.
BSE	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i> , do inglês; ou encefalopatia espongiforme bovina ou doença de vaca louca.
CHARMM27	Campo de força ou pacote de programas de simulação; do inglês, <i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i> .
CJD	<i>Creutzfeldt-Jakob Disease</i> , do inglês; ou doença de Creutzfeldt-Jakob.
CWD	<i>Chronic Wasting Disease</i> , do inglês; ou doença crônica debilitante.
DC	Dicroísmo Circular.
DM	Dinâmica Molecular.
EET	Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis.
FFI	<i>Fatal Familial Insomnia</i> , do inglês; ou insônia familiar fatal.
FTIV	Infra-Vermelho com Transformada de Fourier.
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GROMOS	Campo de força; do inglês, <i>GRoningen MOlecular Simulation</i> .
GSS	<i>Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease</i> , do inglês; ou doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.
OPLS	Campo de força; do inglês, <i>Optimized Parameters for Liquid State Simulations</i> .
pH	Potencial hidrogeniônico.
pKa	Potencial de dissociação de um ácido; tendência de um grupo de fornecer prótons.
PRION	<i>PRoteinaceous Infectious ONly Particle</i> .
PrP 27-30	Fragmento proteico (resíduos de aminoácidos 90-231) de PrP.
PrP^C	Proteína Príon Celular.
PrP-res	Proteína Príon resistente a proteases.
PrP^{Sc}	Proteína Príon anormal. Sc significa <i>scrapie</i> .
PrP-sen	Proteína Príon Celular sensível a proteases.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear.

Resumo

Príons são proteínas que causam um grupo de doenças neurodegenerativas invariavelmente fatais, sendo uma das mais conhecidas a encefalopatia espongiforme bovina (ou doença da vaca louca). A proteína príon celular (PrP^c), rica em estrutura α -helicoidal, sofre uma mudança na sua estrutura secundária produzindo a proteína patológica (PrP^{Sc}; o príon) na qual prevalecem folhas- β . Devido à falta de dados estruturais de alta resolução dos príons, simulações de dinâmica molecular (DM) podem ser particularmente úteis para estudar o redobramento de PrP. Estudos experimentais e computacionais, descritos na literatura, indicam que a utilização de pH ácido é capaz de criar certa instabilidade estrutural, produzindo um ganho de estrutura- β na região N-terminal antes desestruturada.

Este trabalho se propõe a investigar computacionalmente as mudanças estruturais na proteína príon celular do hamster Sírio induzidas por alteração de pH. Para isso, foi avaliada a influência de diferentes campos de força (GROMOS96 53a6, GROMOS96 43a1, AMBER99SB, AMBER99SB-ILDN, CHARMM27 e OPLS) simulados para as condições de pH neutro e ácido. A partir das análises, observou-se uma forte dependência dos resultados com o campo de força empregado. Além disso, somente os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB demonstraram tendência à expansão do núcleo de folhas- β na região N-terminal da proteína simulada sob pH ácido e conseguiram representar adequadamente a condição neutra. As estruturas correspondentes a esses campos de força em pH ácido, foram, então, utilizadas como ponto de partida para novas simulações de DM em pH neutro (pH 7,4). Essa situação de retorno ao pH neutro ocorre quando o príon sai do compartimento endossomal (submetido a pH ácido) e retorna à superfície externa celular (onde estaria submetida novamente a pH neutro). Os resultados desse estudo de retorno ao pH neutro apontaram para a não reversibilidade de PrP^{Sc}, com a manutenção da cauda N-terminal voltada para a extremidade N-terminal da α -hélice HB.

Palavras-chave: Príon; Simulações de Dinâmica Molecular; Campos de força; pH.

Abstract

Prions are proteins that cause a group of invariably fatal neurodegenerative diseases, one of the most known being bovine spongiform encephalopathy (or mad cow disease). The cellular prion protein (PrP^{C}), rich in α -helical structure, undergoes a change in its secondary structure producing the pathological protein (PrP^{Sc} ; the prion) in which β -sheet prevails. Due to the lack of high resolution structural data of the prions, molecular dynamics simulations (MD) may be particularly useful to study the refolding of PrP. Experimental and computational studies, described in the literature, indicate that the use of acidic pH is capable to create some structural instability, producing a gain of β -structure in the previously unstructured N-terminal region.

This work proposes to investigate computationally the structural changes in the cellular prion protein of the Syrian hamster induced by pH change. For this, the influence of different force fields (GROMOS96 53a6, GROMOS96 43a1, AMBER99SB, AMBER99SB-ILDN, CHARMM27 and OPLS) were evaluated for neutral and acid pH conditions. From the analysis, a strong dependence of the results with the force field was observed. In addition, only the GROMOS96 53a6 and AMBER99SB force fields showed a tendency to expand the β -sheet nucleus in the N-terminal region of the simulated protein under acid pH and were able to adequately represent the neutral condition. The structures corresponding to these force fields under acidic pH were then used as the starting point for new MD simulations under neutral pH. This situation of return to the neutral pH occurs when the prion leaves the endosomal compartment (submitted to acid pH) and returns to the external cellular surface (where it would be submitted again to neutral pH). The results of this neutral pH return study pointed to the non-reversibility of PrP^{Sc} , with the maintenance of the N-terminal tail facing the N-terminal end of the α -helix HB.

Keywords: molecular dynamics; force fields; pH; prion; secondary structure.

1. INTRODUÇÃO

Príons (*PR*oteinaceous *I*nfectious *ON*ly *P*article) são proteínas infecciosas relacionadas a um grupo de doenças neurodegenerativas invariavelmente fatais que afetam seres humanos e animais (sendo uma das mais conhecidas, a doença da vaca louca).¹ Acredita-se que a proteína príon celular (PrP^{C}), rica em estrutura α -helicoidal, sofra uma mudança conformacional que resulta na proteína patológica (PrP^{Sc} ; o príon, cuja estrutura terciária ainda não foi experimentalmente resolvida), rica em folhas- β . Assim, as isoformas PrP^{C} e PrP^{Sc} apresentam a mesma sequência de aminoácidos, mas com diferentes conteúdos de estruturas secundárias e terciárias. Estudos realizados na última década têm indicado que os mecanismos celulares e moleculares de inúmeras desordens neurodegenerativas (como Alzheimer, Parkinson e Huntington) são semelhantes àqueles que originam as doenças priônicas.²

Uma vez que ambas as isoformas PrP são quimicamente indistinguíveis, acredita-se que uma conversão conformacional de PrP^{C} desencadeie a geração de PrP^{Sc} .³ Dentre os modelos cinéticos que descrevem essa conversão, um dos mais aceitos sugere um equilíbrio rápido entre as isoformas monoméricas. Neste modelo, a etapa limitante de reação seria a formação de um oligômero de PrP^{Sc} , que poderia atuar como um núcleo para posterior conversão de PrP^{C} e crescimento de oligômeros, resultando na formação de placas amilóides no espaço extracelular de neurônios.⁴

Entre os fatores que influenciam a conversão conformacional, condições celulares como a composição da membrana lipídica, a ligação a íons metálicos, interação com proteínas chaperonas e estresse oxidativo parecem desempenhar um papel importante na formação de PrP^{Sc} .⁵⁻⁹ Além disso, organelas endocíticas são relatadas como possíveis locais para a conversão de PrP^{C} . Experimentalmente, o pH ácido endossomal é comumente usado para induzir conversão estrutural de PrP^{C} em PrP^{Sc} .¹⁰⁻¹² Com base nesses resultados, inúmeros trabalhos empregando métodos computacionais têm sido realizados para investigar a influência do pH na conversão conformacional da proteína príon celular.¹³⁻¹⁷

De maneira geral, a caracterização de propriedades conformacionais de proteínas em nível atômico é um grande desafio e torna-se particularmente difícil quando trata-se do processo de conversão $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$. Neste contexto, as simulações computacionais via dinâmica molecular (DM) apresentam-se como uma alternativa viável para este tipo de investigação.¹³ Como o processo de conversão $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ é associado com substancial alteração conformacional e não envolve reações químicas, é ideal para ser investigado por simulações de dinâmica molecular (DM).

Uma vez que os estudos *in silico*, descritos na literatura, utilizam diferentes fragmentos de PrP^C (de diferentes tamanhos e correspondentes a diferentes organismos) e diversos protocolos de simulação, torna-se difícil determinar a influência dos campos de força na formação de PrP^{Sc}. Dessa forma, o presente trabalho tem como intuito investigar computacionalmente a conversão conformacional da proteína príon celular do hamster Sírio (resíduos 109-219)¹⁸. Para tanto, foram realizadas simulações de DM para avaliar, nesse processo, a influência de diferentes campos de força (GROMOS^{19,20}, AMBER²¹⁻²³, CHARMM27^{24,25} e OPLS²⁶) em pH neutro (pH 7,4) e ácido (pH 3). A partir da definição do campo de força mais adequado para observar tal conversão estrutural, foram realizadas, ainda, simulações de DM do retorno da estrutura convertida em pH ácido (modelo de PrP^{Sc}) ao pH neutro. Com isso, espera-se elucidar alguns aspectos estruturais no processo de conversão conformacional, assim como entender a estabilidade do modelo de proteína patológica (PrP^{Sc}) frente ao pH neutro em ambiente fisiológico.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi produzir modelos da proteína patológica, PrP^{Sc}, em pH ácido. Entre os objetivos específicos do presente trabalho, encontram-se:

1. Avaliar o efeito do uso de diferentes campos de força (GROMOS96 43a1¹⁹, GROMOS96 53a6²⁰, AMBER99SB^{21,22}, AMBER99SB-ILDN²³, CHARMM27^{24,25} e OPLS-AA/L²⁶) para estudar a influência do pH ácido no processo de conversão da proteína príon celular do hamster Sírio (PDB ID: 2PrP)¹⁸.

1.1 Realizar simulações para os campos de força em duas condições distintas de pH: neutro, pH 7,4, e ácido, pH 3,0. Com o intuito de verificar a reprodutibilidade dessas simulações, foram realizadas 5 réplicas em cada uma das condições para cada campo de força.

1.2 Definir os campos de força mais adequados para produzir modelos da proteína patológica, PrP^{Sc}, em pH ácido.

2. As estruturas correspondentes a esses campos de força em pH ácido, foram, então, utilizadas como ponto de partida para novas simulações de DM em pH neutro (pH 7,4). Essa situação seria o correspondente celular de a proteína dentro do compartimento endossomal (submetida a pH ácido) retornar à superfície externa celular (onde estaria submetida novamente a pH neutro). Com isso, pretende-se avaliar a estabilidade estrutural do modelo gerado de PrP^{Sc} frente ao seu retorno ao pH neutro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Príons

3.1.1 Histórico e incidência das doenças priônicas

Apesar de existirem relatos das doenças priônicas datados do Império Romano, a primeira descrição dessas doenças remonta ao século XVIII²⁷, na Europa. Mais especificamente, foi descrita pela primeira vez em 1755, na Grã-Bretanha, em um relatório publicado no Diário das Câmaras. Essa doença, então denominada de doença das tremuras, afetava pequenos ruminantes, principalmente os ovinos e, mais raramente, os caprinos. A baixa ocorrência dessa doença tornava-a alvo de importância econômica e sanitária secundária, tendo sido, por isso, praticamente esquecida por quase 200 anos.²⁸



Figura 1: Quatro pessoas afetadas por Kuru (uma doença priônica), mantidas de pé com o auxílio de estacas de madeira. As três meninas sentadas também estão afetadas pela doença.²⁹

Na década de 1950, foi identificada uma desordem neurológica acometendo aldeias indígenas da tribo dos montes Fore, na Papua Nova Guiné (Figura 1). Denominada Kuru, essa doença fatal atingia cerca de 10% da população indígena local. Investigações de centenas de casos clínicos revelaram que a prática de canibalismo era o principal disseminador da doença. Embora a proibição das práticas de canibalismo tenham levado ao decaimento exponencial da propagação do Kuru, a doença resultou na morte de mais de três mil indígenas das tribos de Nova Guiné.²⁸

O interesse dado às doenças priônicas ressurgiu fortemente somente em 1985, quando se teve notícia de uma nova doença que afetava as manadas de bovinos britânicos. Um ano depois, veterinários britânicos identificaram a doença como encefalopatia espongiforme bovina (EEB), também conhecida como doença da vaca louca. Estimativas oficiais apontam que, até o ano 2000, cerca de 185 mil bovinos sucumbiram à doença, sendo que nas primeiras semanas morreram em torno de mil animais por semana.²⁸ A Figura 2 mostra a incidência de casos de EEB no Reino Unido e em países da União Europeia e fora dela, incluindo Canadá, Israel, Liechtenstein, Japão, Suíça e Estados Unidos.³⁰

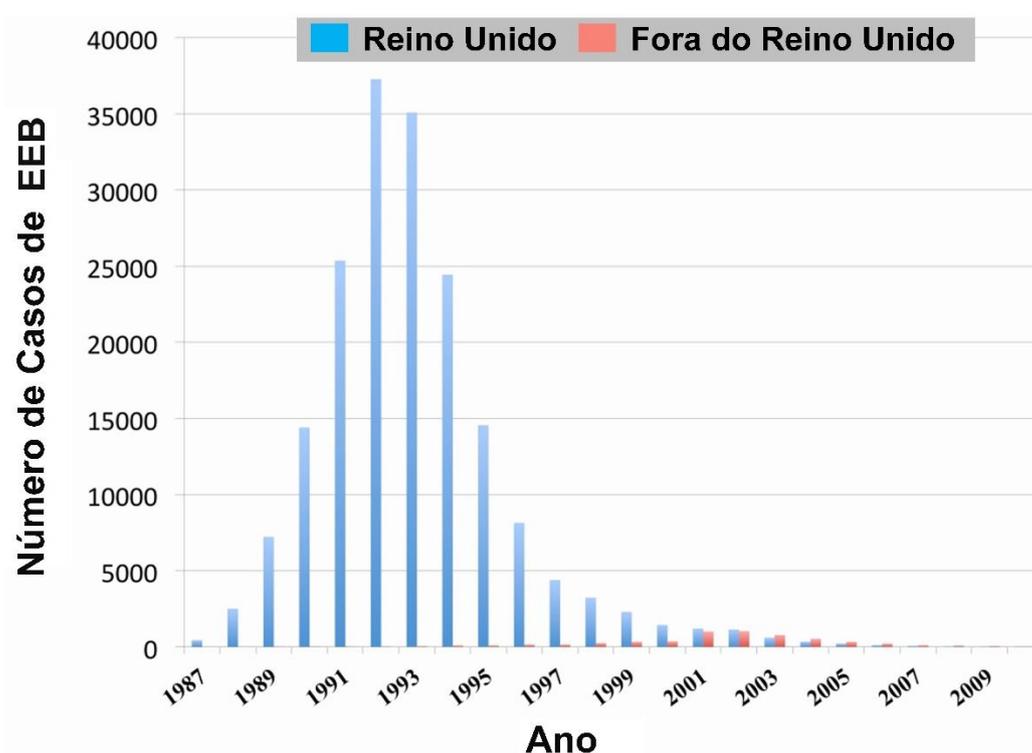


Figura 2: Incidência da doença da vaca louca (EEB) no Reino Unido e em países da União Europeia e fora dela, incluindo Canadá, Israel, Liechtenstein, Japão, Suíça e Estados Unidos.³⁰

Em 1995 estudos relataram a existência de uma forma atípica da doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), que afetava pessoas com menos de 30 anos.³¹ Um ano depois, novos estudos sugeriram que príons de origem bovina poderiam ter sido transmitidos à espécie humana.³² Estes e outros estudos repercutiram no quadro econômico europeu, fazendo com que no ano 2000, mais de 4 milhões de bovinos tenham sido sacrificados, o que representou um custo de 6,8 bilhões de euros ao Reino Unido, causando uma crise no setor pecuário deste país.²⁸

Em humanos, a desordem priônica mais disseminada é a doença de Creutzfeldt-Jakob. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência de DCJ em países que possuem vigilância é de um por milhão de habitantes. No Brasil, o sistema de vigilância de DCJ foi implantado em 2005, pelo Ministério da Saúde (MS) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Desde então, foi possível levantar a incidência da doença no Brasil, chegando-se à estimativa de até dois casos por milhão de habitantes. A Figura 3, a seguir, mostra o número de casos notificados e de casos confirmados no Brasil entre os anos de 2005 e 2013.³³

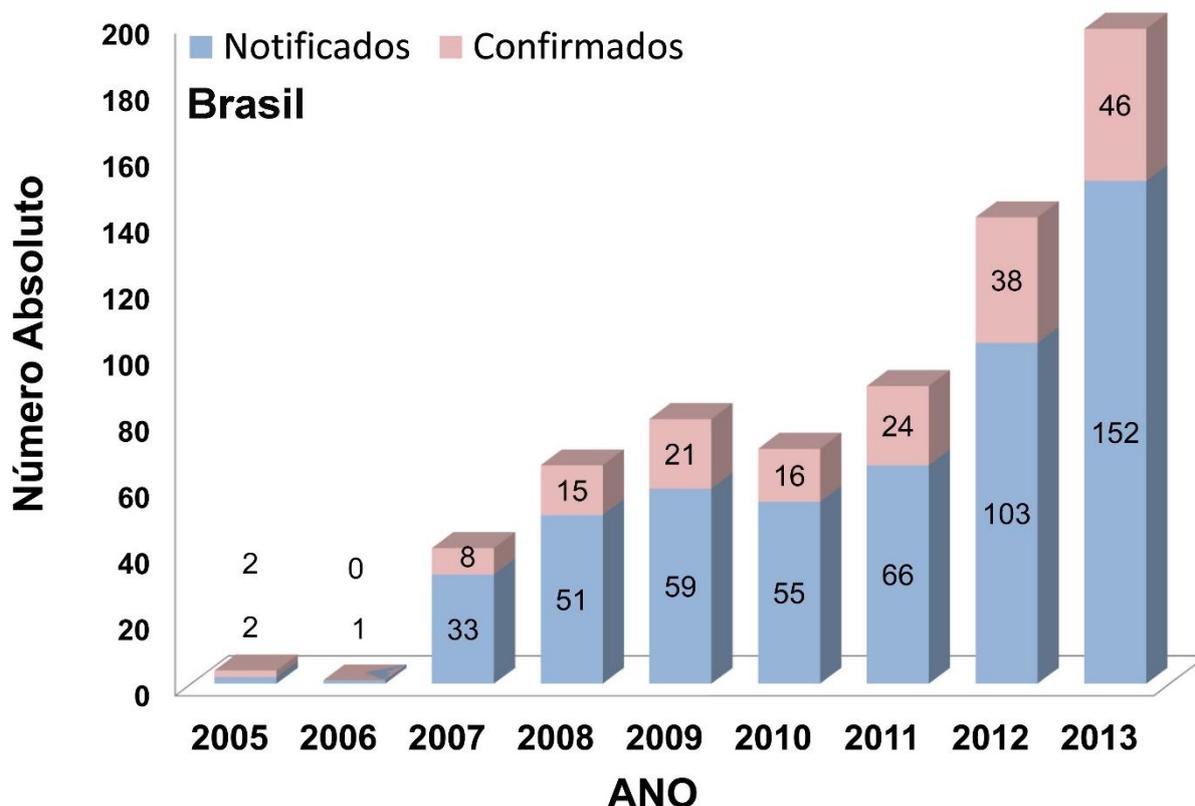


Figura 3: Incidência da doença de *Creutzfeldt-Jakob* no Brasil entre 2005 e 2013.³³

A definição de casos suspeitos, segundo a OMS, é feita com base em histórico epidemiológico e sintomas do paciente, além de exames laboratoriais e de imagem (como a ressonância magnética e o eletroencefalograma). A única forma de confirmar definitivamente a doença é através de exames neuropatológicos de biopsia ou necropsia. Na maioria dos países, a falta de sistemas de vigilância torna a incidência da doença subnotificada. Pacientes que apresentam demência de rápida progressão devem ser notificados como casos suspeitos de DCJ. Esses casos devem ser, então, investigados pelas Unidades da Federação (UFs), com o objetivo de se confirmar a suspeita da doença. No Brasil, o estado com maior número de casos da doença é São Paulo, com 90 casos confirmados entre 2005 e 2013. É interessante notar que a faixa etária mais acometida pela doença no Brasil é a de 60 a 69 anos, conforme mostra a Figura 4, a seguir. Esses dados concordam com as estimativas mundiais, uma vez que a doença possui longos períodos de incubação.³³

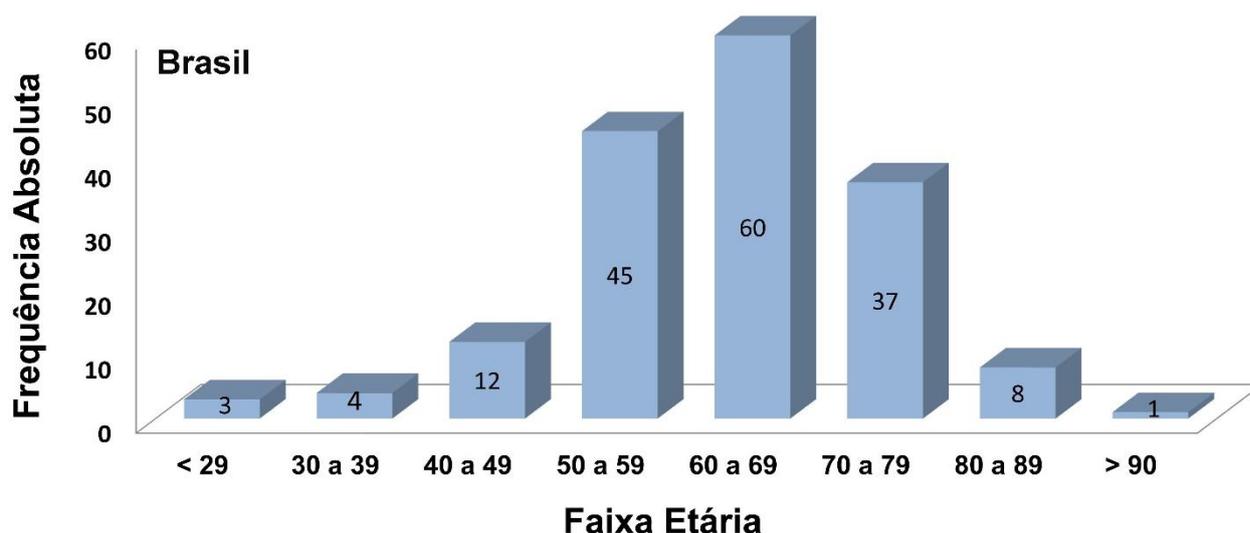


Figura 4: Incidência da doença de *Creutzfeldt-Jakob* por faixa etária no Brasil entre 2005 e 2013.³³

3.1.2 Encefalopatias espongiformes transmissíveis

Príons (**PR**oteínaceous **IN**fectious **ON**ly particle) são proteínas infecciosas que causam um grupo de doenças neurodegenerativas invariavelmente fatais. Este grupo de doenças, caracterizado por desencadear no cérebro um aspecto esponjoso, é classificado de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET).² As doenças priônicas (designação usada

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

para agrupar as doenças que possuem o príon como agente causal em comum) atingem seres humanos e animais.² Entre as doenças que afetam humanos encontram-se a doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), a doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), a insônia familiar fatal (IFF) e o kuru.³⁴⁻³⁷ Desordens semelhantes em animais incluem o *scrapie* em ovinos e caprinos, a encefalopatia espongiforme bovina (EEB ou doença de vaca louca) em bovinos e a doença crônica debilitante (DCD) em veados e alces.³⁷ São conhecidas três formas de doenças priônicas em humanos: hereditária (causada por mutações no gene Prnp), esporádica (de origem desconhecida) e transmissível.² A Tabela 1, a seguir, resume as principais doenças priônicas em seres humanos:³⁸

Tabela 1: Doenças priônicas em humanos e animais.³⁸

Doença	Hospedeiro	Mecanismo de Patogênese
spCJD	humano	mutações somáticas no gene Prnp
iCJD	humano	infecção por cirurgias ou tratamentos médicos (HGH)
vCJD	humano	infecção por príons bovinos, contaminação alimentar
gCJD		mutações na linhagem germinativa do gene Prnp
GSS	humano	mutações na linhagem germinativa do gene Prnp
FFI	humano	mutações na linhagem germinativa do gene Prnp
Kuru	humano	infecção por canibalismo
Scrapie	ovelhas	infecção em ovelhas geneticamente suscetíveis
EEB	gado	infecção devido a rações contaminadas
TME	mink	infecção por príons de ovelha ou gado
CWD	alces e cervos	desconhecido
FSE	gatos	infecção devido a rações contaminadas

A doença de Creutzfeldt-Jakob é a mais comum dentre as doenças priônicas em humanos e apresenta-se nas seguintes formas: esporádica, iatrogênica, variante e genética. A mais comum delas é a esporádica (spCJD), com uma prevalência de um por milhão de habitantes por ano. De origem desconhecida, spCJD afeta predominantemente pessoas de meia idade, com cerca de 60 anos. Entre as possíveis causas da doença estão mutações somáticas no gene Prnp (responsável pela produção da proteína priônica). Os primeiros sintomas mais comuns são comprometimento cognitivo e ataxia cerebelar. O diagnóstico depende fundamentalmente de uma revisão de histórico do paciente. A confirmação definitiva só é possível via autópsia, mas em alguns casos uma biópsia cerebral pode ser solicitada para excluir

outras doenças potencialmente tratáveis. A forma iatrogênica, iCJD, ocorre devido a transmissão acidental de CJD durante procedimentos cirúrgicos (em especial, cirurgias no cérebro) ou tratamentos médicos (como, o tratamento de crianças com hormônio do crescimento, HGH) e a principal forma de diagnóstico é por revisão de histórico do paciente. Evidências científicas apontam que a forma variante da doença, vCJD, se deve à infecção de humanos pelo agente da EEB, muito provavelmente devido à ingestão de carne contaminada. Entre as características mais comuns dessa doença encontram-se distúrbio comportamental e psiquiátrico (incluindo ansiedade, agitação, alucinações e depressão) e/ou sintomas sensoriais desagradáveis, como dor. A forma genética, gCJD (Figura 5), se deve a mutações na região codificadora do gene Prnp que são teoricamente associadas a uma predisposição de desenvolver a doença priônica. E200K é uma das mutações mais importantes associadas a gCJD e está geograficamente relacionada à incidência populacional em duas regiões: Israel (afetando Judeus de origem Libanesa) e Eslováquia. Outra mutação conhecida reside na posição 178 da estrutura primária da proteína priônica (D178N) associada com a presença de uma metionina na posição 129. A confirmação definitiva da doença é feita através de sequenciamento de uma amostra de DNA do sangue do paciente para verificar a presença da mutação no gene Prnp.³⁸

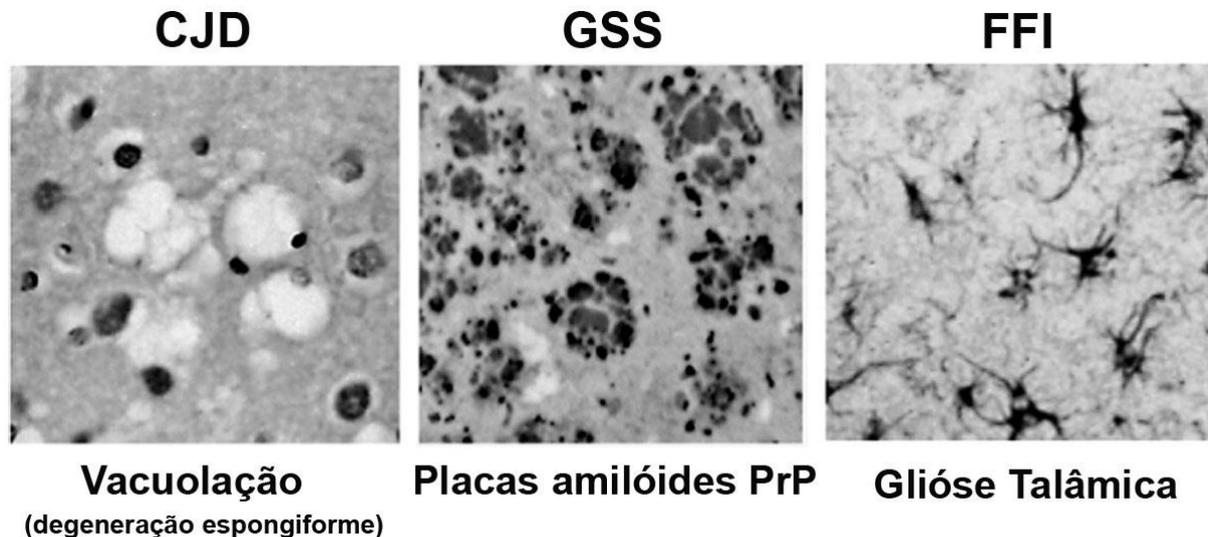


Figura 5: Características histopatológicas dos três principais subtipos de doenças genéticas de príons.³⁹

A doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e a insônia familiar fatal (IFF) (Figura 5) também representam formas genéticas das doenças priônicas. A mutação mais conhecida associada a GSS ocorre no códon 102 e resulta na substituição de uma prolina por uma leucina (P102L). De progressão lenta (podendo se desenrolar por cerca de 6 anos), os

principais sintomas dessa doença são: dificuldades cognitivas e comportamentais, assim como comprometimento cerebelar e piramidal. A insônia familiar fatal possui características consistentes com uma doença hereditária autossômica dominante. Usualmente, se manifesta em indivíduos com a mutação D178N associada a uma valina na posição 129 da sequência polipeptídica. O sintoma mais pronunciado dessa desordem é a perturbação do ciclo sono-vigília. Outras características incluem superatividade do sistema nervoso simpático e anormalidades endócrinas. Na etapa inicial da doença, o indivíduo sofre privação de sono, fobias, paranoias e progressiva perda de peso. Na fase terminal, demência gradativa e privação de sono evoluem para o coma profundo. A Tabela 2, a seguir, apresenta as principais mutações associadas a doenças priônicas.³⁸

Tabela 2: Mutações somáticas e hereditárias relacionadas a doenças priônicas.³⁸

Doença Priônica	Tipo	Mutação no Gene Prnp
gCJD	hereditária	E200K
	hereditária	D178N, V129
GSS	hereditária	P102L
	hereditária	A117V
	hereditária	F198S
	hereditária	Q217R
	hereditária	D178N, M129
FFI	hereditária	
	somática	Pro102Leu
		Pro105Leu
		Gly131Val
		Tyr145Stop
		Gln160Stop
		Phe198Ser
		Asp202Asn
Gln212Pro		
Gln217Arg		

3.1.3 Estrutura e regulação do gene Prnp

O gene Prnp de camundongos, ratos, bovinos e ovelhas é composto de três éxons. Por outro lado, o gene correspondente em cangurus, humanos e hamsters é composto de dois éxons. Em seres humanos, esse gene se localiza no braço curto do cromossomo 20. Em muitos casos,

o gene *Prnp* possui um promotor CCAAT, ao invés do tradicional *TATA box*. Além disso, as regiões promotoras de *Prnp* em hamsters e camundongos contêm múltiplas cópias de sequências ricas em GC repetidas, que potencialmente exercem a função de sítio de ligação canônico para o fator de transcrição Sp1.⁴⁰

O controle da expressão do gene *Prnp* é atribuído a sequências dentro de regiões flanqueadoras 5', do primeiro íntron e de sequências não-traduzidas (UTR) 3'. Análises da região 5'-flanqueadora mostram que uma forte atividade promotora requer sequências no intervalo de cerca de 80-150 pares de bases (bp) *upstream* ao éxon 1. Em bovinos, uma sequência promotora proximal entre -88 e -30 dentro da região flanqueadora 5' requer simultaneamente a presença de uma região de cerca de 770 bp dentro do íntron 1 para obter uma atividade promotora, indicando uma interação entre sequências promotoras e intrônicas. Em camundongos, duas sequências igualmente forte promotoras *upstream* a ambos os éxons 1 e 2, assim como uma sequência supressora dentro do íntron 1, mostraram controlar a atividade promotora em células de neuroblastoma.⁴⁰

Quatro motivos conservados de significado ainda desconhecido foram detectados *upstream* ao gene *Prnp* em ratos, humanos e ovelhas. Além disso, inúmeras inserções, incluindo retrotransposons foram descritos dentro do gene *Prnp* e suas sequências promotoras. O grau de identidade de sequências potencialmente promotoras é variável entre diferentes espécies de mamíferos. Bovinos e ovelhas possuem regiões flanqueadoras 5' com 89% de identidade de sequência. Comparando sequências correspondentes de bovinos contra humanos e roedores, a identidade cai para 46-62%. Evidências de que o gene *Prnp* seja modulado pela estrutura da cromatina assim como por potenciais sítios de ligação para inúmeros fatores de transcrição, indicam que a expressão de *Prnp* depende fortemente de uma variedade de fatores celulares. Entre os fatores de transcrição associados ao gene *Prnp*, encontram-se: MTF-1 (elemento de ligação ao DNA de metalotioneína-1), Oct-1 (fator de ligação de octâmero), NGF1-B (membro da família de receptores de hormônio esteroide), c-myc (proto-oncogene), MEF-2 (ativador transcricional), NFAT-1 (associado com a ativação Fos/Jun), AhR (qualquer receptor hidrocarboneto), MRE (elemento de resposta metálica) e HSE (elementos de resposta ao choque térmico). A Figura 6, a seguir, representa esquematicamente o gene *Prnp* composto de três éxons.⁴⁰

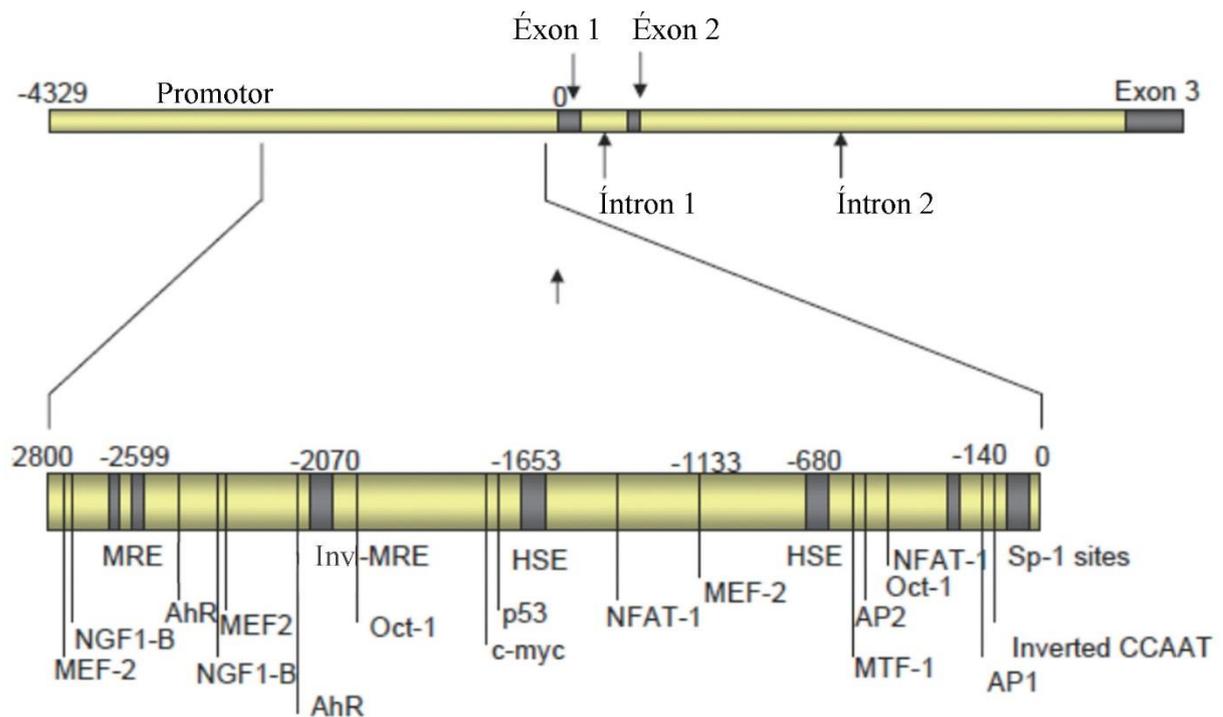


Figura 6: Estrutura do gene Prnp: domínios regulatórios da região promotora, localização (pode variar conforme espécie) dos elementos responsáveis dentro do gene e fatores de transcrição (MTF-1, Oct-1, NGF1-B, MEF-2, NFAT-1, AhR, MRE e HSE).⁴⁰

3.1.4 Distribuição de PrP^C

A expressão de mRNA e da proteína, PrP^C, é regulada de acordo com as etapas de desenvolvimento do organismo em questão, sendo maiores após o nascimento com diferentes cursos de tempo para inúmeras regiões do cérebro de hamsters, ratos e camundongos. Níveis aumentados da expressão de Prnp se correlacionam ao desenvolvimento do cérebro e a diferenciação neuronal.⁴⁰ Em seres humanos, a proteína príon celular encontra-se distribuída em inúmeros órgãos, incluindo estômago, rins, baço e cérebro. A Tabela 3, a seguir, apresenta a distribuição de PrP^C em diversos órgãos do corpo humano, assim como os tipos celulares e as técnicas de detecção utilizadas em cada caso.⁴⁰

Tabela 3: Distribuição da proteína príon celular detectadas em diferentes órgãos do corpo humano.⁴⁰

Órgão/Tecido	Tipo Celular	Técnica
Sangue	Monócitos, células T, B e NK	anticorpos monoclonais 3F4 e 3F5
Hipocampo	Células pré-sinápticas	IHQ e ME*
Cérebro	Células pré-sinápticas	WB e IHQ*
Estômago, rins e baço	Glóbulos secretores	IHQ*
Músculo	Membrana plasmática pós-sináptica	IHQ*

*IHQ = imuno-histoquímica; ME = microscopia eletrônica; WB = western blot.

Em seres humanos, a técnica de imuno-histoquímica permite detectar a presença de PrP^C no complexo de Golgi, nos glóbulos secretores e na membrana plasmática de células do baço, dos rins e do estômago. Essa técnica permite ainda visualizar depósitos de PrP^{Sc} em amostras de tecido cerebelar extraídos de pacientes com CJD horas após o óbito, conforme Figura 7. A concentração de PrP^C em células da mucosa epitelial do estômago e intestino sugere que a proteína tenha um papel importante no trato digestivo.⁴¹ Em análises de amostras de sangue de doadores, foram observadas concentrações substancialmente maiores de PrP^C em monócitos e linfócitos do que em granulócitos. As células T, NK e os monócitos apresentaram níveis similares de PrP^C, enquanto os níveis em células B foram significativamente menores. A concentração de PrP^C na junção neuromuscular é intensificada no sarcoplasma sub-sináptico. Essa região, associada a membrana endossomal, parece desempenhar um papel importante na manutenção das sinapses.^{40,41}

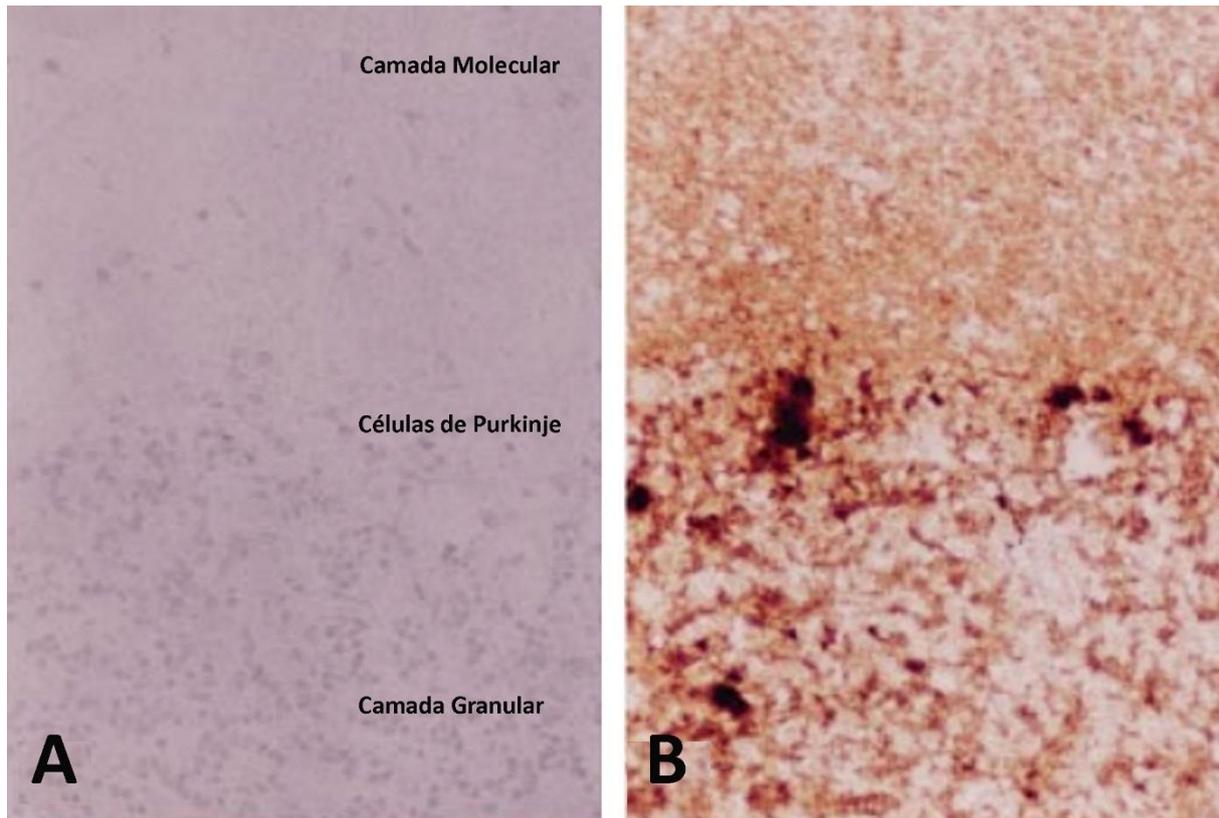


Figura 7: Imuno-histoquímica PrP usando o anticorpo monoclonal 3F4: A) Paciente controle; **B)** Depósitos de PrP^{Sc} (em preto) em paciente com CJD (cerca de cinco horas após o óbito). Tecido cerebelar, no qual três camadas são destacadas: molecular, células de Purkinje e granular. Aumento de 400 vezes.⁴¹

3.1.5 Estrutura de PrP^C

PrP^C é uma sialoglicoproteína externa de membrana ancorada via glicosilfosfatidilinositol (GPI) e codificada pelo gene Prnp.⁴²⁻⁴⁴ No retículo endoplasmático, PrP^C sofre clivagem de peptídeo de sinal em duas porções, uma na região N-terminal e outra no domínio C-terminal. Nos seres humanos, a proteína é formada por 253 aminoácidos e as clivagens ocorrem nas regiões correspondentes aos resíduos de aminoácidos 1-22 e 231-253. A âncora de GPI é anexada à proteína ainda no retículo endoplasmático. A proteína príon celular madura (PrP^C) é caracterizada por uma região N-terminal flexível (resíduos 23-124) e um domínio globular C-terminal (resíduos 125-228) composto por três α -hélices (HA, HB e HC) e duas pequenas fitas- β (S1 e S2). A proteína também inclui dois sítios de glicosilação (Asn-181

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

e Asn-197) e uma ligação dissulfeto (entre os resíduos 179 e 214).⁴⁵⁻⁵⁰ A Figura 8, a seguir, resume as principais características estruturais de PrP^C.

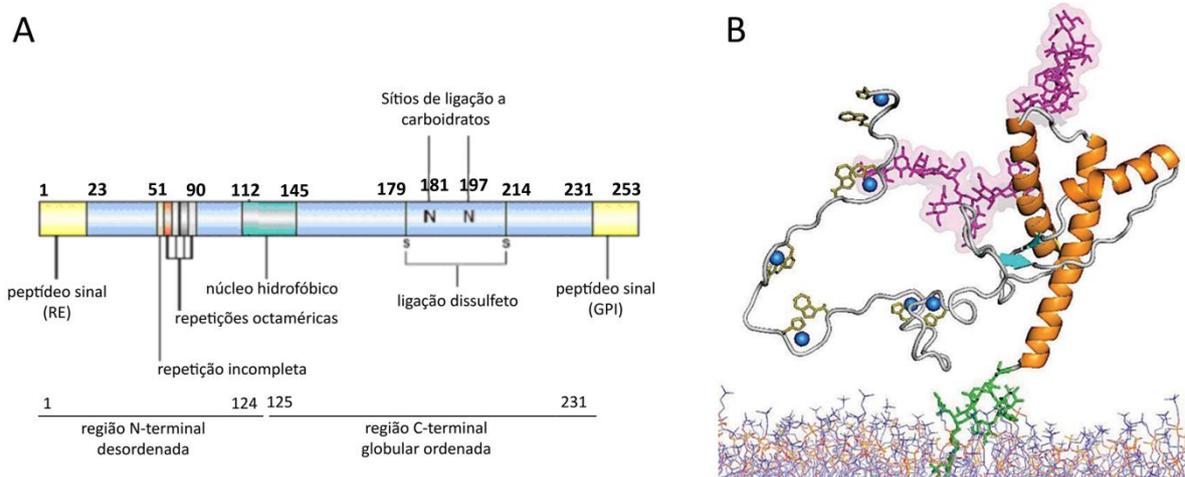


Figura 8: A) Estrutura primária da proteína PrP^C de camundongo. (adaptado de Brown, 2001).⁵⁷ B) PrP^C ancorada em membrana via GPI (adaptado de Acevedo-Morantes, C. Y., 2014).⁵⁸

No banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas, *Protein Data Bank* (PDB), existem 31 estruturas obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN) e 20 estruturas obtidas por difração de raios X (DRX) para a proteína príon celular humana. Essas estruturas foram elucidadas entre os anos de 1999 e 2016, sendo que nenhuma delas contém o fragmento inteiro da proteína príon celular. A estrutura depositada com a maior sequência polipeptídica possui 145 resíduos de aminoácidos (PDB ID 5L6R, fragmento 90-234) e foi depositada somente em 2016, conforme mostra a Tabela 4. Uma estrutura de tamanho quase equivalente, fragmento 90-231 (código PDB ID 2PRP), correspondente à proteína príon celular do hamster Sírio, já havia sido depositada em fevereiro de 1997. Ao todo, no PDB estão depositadas 179 estruturas referentes a proteína príon celular (obtidas por RMN ou DRX) para diversos organismos, incluindo ratos, hamsters, cavalos, bois, galinhas e seres humanos.⁵¹⁻⁵⁶ Inúmeras dessas estruturas incluem mutações conhecidas associadas à propensão ao desenvolvimento de doenças priônicas, como, por exemplo, a mutação D178N que se relaciona à doença de Creutzfeldt-Jakob.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 4: Estruturas tridimensionais para a proteína príon celular para diferentes organismos, incluindo alguns fragmentos peptídicos.

PDB ID	Organismo	Método	Cadeia	Mutação	Resolução	Posições	Data de Depósito
1OEH	Humano	RMN	A	-	-	61-68	27/03/2003
5L6R	Humano	RMN	A	-	-	90-234	31/05/2016
3HEQ	Humano	DRX	A/B	D178N	1.80	125-226	10/05/2009
1XYW	Alce	RMN	A	-	-	121-231	11/11/2004
2KU4	Cavalo	RMN	A	-	-	106-216	12/02/2010
1XYJ	Gato	RMN	A	-	-	121-231	10/11/2004
1XYK	Cachorro	RMN	A	-	-	122-230	04/01/2005
1XYQ	Porco	RMN	A	-	-	121-231	10/11/2004
1Y15	Camundongo	RMN	A	-	-	121-232	17/11/2004
1Y2S	Ovino	RMN	A	-	-	121-231	23/11/2004
2PRP	Hamster Sírio	RMN	A	-	-	90-231	25/11/1998
1DWY	Bovino	RMN	A	-	-	121-230	15/12/1999
1UW3	Ovelha	DRX	A	R148C, Y155H, R168Q	2.05	128-233	29/01/2004
2FJ3	Coelho	RMN	A	-	-	124-228	31/12/2005
2K56	Ratazana	RMN	A	-	-	121-231	26/06/2008
2KFL	Canguru	RMN	A	-	-	119-230	24/02/2009
1U3M	Galinha	RMN	A	-	-	126-242	22/07/2004
1U5L	Tartaruga	RMN	A	L181V, N183I	-	121-226	28/07/2004

Genes similares a Prnp existem ainda em anfíbios, répteis, pássaros e peixes. No entanto, organismos mais primitivos como protozoários, cefalópodes e insetos não apresentam o gene associado à produção da proteína príon celular. O comprimento da estrutura primária de PrP^C varia de cerca de 250 resíduos de aminoácidos para tetrápodes à 600 resíduos em peixes. Apesar dessa grande variação, estudos estruturais sugerem que existe uma cauda N-terminal comum entre as espécies. Essa região englobaria dois domínios (um com repetições octaméricas e outro positivamente carregado, CC1) que estariam conectados por um domínio hidrofóbico altamente conservado contendo um cluster positivamente carregado, CC2. Na Figura 9, a seguir, é apresentada a relação evolutiva entre espécies vertebradas baseadas em estruturas primárias de PrP^C. Por essa figura, observa-se que tetrápodes e peixes são agrupados em duas árvores separadas.⁵⁹

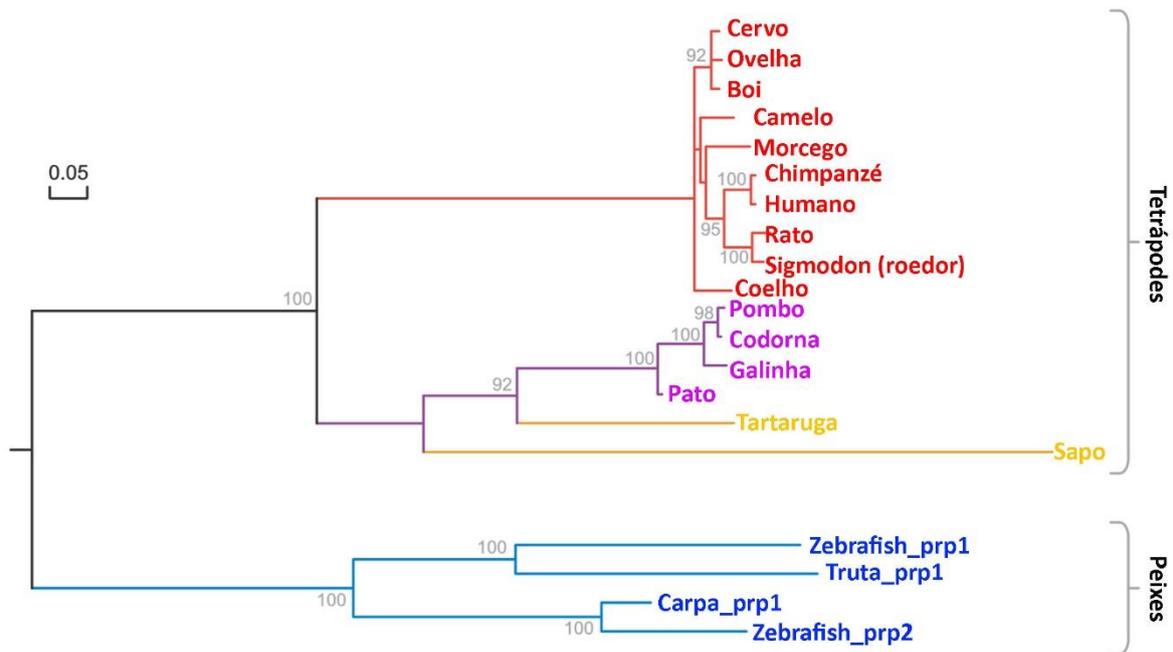


Figura 9: Relação evolutiva entre espécies vertebradas baseada na sequência primária de PrP^C (adaptado de Aguzzi, 2008)⁵⁹.

3.1.6 Funções de PrP^C

Inúmeros processos no sistema nervoso são influenciadas pelo genótipo de Prnp, incluindo sobrevivência neuronal, crescimento de neuritos, formação, manutenção e funcionamento de sinapses e manutenção de fibras mielinizadas. Uma vez que PrP^C está na membrana celular e algumas das enzimas que supostamente interagem com PrP^C se localizam na membrana ou matriz extracelular, estudos propõem uma conexão entre o meio extracelular, a sinalização intracelular, a regulação da expressão gênica e eventos fisiológicos envolvendo PrP^C. A seguir, são elencadas algumas importantes funções da proteína príon celular:

- **Captação de cobre:** a capacidade de PrP^C se ligar ao cobre pode modular a atividade de uma das principais enzimas antioxidantes celulares, Cu/Zn superóxido dismutase (SOD-1), que consequentemente regularia a resistência celular ao estresse oxidativo. Dessa forma, células com maiores níveis de PrP^C possuem uma resistência aumentada ao estresse oxidativo comparadas a células PrP^{-/-}. Outros estudos sugerem, ainda, que a proteína príon celular regularia a transmissão sináptica pela modulação do conteúdo de

cobre na fenda sináptica. PrP^C promoveria a endocitose de íons cobre, entregando-lhes intracelularmente a outras proteínas citosólicas carreadoras de cobre. Portanto, a ligação ao cobre induziria a internalização de PrP^C.⁶⁰

- **Sobrevivência neuronal e diferenciação:** a laminina é uma proteína com um importante papel na proliferação, diferenciação, migração e morte celular. Essas respostas celulares são mediadas pela interação da laminina com receptores de membrana celular. Estudos mostram que na ausência de PrP^C, animais modelo são mais suscetíveis a morte neuronal devido a degradação de laminina. Além disso, em células PrP^{-/-}, PrP^C previne a apoptose de neurônios. Dessa forma, a proteína príon celular pode estar envolvida na extensão e manutenção de neuritos.⁶⁰
- **Transdução de sinal:** uma vez que PrP^C está localizada na membrana celular, pode participar de rotas de sinalização celular. Estudos indicam que a resposta a cálcio em células infectadas por *scrapie* são reduzidas de 30% a 50% em comparação com células não infectadas. Assim, a infecção por príons comprometeria a função dos canais de cálcio. Além disso, estudos mostraram que o peptídeo PrP(106-126) é tóxico e forma canais livremente permeáveis a íons (Ca⁺² e Na⁺¹) em bicamadas de membranas lipídicas planares. Esse peptídeo está envolvido na ativação de enzimas (tirosina quinases Lyn e Syk) que promovem o início da cascata de sinalização que resulta em uma transiente liberação de cálcio intracelular. Dessa forma, a presença desses peptídeos aumenta a concentração livre de cálcio intracelular em organismos modelo.⁶⁰
- **Formação da memória:** LTP (do inglês, *long-term potentiation*) é tida como o evento molecular que contribui para a aprendizagem. Através da plasticidade sináptica, LTP é estabelecida entre vários neurônios, permitindo que o processo de aprendizagem ocorra. Como a plasticidade sináptica (LTP) no hipocampo está subjacente ao aprendizado e à formação de memória, qualquer deficiência de LTP pode resultar em defeitos cognitivos. Estudos mostraram deficiências na aprendizagem espacial e memória em linhagens de ratos deficientes em PrP^C. Esses déficits foram explicados por redução de LTP.⁶¹

3.1.7 PrP^C x PrP^{Sc}

As isoformas PrP^C e PrP^{Sc} empregam a mesma sequência de aminoácidos, mas possuem diferentes estruturas secundárias e terciárias. Estudos experimentais indicam diferenças entre propriedades das duas isoformas de PrP: (i) PrP^C é completamente degradada durante a digestão com proteinase K, enquanto que PrP^{Sc} é parcialmente hidrolisada em um fragmento de 27-30 kDa designado PrP 27-30; (ii) PrP^C é solúvel em detergentes, enquanto PrP^{Sc} é insolúvel e agrega em fibrilas amilóides.⁶² Em função da sensibilidade à clivagem proteolítica, PrP^C e PrP^{Sc} são também denominadas, respectivamente, de PrP-sen (sensível) e PrP-res (resistente). Estudos espectroscópicos adicionais empregando infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e dicroísmo circular (DC), demonstram algumas diferenças notáveis no conteúdo de estruturas secundárias. PrP^C apresenta um baixo conteúdo de folhas- β (3%) e um alto conteúdo de α -hélices (42%). Enquanto PrP^{Sc} mostra um significativo acréscimo de folhas- β (43-47%) em detrimento da diminuição de α -hélices (17-30%).^{63,64} A Tabela 5, a seguir, resume as principais propriedades bioquímicas de PrP^C e PrP^{Sc}:

Tabela 5: As principais propriedades bioquímicas de PrP^C e PrP^{Sc}.

Propriedades Bioquímicas	
PrP^C	PrP^{Sc}
Rica em α -hélices	Rica em folhas- β
Solúvel	Insolúvel
Sensível a digestão por proteinase K	Insensível a digestão por proteinase K
Não agrega	Agrega

Uma vez que ambas as isoformas PrP são quimicamente indistinguíveis, acredita-se que uma conversão conformacional de PrP^C desencadeie a geração de PrP^{Sc}.³ Enquanto a estrutura de PrP^C é bem estabelecida, a estrutura tridimensional de PrP^{Sc} é desconhecida. Tentativas de purificar a proteína patológica, PrP^{Sc}, a partir de amostras de cérebro de animais infectados por príons resultaram em misturas heterogêneas e estados de agregação não-propícios para a caracterização via técnicas de RMN e cristalografia de raios-X.¹⁰ A Figura 10, a seguir, apresenta uma comparação entre as estruturas tridimensionais de PrP^C e PrP^{Sc}:

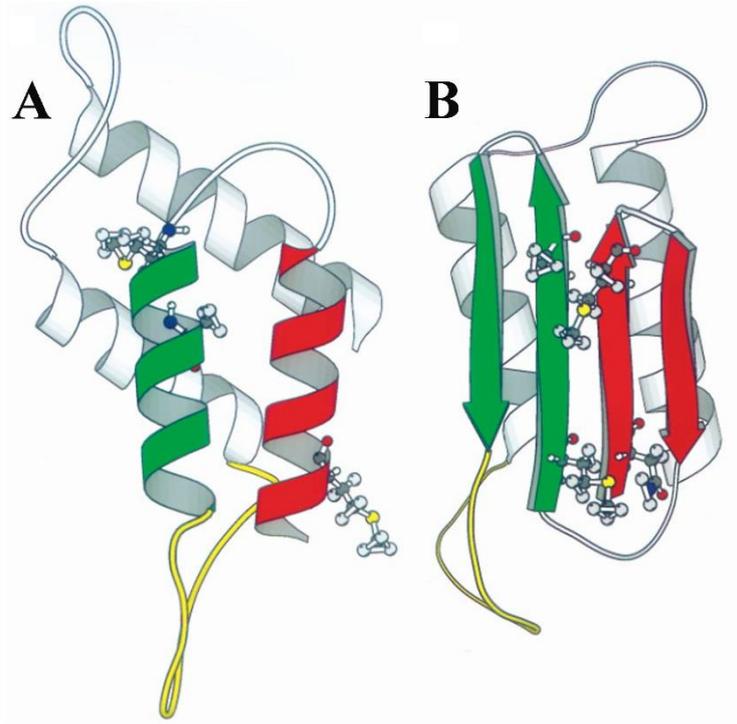


Figura 10: Diferenças esquemáticas entre as estruturas terciárias de PrP^C (predita por RMN) e PrP^{Sc} (isoforma especulada do príon humano, adaptado de Huang, 1995).⁶⁵

3.1.8 Mecanismos de conversão estrutural

Entre os inúmeros modelos propostos para a formação de PrP-res, destacam-se dois: o modelo heterodímero (ou redobrimento direcionado por *template*) e o modelo de polimerização dependente de semente de nucleação (Figura 11). No primeiro, PrP-res existe na forma de um monômero (termodinamicamente mais estável que PrP^C) que pode se ligar a PrP^C, formando um heterodímero. A presença de PrP-res se faz necessária para catalisar a conversão conformacional de PrP^C a PrP-res, resultando em um homodímero. Na etapa seguinte, há uma tendência de formação de dois monômeros de PrP-res. O gradual acúmulo desses monômeros de PrP-res desencadearia, por fim, a formação de oligômeros de PrP-res.⁶⁶

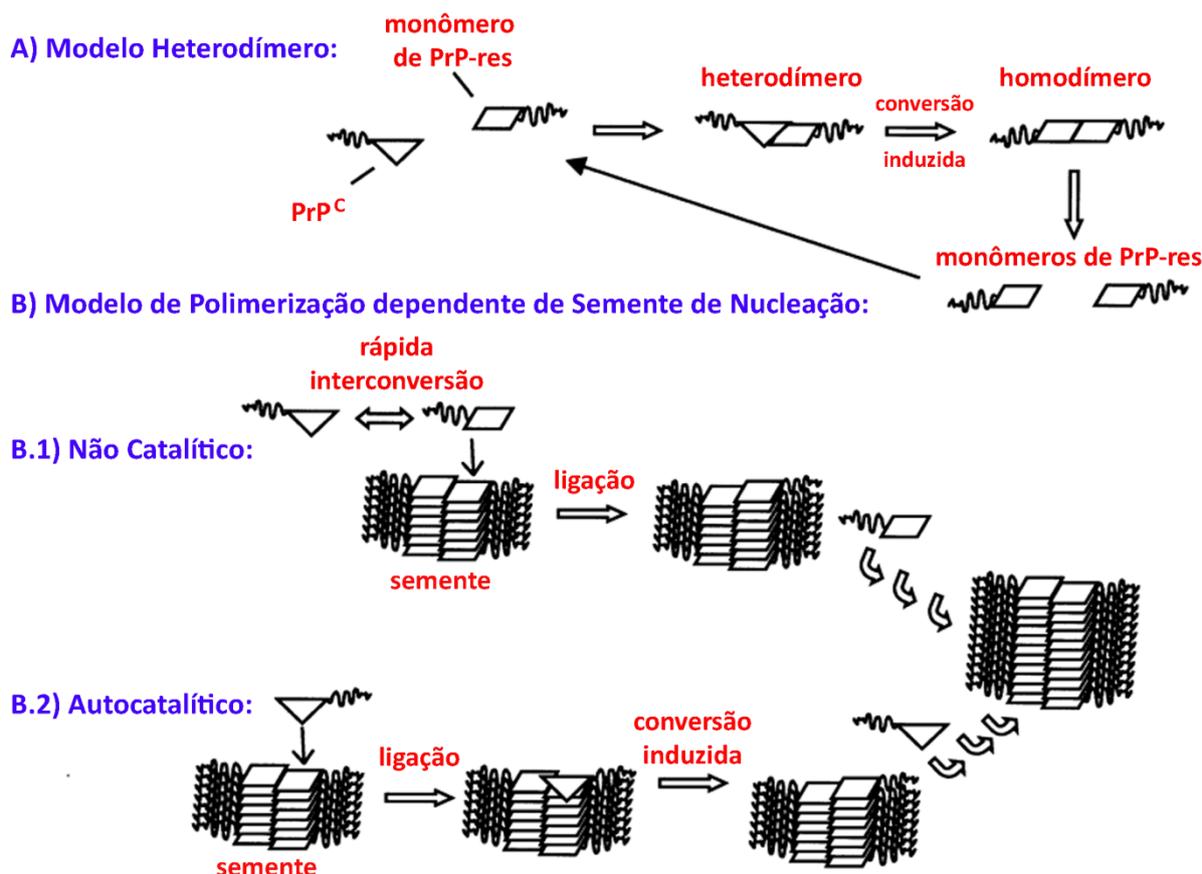


Figura 11: Modelos de mecanismos de formação de PrP-res: A) modelo heterodímero; B) modelo de polimerização dependente de semente de nucleação (catalítico ou não catalítico). (adaptado do livro Prion protein de Byron Caughey).⁶⁶

No segundo modelo, a presença de oligômeros de PrP é necessária para estabilizar PrP-res, de forma a permitir seu acúmulo a níveis biologicamente relevantes. Embora a formação espontânea do oligômero seja rara, uma vez formado ele é estabilizado por interações multivalentes. Esse modelo pode ser classificado em duas subcategorias: i) auto-catalítico: em que o oligômero atua como catalisador da conversão conformacional de PrP^C a PrP-res; ii) não catalítico: em que uma rápida interconversão de α -hélices a folhas- β é responsável pela formação da isoforma PrP-res, que é estabilizada pela presença do oligômero.⁶⁶

Nos três modelos, PrP^C é um intermediário metaestável que pode reagir favoravelmente com PrP-res na reação de conversão. Esse intermediário é similar à estrutura de PrP-sen recombinante gerada sob condições ácidas. Ressalta-se ainda que em todos os casos, o crescimento dos oligômeros resulta na formação de placas amilóides no espaço extracelular de neurônios.⁴ Nenhum dos modelos é mutuamente exclusivo, uma vez que as diferentes etiologias das doenças priônicas (genética, infecciosa ou esporádica) se ajustam a eles. Nas doenças

genéticas, mutações no gene Prnp podem desestabilizar a estrutura de PrP^C, diminuindo a barreira energética que a separa da isoforma PrP^{res}, e favorecendo, portanto, a conversão conformacional. Nas doenças infecciosas, a ingestão de alimentos contaminados com agregados de PrP^{Sc}, favorece o recrutamento de novas moléculas PrP^{Sc}. Nas doenças esporádicas, modificações bioquímicas (como mudança de pH do meio) pode perturbar a estrutura de PrP^C, favorecendo sua conversão.⁶⁶

3.1.9 Conexão com outras desordens neurodegenerativas

Pesquisas realizadas na última década vêm expandindo o cenário de doenças neurodegenerativas humanas potencialmente associadas ao mau enovelamento de proteínas naturais. Entre essas doenças destacam-se algumas de maior incidência populacional como: Alzheimer, Parkinson e Huntington. De fato, estudos extensivos têm indicado que os mecanismos celulares e moleculares dessas doenças neurodegenerativas são semelhantes àqueles que originam as doenças priônicas. Os agregados (denominados de placas amilóides), caracteristicamente formados nessas doenças, consistem de fibras contendo as proteínas redobradas com regiões expostas de folhas- β .⁶⁷

A doença de Alzheimer, por exemplo, está associada ao redobrimento e à formação de agregados de dois tipos de proteínas: a amilóide- β (ou A β), que se acumula no espaço extracelular formando placas amilóides, e a Tau hiperfosforilada, que forma emaranhados neurofibrilares dentro dos neurônios. A doença de Parkinson, por sua vez, está associada a defeitos sutis nas enzimas envolvidas na degradação da proteína α -sinucleína, levando a consequente acumulação e formação de agregados (ou corpos de Lewy) dessa proteína.⁶⁸⁻⁷⁰ Além dessas, destacam-se outras desordens neurodegenerativas potencialmente associadas à formação de agregados proteicos, conforme apresentado na Tabela 6.

Estima-se que atualmente cerca de 5 milhões de norte-americanos sofram de Alzheimer, 1 milhão de Parkinson e 30.000 de Huntington. A estimativa da Alzheimer's Disease International (ADI) é de que em 2010 haviam 35,6 milhões de pessoas vivendo com demência no mundo, sendo mais de 70% desse montante associado a portadores da doença de Alzheimer. Com o envelhecimento da população (e o aumento da expectativa de vida), este número deve subir para 65,7 milhões até 2030 e 115,4 milhões de pessoas até 2050.⁷¹ Em 2010, os custos globais com demência ultrapassavam 600 bilhões de dólares, o que representava já na época mais de 1% do PIB (Produto Interno Bruto) mundial.⁷²

Tabela 6: Doenças potencialmente associadas à formação de agregados proteicos.

Doenças	Composição dos agregados	Características Patológicas
Priônicas	PrP ^{Sc} (extracelular)	Degeneração espongiforme e formação de placas amilóides
Alzheimer	A β (extracelular); Tau (citoplasmática)	Placas amilóides; emaranhados neurofibrilares
Parkinson	α -sinucleína (citoplasmática)	Corpos de Lewy
Huntington	Huntington (nuclear)	Inclusões intracelulares e formação de agregados citoplasmáticos
Esclerose Amiotrófica Lateral (ELA)	Desconhecida (neurofilamentos)	Corpos de Bunina

A extrapolação do conceito de agregação de príons para o entendimento de outras desordens neurodegenerativas de maior impacto em saúde pública, promoveu um redirecionamento das pesquisas relacionadas a príons. Atualmente, uma dessas promissoras linhas de pesquisa concerne à compreensão dos fatores que levam ao inadequado enovelamento da proteína príon celular e a consequente formação de agregados proteicos. De fato, os cientistas acreditam que a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares das doenças priônicas auxilie a elucidar os mecanismos das demais doenças neurodegenerativas associadas à agregação de proteínas.^{67,70,73} Com isso, seria possível o desenvolvimento de fármacos mais potentes (e eficazes) para combater e prevenir os sintomas clínicos dessas enfermidades.

3.1.10 Modelos de PrP^{Sc}

Na tentativa de entender as características estruturais de PrP^{Sc}, diversos modelos foram propostos com base em dados experimentais e teóricos.⁶⁷ Os três modelos mais relevantes são:

- Modelo de folhas- β estendidas: proposto por Surewicz e colaboradores, esse modelo propõe um completo redobramento de PrP^C em uma estrutura composta majoritariamente de folhas- β (**Figura 12 A**).⁷⁴

- Modelo β -hélice: proposto por Govaerts e colaboradores, esse modelo aponta que a principal modificação estrutural de PrP^C ocorre na região N-terminal (resíduos 90-177). As α -hélices do domínio C-terminal são mantidas intactas nesse modelo (**Figura 12 B**).⁷⁵
- Modelo β -espiral: proposto por DeMarco e colaboradores, esse modelo foi desenvolvido a partir de simulações de DM em pH ácido. Assim como no modelo β -hélice, as α -hélices do domínio C-terminal não sofrem grandes modificações estruturais nesse modelo (**Figura 12 C**).⁷⁶

É difícil determinar qual dos modelos melhor descreve a estrutura real de PrP^{Sc}, uma vez que todos eles são embasados em experimentos biofísicos de baixa resolução. Contudo, a discrepância entre os modelos reflete a grande lacuna ainda existente a respeito da estrutura tridimensional de PrP^{Sc}. Acima de tudo, tamanha divergência dá margem ao questionamento em relação à validade desses modelos. A Figura 12, a seguir, apresenta um esquema dos três principais modelos de PrP^{Sc}:

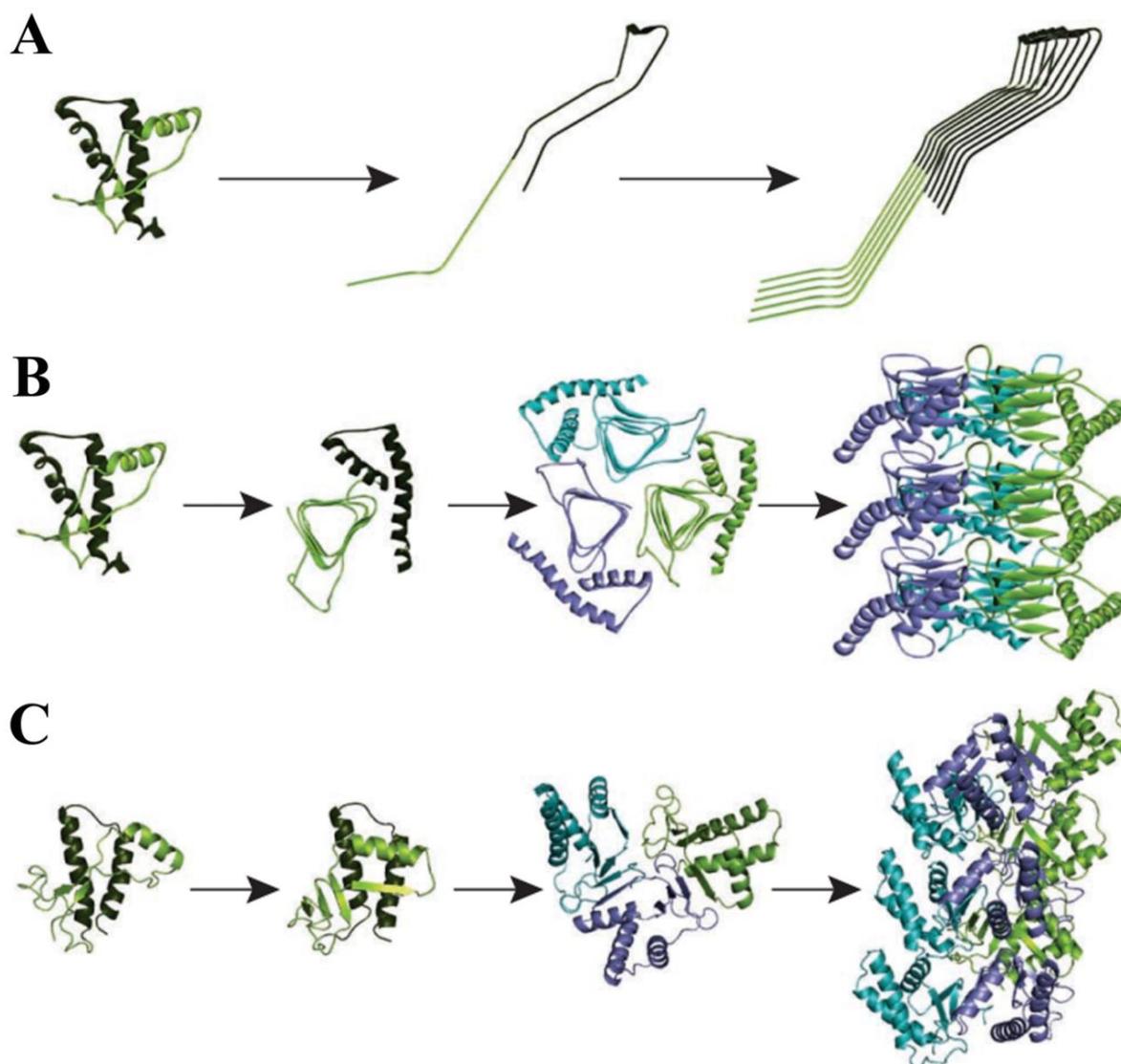


Figura 12: Modelos propostos para a estrutura de PrP^{Sc}. A) Modelo de folhas- β estendidas; B) Modelo β -hélice; C) Modelo β -espiral. Para facilitar a comparação, a mesma atribuição de cores para motivos estruturais foi usada em todas as imagens (adaptado de Diaz-Espinoza, R & Soto, C, 2012).⁷⁷

O modelo proposto por DeMarco e colaboradores⁷⁶ é inspirado em condições celulares. Ao ciclar constitutivamente entre a superfície celular e compartimentos endocíticos, a proteína PrP^C é submetida a ambientes com diferentes valores de pH. Na superfície celular PrP^C é submetida a um pH neutro, enquanto em ambiente endocítico vivencia um pH mais ácido (em torno de 5,0, mas podendo chegar à 4,3) conforme esquematizado na Figura 13. Experimentalmente, o pH ácido endossomal (na faixa de 4,4-6,0) é comumente usado para induzir conversão estrutural *in vitro* de PrP^C em PrP^{Sc}¹⁰⁻¹². Como resultado, tem-se uma perda de α -hélices e um ganho de folhas- β .

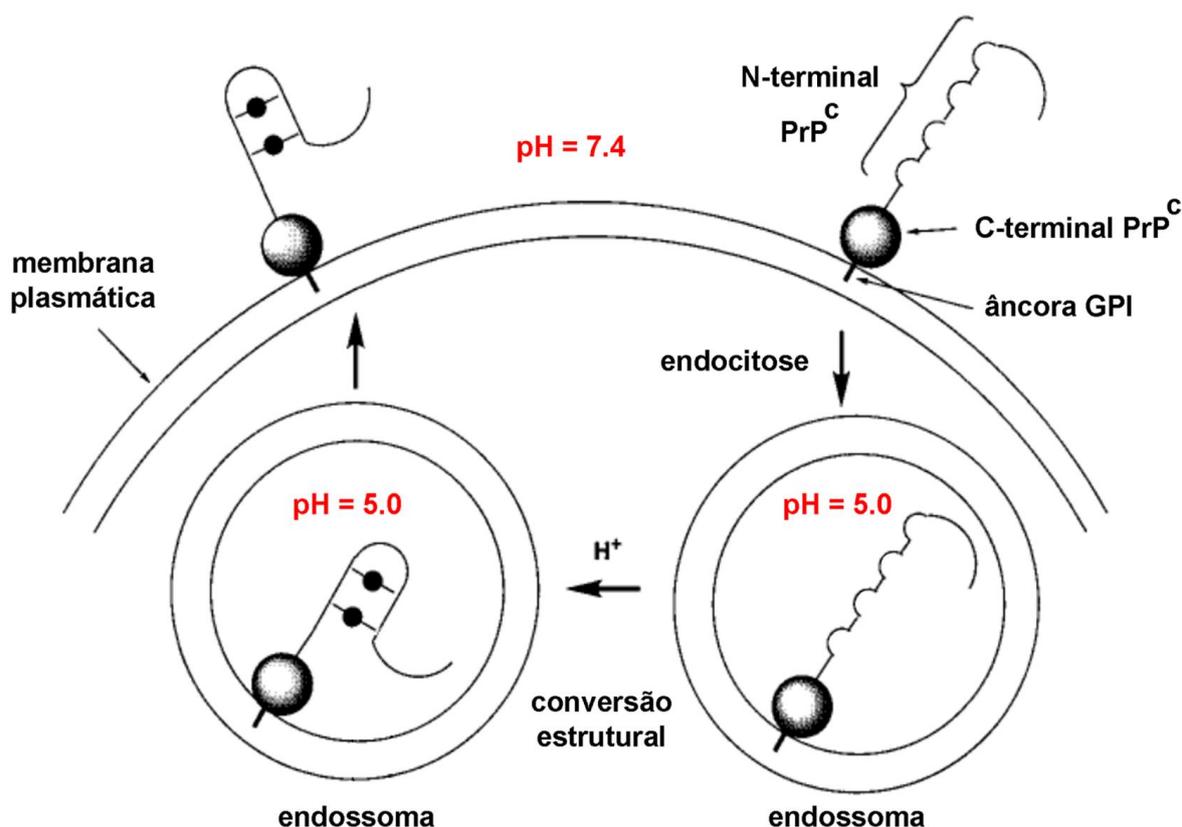


Figura 13: Ciclagem constitutiva da proteína príon celular passando por diferentes condições de pH (adaptado de Burns, 2002).⁷⁸

Dada a relevância biológica do modelo β -espiral, inúmeros pesquisadores têm investigado computacionalmente a influência do pH na conversão conformacional da proteína do príon celular. Ainda que os estudos *in silico* indiquem um aumento de folhas- β e uma concomitante diminuição de α -hélices em pH ácido, observa-se diferenças no comportamento estrutural dos fragmentos de PrP simulados. Por exemplo, um grupo de pesquisa identificou a interrupção da α -hélice 1, enquanto outro grupo encontrou a interrupção da α -hélice 2 como um evento crucial na conversão do PrP^C.¹³⁻¹⁷

Como os estudos *in silico* já realizados empregaram diferentes fragmentos de PrP^C (de organismos distintos e de tamanhos distintos) e diversos protocolos de simulação, é difícil determinar a influência dos campos de força na formação de modelos de PrP^{Sc}. No presente trabalho, a técnica de DM foi empregada para avaliar a influência de diferentes campos de força (GROMOS^{19,20}, AMBER^{22,23}, CHARMM27^{24,25} e OPLS²⁶) no conteúdo de estrutura secundária da proteína príon celular do hamster Sírio (resíduos 109-219)¹⁸ simulada em pH ácido e neutro.

Espera-se, com isso, elucidar alguns aspectos estruturais do processo de conversão estrutural da proteína do príon celular, assim como avaliar a reprodutibilidade computacional desse processo.

3.2 Estados de Protonação – PROPKA

O conhecimento das propriedades químicas dos aminoácidos é fundamental para o entendimento da sua bioquímica. A curva de titulação ácido-base (que representa a adição ou a remoção gradual de prótons) fornece os valores de pK_a dos grupos α -amino e α -carboxílico, além do pK_a de grupos ionizáveis das cadeias laterais (presentes em alguns aminoácidos), para cada um dos 20 aminoácidos. A Figura 14 apresenta a curva de titulação para o aminoácido histidina. Nessa curva, os três grupos ionizáveis são titulados com uma base forte (NaOH). Os três estágios caracterizados no gráfico correspondem à desprotonação dos três grupos distintos na histidina. O grupo α -carboxílico possui um pK_1 de 1,82, que corresponde ao valor do seu primeiro ponto de inflexão. Com o avanço da titulação, os outros pontos de inflexão são alcançados em pH 6,0 e 9,17 correspondendo, respectivamente, aos pK_a do grupo ionizável da cadeia lateral e do grupo α -amino.⁷⁹

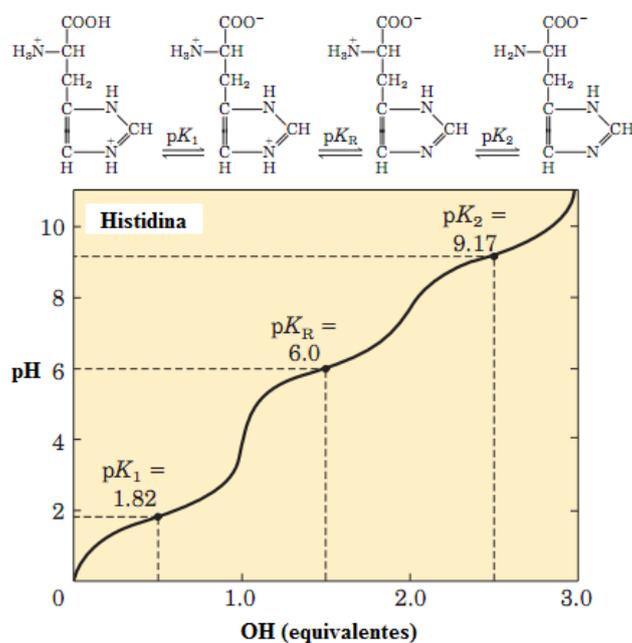


Figura 14: Curva de titulação, indicando os valores de pK_a dos grupos α -amino e α -carboxílico e o pK_a do grupo ionizável da cadeia lateral para o aminoácido histidina.⁷⁹

Para os 20 aminoácidos comuns, os valores dos pK_a dos grupos α -carboxílicos (pK_1) situam-se em uma pequena faixa em torno de 2,2, enquanto os valores de pK_a dos grupos α -amino (pK_2) estão próximos de 9,4. Embora a tabela padrão de pK_a de aminoácidos seja muito útil para nos dar uma ideia do comportamento dos aminoácidos, ela não considera o impacto do ambiente químico no qual o aminoácido encontra-se inserido dentro da proteína. No presente trabalho foi empregado o software PropKa 3.1, para fornecer um modelo mais acurado dos estados de protonação dos aminoácidos da proteína príon celular.

O software PropKa 3.1 pode ser aplicado à predição de pK_a de proteínas, proteínas com ligantes ou proteínas associadas a DNA. Quando dois grupos encontram-se covalentemente acoplados (ou seja, separados por menos do que três ligações químicas), o ambiente químico determina qual deles será titulado. Por outro lado, grupos não-covalentemente acoplados também podem influenciar a titulação um do outro, fazendo com que as curvas de titulação possam ser desviadas da forma padrão definida pela equação de Handerson-Hasselbach. Dessa forma, o software PropKa emprega um algoritmo de cálculo de pK_a que considera a influência do solvente assim como do ambiente químico da própria proteína sob estudo. A equação a seguir apresenta o cálculo do pK_a considerando os deslocamentos propiciados pelo ambiente químico circundante:⁸¹

$$pK_a = pK_a^{\text{água}} + \Delta pK_a^{\text{água} \rightarrow \text{proteína}} \quad (1)$$

Sendo: $pK_a^{\text{água}}$: pK_a do grupo titulado em água (apresenta valores tabelados para os aminoácidos); $\Delta pK_a^{\text{água} \rightarrow \text{proteína}}$: contribuição de pK_a que decorre do ambiente proteico circundante. O termo $\Delta pK_a^{\text{água} \rightarrow \text{proteína}}$ é expresso pela equação a seguir:⁸¹

$$\Delta pK_a^{\text{água} \rightarrow \text{proteína}} = pK_a^{\text{solv}} + pK_a^{\text{LH}} + pK_a^{\text{RE}} + pK_a^{\text{Coul}} \quad (2)$$

Sendo: o primeiro termo do lado direito da equação representa o efeito do solvente; o segundo termo, a contribuição das ligações de hidrogênio; o terceiro, a contribuição devido a reorganização de energias eletrostáticas desfavoráveis; e, o quarto termo, a contribuição das interações eletrostáticas.⁸¹

3.3 Dinâmica Molecular

O papel da computação na biologia tem aumentado nas últimas décadas. Com o contínuo crescimento do poder computacional, tornou-se possível analisar e comparar grandes conjuntos de dados obtidos experimentalmente para sistemas biomoleculares. Visando reproduzir propriedades não plausíveis de serem extraídas experimentalmente, inúmeros sistemas biológicos foram sistematicamente modelados. Na modelagem de um processo biológico, os níveis de resolução espacial e temporal empregados dependem do sistema de estudo. A vibração de ligações covalente ocorre na ordem de 10^{-15} s, enquanto fenômenos mais complexos, como o enovelamento de proteínas, ocorrem na ordem de 10^{-3} s (Figura 15).⁸²

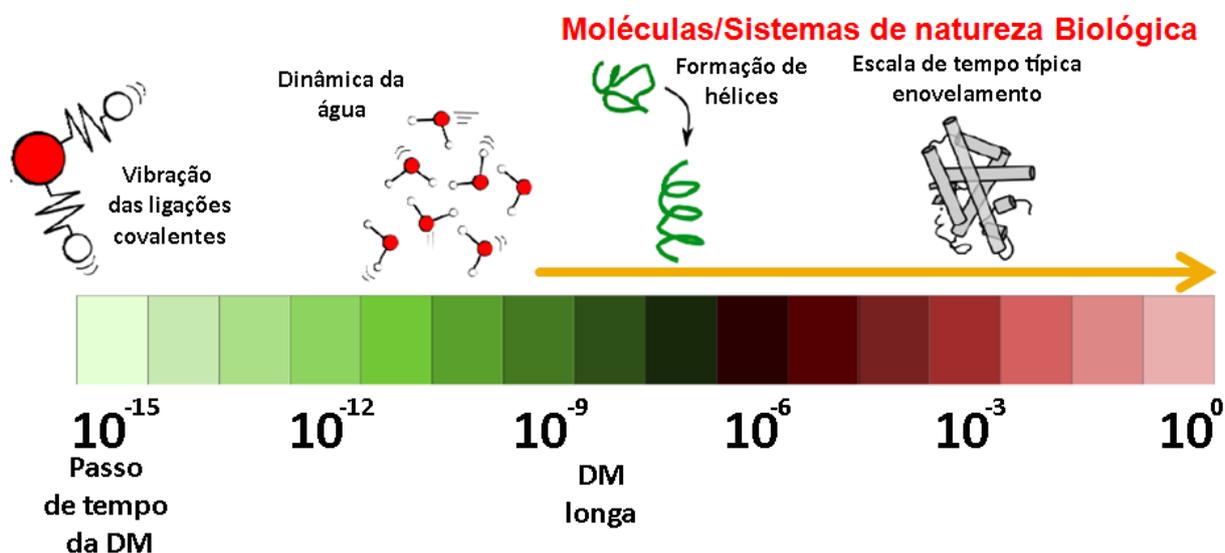


Figura 15: Escalas de tempo envolvidas na simulação de sistemas químicos e biológicos.

O estudo de mecanismos de reações enzimáticas exigem métodos de mecânica ou dinâmica quântica, que consideram os graus de liberdade atômicos e eletrônicos (Tabela 7, linhas 1 e 2). Por outro lado, processos biomoleculares (como o dobramento de proteínas, complexação proteína-ligante e formação de membranas lipídicas) são conduzidos por fracas interações interatômicas não-ligadas. Dessa forma, esses sistemas podem ser adequadamente modelados em nível atômico ou molecular (Tabela 7, linha 3). Uma vez que a temperatura (fisiológica) e a energia envolvidas no estudo desses sistemas são da ordem de $10 k_B T$ (dezenas de kJ/mol; k_B , constante de Boltzmann), esses processos são amplamente determinados pelas

leis da mecânica estatística.^{82,83} Entre os métodos de mecânica estatística clássica figura a dinâmica molecular, técnica a ser explanada em maiores detalhes nas próximas seções.

Tabela 7: Níveis resolução na modelagem de sistemas biomoleculares.⁸²

Métodos	Graus de Liberdade	Propriedades, Processos	Tempo
Mecânica Quântica	núcleos, elétrons	estados fundamental e excitado, mecanismos de reação	sem escala de tempo
Dinâmica Quântica	núcleos, elétrons	estados excitados, reações dinâmicas	ns
Mecânica Estatística Clássica	átomos, solvente	ensembles, médias, propriedades dos sistemas	ns

3.3.1 Da representação quântica à clássica

Em Dinâmica Molecular, os potenciais empregados são representações clássicas de potenciais quânticos. Ou seja, as propriedades quânticas não são implicitamente consideradas. Isso implica que reações químicas não podem ser estudadas por este método. Em princípio, a Equação de Schrödinger independente do tempo é escrita de forma compacta:⁸⁴

$$H\Phi = E\Phi \quad (3)$$

Sendo: Φ = função de onda espacial (ou independente do tempo).

O operador Hamiltoniano, H, pode ser representado como:

$$H = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B=1}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (4)$$

Sendo: N = número de elétrons; M = número de núcleos; Z_A = carga do núcleo A; Z_B = carga do núcleo B; r_{iA} = distância entre elétrons e núcleos; r_{ij} = distância entre elétrons; R_{AB} = distância entre núcleos; M_A = massa do núcleo A.

Uma vez que os graus de liberdade eletrônicos implicam em grande custo computacional, a aproximação de Born-Oppenheimer pode ser aplicada ao hamiltoniano, desacoplando o movimento de elétrons do movimento de núcleos. Assim, é possível definir o hamiltoniano nuclear, H_{nuc} .⁸⁴

$$H_{nuc} = - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \varepsilon_{TOT} \quad (5)$$

Sendo: o primeiro termo é a energia total associada à conformação dos núcleos (potencial para o movimento nuclear) e ε_{TOT} é a soma das contribuições do potencial gerado pelos elétrons (H_{ele} ; considerando núcleos estáticos e pontuais) e da repulsão nuclear ($H_{rep.n}$).

$$\varepsilon_{TOT} = H_{ele} + H_{rep.n} \quad (6)$$

$$H_{ele} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (7)$$

$$H_{rep.n} = \sum_{A=1}^M \sum_{A=1}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (8)$$

Sendo constante, o termo ε_{TOT} pode ser aproximado por potenciais clássicos. Usualmente, o termo de repulsão nuclear ($H_{rep.n}$) é escrito como um potencial coulômbico, enquanto que a superfície de energia potencial criada pelos elétrons (H_{ele}) é aproximada por diferentes funções (que representarão todas as interações intra- ou intermoleculares do sistema de estudo). Dessa forma, propaga-se a trajetória dos núcleos em uma superfície de energia potencial gerada pelos elétrons.⁸⁴

3.3.2 Ensemble e ergodicidade

Um ensemble é um grande conjunto de réplicas de um dado sistema que diferem entre si pelas atribuições das coordenadas e dos momentos associados às partículas do sistema. Assim, cada réplica ocupa uma região do espaço de fases. Pela mecânica estatística, define-se o espaço de fases como o espaço que representa todos os estados possíveis de um sistema. Cada ponto no espaço de fases é representado por $3N$ coordenadas (\mathbf{q}) e $3N$ momentos (\mathbf{p}) generalizados. Dessa forma, a função de partição do sistema adquire a seguinte forma^{85,86}:

$$Q = \frac{1}{N! h^{3N}} \int \dots \int e^{-\beta H(\mathbf{p}, \mathbf{q})} d\mathbf{p} d\mathbf{q} \quad (9)$$

A função de partição permite a integração sobre todos os pontos do espaço de fases e, por isso, é possível calcular as propriedades do sistema como médias de ensemble. A técnica de Dinâmica Molecular fornece uma forma de amostrar extensivamente as configurações do espaço de fases (Figura 16).^{85,86}

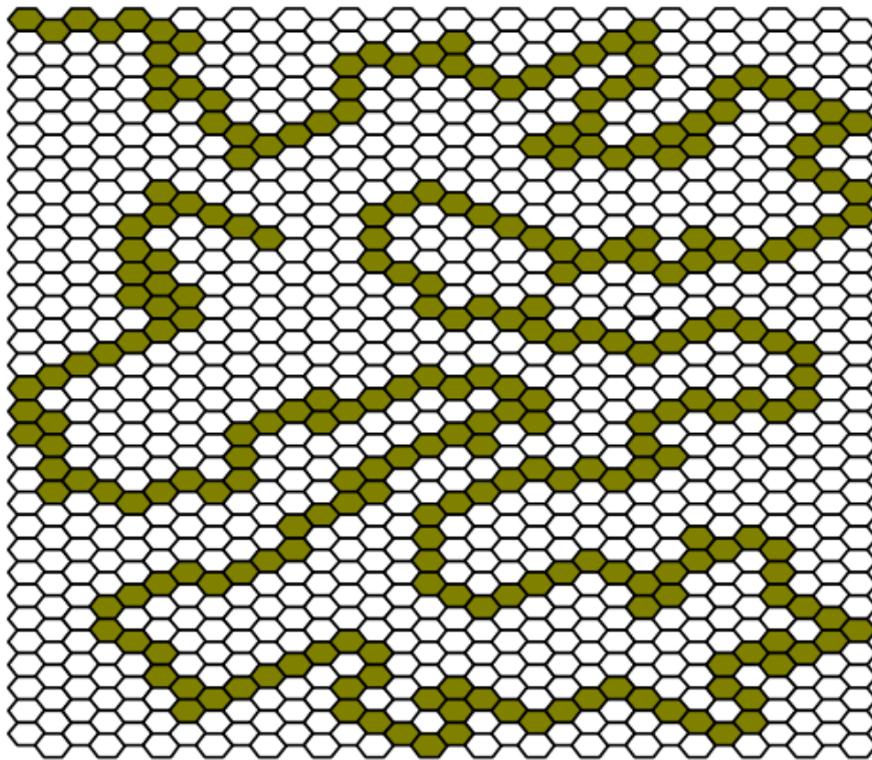


Figura 16: Espaço de fases sendo percorrido numa simulação de dinâmica molecular (adaptado de Koutinho, 2012).⁸⁷

Desta forma, podem ser calculadas as médias temporais das propriedades ao longo da trajetória de simulação^{85,86}:

$$\Phi_{med} = \lim_{t_{obs} \rightarrow \infty} \int_0^{t_{obs}} \Phi(\Gamma(t)) dt \quad (10)$$

Sendo: $\Gamma(t)$ é a trajetória amostrada ao longo do tempo, t , e Φ é a propriedade amostrada.

A hipótese ergódica assume que quando o sistema atinge o equilíbrio termodinâmico, a média de ensemble é equivalente à média temporal. Evidentemente, para que a hipótese seja válida é necessário que a propriedade seja amostrada por um tempo suficientemente longo na dinâmica molecular.^{85,86}

3.3.3 Equações de Movimento

Em dinâmica molecular, sucessivas configurações de um sistema são geradas pela integração numérica das equações de movimento de Newton. Como resultado tem-se uma trajetória que especifica como as posições e as velocidades das partículas do sistema variam com o tempo, t .⁸⁸ O algoritmo *Leap-Frog* (pulo da rã) é um dos mais usualmente empregados para integrar as equações clássicas. A partir desse algoritmo, as velocidades são atualizadas em tempos intermediários àqueles em que são atualizadas as posições, conforme mostrado nas equações a seguir:^{88, 89}

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \quad (11)$$

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\Delta t}{m} \mathbf{f}(t) \quad (12)$$

Sendo: \mathbf{r} o vetor de posição da partícula; \mathbf{v} a velocidade da partícula; \mathbf{f} a força atuando na partícula; m a massa da partícula; e Δt o passo temporal. Para iniciar o algoritmo são necessários os valores de posições e velocidades em duas etapas consecutivas. Primeiramente, as velocidades, $\mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$, num meio passo temporal futuro, $\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$, são calculadas a partir das velocidades, $\mathbf{v}\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$, das partículas num meio passo temporal passado, $\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right)$, e das forças que atuam nas posições das partículas num instante atual, t . Então, as posições, $\mathbf{r}(t + \Delta t)$, em um passo temporal futuro, $(t + \Delta t)$, são deduzidas a partir das velocidades que acabaram de ser calculadas, $\mathbf{v}\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)$, e das posições, $\mathbf{r}(t)$, no instante de tempo atual, t , usando a equação.⁸⁹

Em resumo, são utilizadas a força atuando sobre uma partícula em um instante t e a velocidade num instante $t - 0,5\Delta t$ para atualizar a velocidade para um instante $t + 0,5\Delta t$. A seguir, essa nova velocidade $t + 0,5\Delta t$ é utilizada juntamente com a posição do instante t para atualizar a posição da partícula para um instante $t + \Delta t$. Para esta nova posição no instante $t + \Delta t$ é calculada a força atuando sob esta partícula e, então, esta nova força $t + \Delta t$ é empregada

juntamente com a velocidade $t + 0,5\Delta t$ para atualizar novamente a velocidade (agora para um instante $t + 1,5\Delta t$), e assim por diante. Para inicializar o algoritmo, as posições iniciais das partículas, $r(t)$, são obtidas das estruturas experimentalmente determinadas depositadas em bancos de dados, como o PDB, e as velocidades iniciais são atribuídas de acordo com uma função de distribuição de Maxwell-Boltzmann.⁸⁴ A Figura 17, a seguir, apresenta um fluxograma que resume as etapas de uma simulação de dinâmica molecular:

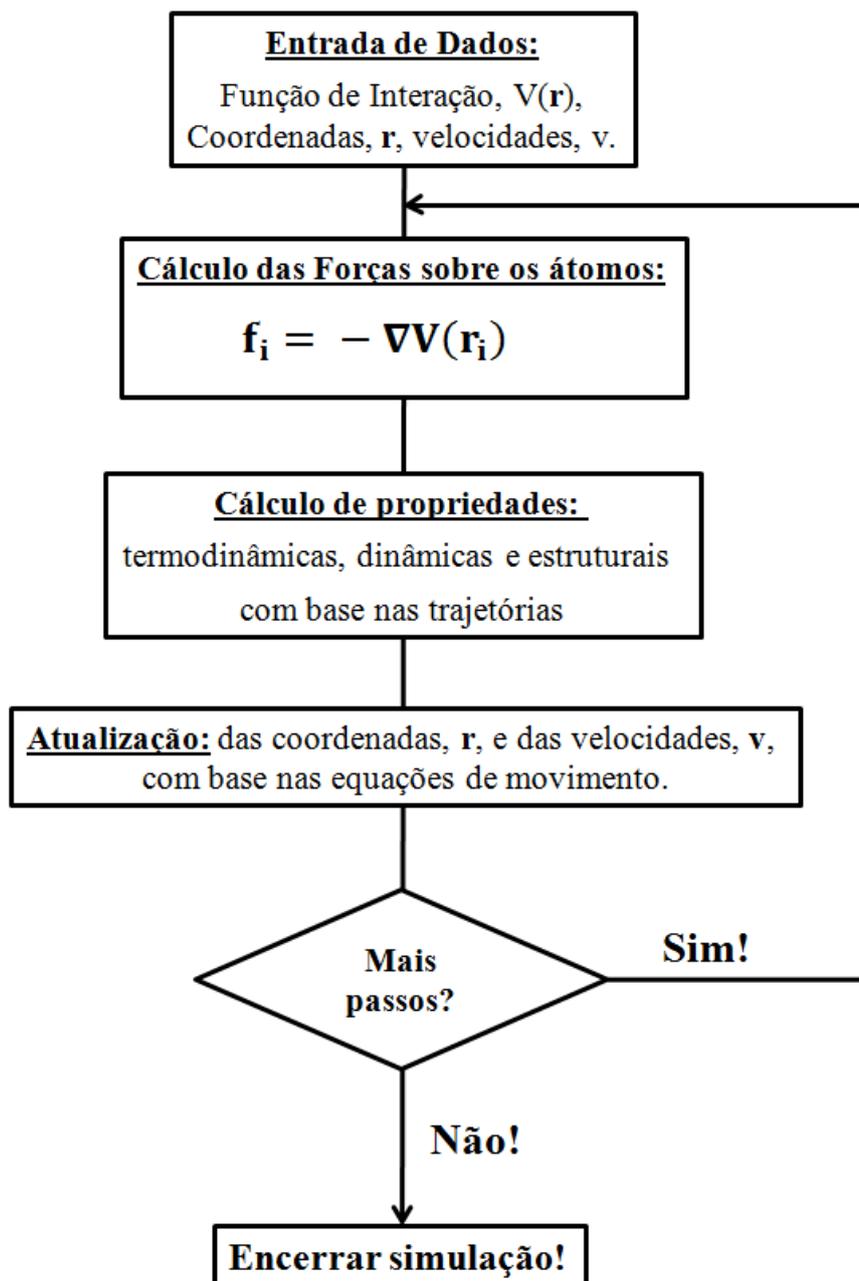


Figura 17: Fluxograma simplificado de uma típica simulação de dinâmica molecular.⁸³

A força atuando em uma partícula (i) se relaciona com o gradiente da função energia potencial, que atua nas coordenadas desta partícula, pela seguinte equação:⁸⁸

$$\mathbf{f}_i = -\nabla V(\mathbf{r}_i) \quad (13)$$

Sendo \mathbf{f}_i a força que atua em uma partícula i qualquer, ∇ o operador gradiente e $V(\mathbf{r}_i)$ a energia potencial que atua em uma dada posição da partícula i em um dado instante de tempo. Essa energia potencial depende somente das coordenadas das partículas.

Uma vez que cálculos exatos de energia potencial e força para as partículas de um dado sistema de estudo não são acessíveis, metodologias alternativas surgiram como forma de sanar esses problemas. Dessa forma, foram desenvolvidos modelos de “campos de força” com o objetivo de fornecer uma aproximação satisfatória para a função energia potencial.

3.3.4 Campos de Força

Uma vez que cálculos exatos de energia potencial e força para as partículas de um dado sistema de estudo não são acessíveis, metodologias alternativas surgiram como forma de sanar esses problemas. Dessa forma, foram desenvolvidos modelos de campos de força com o objetivo de fornecer uma aproximação satisfatória para a função energia potencial.⁸⁴

Um campo de força nada mais é do que a forma funcional da energia potencial total aliada ao conjunto de parâmetros que a definem. Obviamente, essa função e seus parâmetros variam conforme o campo de força empregado (cuja qualidade depende evidentemente do sistema e do tipo de propriedade estudados).⁸⁴ Os campos de força podem ser classificados, com base na resolução com que descrevem os sistemas, em: *all-atom* (AA), *united-atom* (UA) e *coarse-grained* (CG).⁸²

Um campo de força do tipo *all-atom* é parametrizado para representar todos os átomos do sistema, incluindo os átomos mais leves (como os átomos de hidrogênio). Já em um campo de força do tipo *united-atom*, os hidrogênios diretamente ligados a um carbono alifático e esse carbono são descritos como um único sítio. Dessa forma, um campo de força do tipo *all-atom* possui uma maior resolução na descrição dos constituintes dos sistema, em comparação a um campo de força *united-atom*. Cada campo de força possui uma forma específica de calcular as interações.⁸² No presente trabalho, foram empregados os campos de força GROMOS^{19,20}, AMBER^{21,22,23}, CHARMM^{24,25} e OPLS²⁶.

A função, $V(r)$, descrita em (1) não possui uma forma analítica conhecida, logo é aproximada pela aditividade do potencial entre pares⁸⁸:

$$V(r) = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N V_{ij}(r) \quad (14)$$

Sendo: N é o número total de partículas (átomos) do sistema de estudo.

O potencial total também pode ser expresso como a soma de um termo relativo aos potenciais ligados (*bonded*, do inglês) e um termo para os potenciais não-ligados (*nonbonded*, do inglês), conforme apresentado na equação a seguir⁸⁴:

$$V_{\text{Total}} = V_{\text{ligado}} + V_{\text{não-ligado}} \quad (15)$$

Com:

$$V_{\text{ligado}} = V_r + V_\theta + V_\omega + V_\phi \quad (16)$$

$$V_{\text{não-ligado}} = V_{\text{vdW}} + V_{\text{Coul}} \quad (17)$$

Sendo: V_{TOTAL} a função potencial total descrita pelo campo de força; V_r o potencial de interação para o estiramento de ligação entre dois átomos (interações tipo 1-2).; V_θ o potencial de interação para deformações angulares entre três átomos; V_ω o potencial de interação que representa a energia para alterar o ângulo ω entre dois planos de átomos formados por um átomo central ligado a outros três (*diedro impróprio*); V_ϕ o potencial torcional de rotação em torno de uma ligação (*diedro próprio*; interações 1-4); V_{vdW} o potencial de van der Waals para descrever interações inter ou intramoleculares de longo alcance; V_{Coul} o termo que trata as interações eletrostáticas. Para facilitar o reconhecimento dos termos, vamos chamar aqui V_ω de $V_{\text{impróprio}}$ (de diedro impróprio) e V_ϕ de $V_{\text{próprio}}$ (de diedro próprio).

Para o caso do campo de força GROMOS, os termos são expressos conforme as equações a seguir:^{19,20}

$$V_{\text{lig}} = \frac{1}{4} \sum_{n=1}^{N_r} K_{r_n} (r_n^2 - r_{0n}^2)^2 + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\theta} K_{\theta_n} (\cos \theta_n - \cos \theta_{0n})^2 + V_{\text{diedral}} \quad (18)$$

$$V_{\text{diedral}} = \frac{1}{2} \sum_{\text{impróprio}} K_{\xi_n} (\xi_n - \xi_{0n})^2 + \sum_{\text{próprio}} K_{\varphi_n} [1 + \cos(\delta_n) \cos(m_n \varphi_n)] \quad (19)$$

$$V_{\text{não-lig}} = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^N \left[\left(\frac{C12_{ij}}{r_{ij}^{12}} \right) - \left(\frac{C6_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \right] + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \left[\left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \right] \quad (20)$$

$$C12_{ij} = (C12_{ii} \cdot C12_{jj})^{\frac{1}{2}} \quad (21)$$

$$C6_{ij} = (C6_{ii} \cdot C6_{jj})^{\frac{1}{2}} \quad (22)$$

Sendo: K_{ξ_n} = constante de força de diedro impróprio; ξ_n = ângulo diedro impróprio; ξ_{0n} = ângulo de diedro impróprio de equilíbrio; K_{φ_n} = altura da barreira torcional do diedro próprio; δ_n = é o deslocamento de fase, restrito à 0 ou π ; m_n = multiplicidade do ângulo diedro próprio; φ_n = ângulo diedro próprio; ϵ é a constante dielétrica do meio; ϵ_0 é a permissividade no vácuo.

Entre os inúmeros campos de força usados em DM, os mais utilizados para os sistemas biológicos são: CHARMM27, AMBER, OPLS e GROMOS.⁸⁴ Detalhamentos desses campos de força estão descritos nos próximos subcapítulos e as formas funcionais de cada um desses campos de força podem ser encontrados nos Anexos A1-A3.

3.3.4.1 CHARMM

O programa CHARMM (*Chemistry HARvard Molecular Mechanics*) foi desenvolvido em 1980 e inicialmente usava um campo de força sem a representação explícita de hidrogênios. Em 1985, esse campo de força foi substituído por um novo conjunto de parâmetros, dando origem ao campo de força CHARMM19. Nesse campo de força, os hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio e oxigênio foram explicitamente representados, enquanto os hidrogênios ligados a átomos de carbono e enxofre foram tratados como parte de átomos estendidos. A

parametrização desse campo de força envolveu ajustes por cálculos quânticos em nível HF/6-31G de complexos formados entre a água e doadores e aceptores de hidrogênio de aminoácidos. Inicialmente, o campo de força CHARMM19 foi desenvolvido e testado para simulações em fase gasosa. No entanto, esse campo de força saiu-se bem em simulações de peptídeos e proteínas.^{24,25,90}

Em 1990, os parâmetros do CHARMM19 foram reajustados para obter melhor balanço das energias de interação em simulações em solvente explícito. Como resultado, surgiu o campo de força CHARMM22. A mesma estratégia, empregada no CHARMM19, foi utilizada para derivar os modelos de carga por ajustes a energia de dímeros soluto-água em nível HF/6-31G*. Na sequência, parâmetros de Lennard-Jones foram ajustados para reproduzir densidades e calores de vaporização de líquidos, assim como os calores de sublimação de cristais. Por fim, os parâmetros torcionais foram ajustados a dados derivados de espectros vibracionais e cálculos *ab initio*. Os potenciais torcionais ϕ e ψ foram ajustados via cálculos HF/6-31+G* para o dipeptídeo análogo de alanina (sendo os grupos metila foram substituídos por hidrogênios). Esses ângulos foram, então, refinados por um procedimento iterativo para melhorar a concordância com os ângulos de simulação da mioglobina. Numa versão posterior, CHARMM27, os parâmetros foram estendidos para ácidos nucleicos. Os parâmetros para peptídeos e proteínas, contudo, foram mantidos essencialmente como os parâmetros do campo de força anterior.^{24,25,90}

3.3.4.2 AMBER

O desenvolvimento do campo de força AMBER iniciou na primeira metade da década de 1980. Na versão original, este campo de força possuía uma representação (*united-atom*) das cadeias alifáticas nas quais um carbono e os hidrogênios diretamente ligados a ele eram representados como um único sítio. Na parametrização original, as cargas foram derivadas via química quântica ao nível HF STO-3G (ajustando as cargas parciais atômicas a potenciais eletrostáticos quânticos). As constantes de força, os comprimentos e os ângulos de ligação foram tomados de estruturas cristalinas e adaptados para se ajustar aos modos de frequências normais de um dado número de peptídeos. As constantes de força de torção foram ajustadas para combinar com as barreiras torcionais extraídas de experimentos ou de cálculos quânticos.^{21,22,23,90}

Em 1990, em função do aumento do poder computacional, foram realizadas melhorias nos parâmetros e o campo de força foi estendido para outras moléculas que não proteínas. Assim, surgiu o campo de força AMBER94, desenvolvido para obter potenciais adequados para as simulações em fase condensada (ou seja, levou em consideração as interações soluto-solvente e solvente-solvente). Empregando metodologias quânticas mais refinadas e tamanhos de fragmentos maiores, este campo de força forneceu um procedimento geral para um cálculo rápido de cargas (empregando HF/6-31G*) para todos os 20 aminoácidos.^{21,22,23,90}

No que diz respeito aos parâmetros de Lennard-Jones, esses foram estabelecidos, primeiramente, em referência às densidades e calores de vaporização de simulações em estado líquido. Desta forma, somente um conjunto pequeno de parâmetros (12/6) foram necessários para conseguir uma concordância razoável com os experimentos. Os últimos parâmetros ajustados foram os dos potenciais torcionais suaves sobre ligações simples, pois o perfil energético de rotação de ângulos torcionais depende fundamentalmente de interações não-ligadas. Um conjunto chave de parâmetros torcionais são aqueles para os ângulos ϕ e ψ da cadeia polipeptídica, uma vez que esses afetam muitos aminoácidos e influenciam pesadamente as energias relativas de hélices, folhas- β e voltas de proteínas. Os parâmetros do AMBER94 foram ajustados para representar pontos de mapas de dipeptídeos para a glicina e a alanina (computados através de metodologias quânticas). Algumas contabilizações de efeitos de longo alcance foram feitas no AMBER96, no qual os potenciais ϕ e ψ foram ajustados para tetrapeptídeos assim como dipeptídeos com energias conformacionais obtidas via mecânica quântica.^{21,22,23,90}

A partir do campo de força AMBER94, foi desenvolvido o campo de força AMBER99. Este apresentava baixo teor helicoidal em comparação com o campo de força AMBER-94, devido a barreiras adicionadas sobre o grau de liberdade rotacional ϕ . Modificações no potencial das cadeias principais de aminoácidos (por meio de ajustes a dados adicionais de mecânica quântica) resultou no AMBER99SB. A partir desse último, foram desenvolvidos dois novos campo de força: AMBER99SB* e AMBER99SB-ILDN. O primeiro deles resultou de mudanças no potencial das cadeias principais de aminoácidos para obter melhor balanço entre as conformações helicoidais e *coils*. Já o segundo, surgiu de modificações no potencial torsional de cadeias laterais de quatro tipos de aminoácidos (isoleucina, I; leucina, L; ácido aspártico, D; e asparagina, N; vindo da combinação das letras desses aminoácidos a designação ILDN).⁹¹

3.3.4.3 OPLS

A primeira versão do campo de força OPLS surgiu na década de 1980 como um modelo *united-atom* (OPLS-UA) para simular a água e cerca de 40 líquidos orgânicos. Este modelo dava grande ênfase à etapa de derivação das interações não ligadas, que foram sistematicamente ajustadas para reproduzir as propriedades termodinâmicas dos líquidos simulados. As aplicações iniciais para proteínas tomaram os tipos de átomos e os parâmetros de valência (ligação, ângulo e diedros) do campo de força AMBER 1984, resultando no campo de força que ficou conhecido como AMBER/OPLS. Mais tarde, uma versão *all-atom*, conhecida como OPLS-AA, foi desenvolvida para proteínas, mantendo praticamente a mesma filosofia de derivação de cargas e parâmetros de van der Waals de simulações em líquidos puros.^{26,90}

As cargas do OPLS foram, em princípio, obtidas empiricamente e com o passar dos anos foram sendo amplamente ajustadas para reproduzir propriedades de líquidos orgânicos. Os parâmetros dessas cargas foram escolhidos com a intenção de serem facilmente transferidos a outras moléculas com grupamentos quimicamente similares. Os parâmetros dos termos de estiramento e ângulos de ligação foram amplamente tomados do campo de força *all-atom* AMBER 1986, enquanto os parâmetros torcionais foram desenvolvidos de modo consistente pelo ajuste a perfis energéticos de HF/6-31G*. Melhorias na superfície de energia conformacional intramolecular foram realizadas para os 20 aminoácidos. Para tanto, foi realizada otimização energética em nível HF/6-31G** seguida de cálculos single-point LMP2-pVTZ(-f). O campo de força resultante, OPLS-AA/L (L de LMP2), apresentou um RMSD para os dados quânticos que foram metade dos valores obtidos para o campo de força OPLS-AA.^{26,90}

3.3.4.4 GROMOS

A filosofia do campo de força GROMOS assume um compromisso de descrever precisamente a energia de interação como função da conformação molecular, ao mesmo tempo que emprega uma forma funcional relativamente simples (que minimiza o número de parâmetros necessário, limitando o custo computacional de avaliar a energia potencial). Os parâmetros das interações ligadas (comprimentos de ligação, ângulos de ligação, etc.) são obtidos a partir de dados espectroscópicos e de cristalografia para moléculas pequenas. Já as interações não-ligadas (eletrostáticas e de van der Waals) são muito mais difíceis de parametrizar.^{19,20,90}

Os valores dos parâmetros de interações não-ligadas, para o campo de força GROMOS, foram inicialmente obtidos a partir de dados de cristalografia e de polarizabilidades atômicas. Estes valores, por sua vez, foram ajustados de modo que as distâncias experimentais e as energias de interação (de pares individuais de átomos de grupos funcionais) minimizassem a energia de conformação.^{19,20,90}

Com o aumento do poder computacional, tornou-se viável ainda a utilização de abordagens de mecânica estatística para parametrizar as interações não-ligadas, de forma a reproduzir propriedades termodinâmicas, tais como a densidade, o calor de vaporização e a entalpia livre de solvatação de pequenas moléculas na fase condensada em temperatura e pressão fisiológicas. Além disso, dados obtidos a partir de métodos quânticos *ab initio* e dados experimentais foram utilizados para ajustar, por exemplo, a distribuição de ângulos torcionais em torno de ligações específicas.^{19,20,90}

Com o lançamento do programa GROMOS96, um novo campo de força também foi lançado, sob a forma do conjunto de parâmetros 43a1 (contendo 43 tipos de átomos para descrever sistemas biomoleculares). Esses parâmetros subestimavam a energia livre de hidratação de pequenos compostos constituintes das cadeias laterais dos aminoácidos. Dessa forma, foram lançados dois novos conjuntos de parâmetros: 53a5 e 53a6. O campo de força GROMOS96 53a5 representa adequadamente a densidade e calor de vaporização de líquidos puros constituídos de pequenas moléculas. O conjunto de parâmetros 53a6 foi desenvolvido visando a obtenção de um campo de força aplicável tanto para simulações de proteínas como de membranas. Para isso, muitos parâmetros foram redefinidos com relação às versões anteriores: todos os tipos de átomos, ligações, ângulos de ligação, diedros próprios e impróprios foram renumerados e vários tipos novos foram adicionados. Além disso, a parametrização 53a6 foi especificamente adaptada para reproduzir a entalpia livre de hidratação (que é uma propriedade termodinâmica-chave em muitos dos processos biomoleculares) em água SPC⁽⁶⁶⁾ para um conjunto de análogos de aminoácidos (com uma média de erro absoluto baixa). O comportamento de partição destes análogos entre água e um ambiente hidrofóbico também é corretamente reproduzido, assim como as entalpias livre de solvatação para os solventes ciclohexano e água. Assim, dadas as melhorias nas propriedades de hidratação e solvatação, o emprego deste conjunto de parâmetros 53a6, em princípio, deve produzir melhores resultados (em relação aos conjuntos de parâmetros anteriores) para as constantes de interação entre biomoléculas em fase aquosa e para simulações de dobramento de polipeptídeos.^{19,20,90}

3.3.4.5 Comparação dos Campos de Força

De maneira geral, os campos de força da fase condensada biomolecular CHARMM, AMBER, GROMOS e OPLS têm uma forma semelhante da função potencial de interação, mas diferem em suas filosofias de parametrização e nos valores dos seus parâmetros. Isto se deve à grande variedade de formas pelas quais podem ser obtidos estes parâmetros. Ao longo dos anos os campos de força OPLS e AMBER vêm convergindo para um modelo eletrostático comum. Isto reflete o uso de protocolos e conjuntos de teste de parametrizações cada vez mais similares (uma vez que a parametrização do OPLS se inspirou na do AMBER), mas também indica uma busca incansável, e ainda em curso, por um modelo de carga ótimo. Por outro lado, o campo de força GROMOS utiliza um conjunto bem diferente de cargas para os aminoácidos.⁹⁰

Na literatura, existem inúmeros trabalhos comparando o desempenho de campos de força para os mais diversos sistemas biológicos. Matthes e colaboradores, realizaram um estudo de propensão de estrutura secundária para simulações de dobramento de cinco peptídeos modelo (a saber, Chignolin, Mbh12, Trp-cage, Fs₂₁ e Agd1) com cinco diferentes campos de força em solvente explícito: GROMOS96 43a1, GROMOS96 53a6, OPLS-AA/L, AMBER03 e AMBER99SB. Comparando dados estruturais e dinâmicos das simulações a dados experimentais, observaram que os campos de força apresentaram diferentes propensões de estrutura secundária. Com conclusão, os autores destacam problemas no balanço da estabilidade relativa de conformações helicoidais e estendidas nos campos de força avaliados. Além disso, os autores concluem que somente os campos de força OPLS-AA/L e GROMOS96 53a6 apresentam uma adequada formação de β -hairpin para os peptídeos estudados.⁹²

Sakae e colaboradores realizaram um estudo de dobramento de três proteínas (Proteína A, proteína de choque térmico e proteína G) empregando quatro campos de força: AMBER96, AMBER99, CHARMM27 e OPLS-AA/L. Os autores observaram tendências amplamente distintas de estrutura secundária para os diferentes campos de força.⁹³ Lange e colaboradores avaliaram o desempenho de seis campos de força (OPLS-AA/L, AMBER99SB, AMBER03, CAHRMM22, GROMOS96 43a1 e GROMOS96 53a6) em simulações de dinâmica molecular, na escala de tempo de submicrosegundos, de duas proteínas globulares: ubiquitina e domínio GB3 da proteína G. Os resultados foram comparados a dados experimentais de RMN e constatou-se que a reprodução dos dados de RMN dependiam fortemente do campo de força empregado. Além disso, os autores observaram que somente o campo de força AMBER99SB obteve boa concordância com os dados experimentais para a proteína GB3.⁹⁴

Lindorff-Larsen e colaboradores compararam o desempenho de oito campos de força (AMBER03, AMBER03*, AMBER99SB-ILDN, AMBER99SB*-ILDN, OPLS-AA, CHARMM22, CHARMM27 e CHARMM22*) para proteínas e peptídeos. A partir de um escore de concordância com dados experimentais (variando de 0 a 6), observaram que somente AMBER99SB*-ILDN e CHARMM22* reproduziram consistentemente bem os dados.⁹⁵ Cino e colaboradores realizaram simulações do peptídeo β -hairpin derivado da proteína Nrf2 com dez diferentes campos de força: AMBER99SB-ILDN, AMBER99SB*-ILDN, AMBER99SB, AMBER99SB*, AMBER03, AMBER03*, GROMOS96 43a1, GROMOS96 53a6, CHARMM27 e OPLS-AA/L. Avaliando os resultados, os autores observaram que os peptídeos dobraram-se em β -hairpin à 310 K somente com os campos de força AMBER99SB-ILDN, AMBER99SB*-ILDN, AMBER99SB, AMBER99SB*, AMBER03, AMBER03*, GROMOS96 43a1 e GROMOS96 53a6. Enquanto o campo de força CHARMM27 só alcançou essa estrutura a altas temperaturas e o campo de força OPLS-AA/L não obteve essa estrutura para nenhuma temperatura avaliada. Os autores ressaltam, ainda, a discrepância de resultados apresentada entre os diferentes campos de força e, inclusive, entre as réplicas de simulação.⁹⁶

Pantelopoulos e colaboradores estudaram o complexo p53-MDM2, importante alvo para o desenvolvimento de drogas para o câncer, para nove diferentes campos de força: AMBER03, AMBER12SB, AMBER14SB, AMBER99SB-ILDN, AMBER99SB-ILDN-nmr, AMBER99SB-ILDN-phi, AMBER99SB, CHARMM22* e CHARMM36. Os resultados foram comparados a dados experimentais de deslocamentos químicos.⁹⁷ Os autores observaram resultados similarmente acurados para os diferentes campos de força. Por fim, Smith e colaboradores examinaram a dinâmica de um fragmento proteico β -amilóide intrinsecamente desordenado, $A\beta_{21-30}$, para sete campos de força: OPLS-AA, CHARMM27, AMBER99, AMBER99SB, AMBER99Sb-ILDN, AMBER03 e GROMOS96 53a6. Os autores observaram que o tipo de campo de força tem pouca influência sobre o raios de giro e a superfície acessível ao solvente. No entanto, os conteúdos de estrutura secundária e ligações de hidrogênio intramoleculares mostraram-se significativamente distintos para os diferentes campos de força. Comparando os resultados obtidos a dados experimentais, os autores recomendam os campos de força OPLS-AA e GROMOS96 53a6 para estudos envolvendo o peptídeo $A\beta_{21-30}$.⁹⁸

Na construção dos campos de força, uma gama de propriedades (geométricas, energéticas, dielétricas, dinâmicas, etc.) de moléculas pequenas podem ser ajustadas contra diferentes conjuntos de dados experimentais e de mecânica quântica. Desta forma, conjuntos de parâmetros diferentes podem produzir resultados muito diferentes quando aplicados em sistemas biomoleculares grandes e complexos, como visto a partir dos relatos da literatura

acima mencionados. Por fim, comparar a qualidade de campos de força é uma tarefa difícil, pois não há garantia de que um campo de força ajustado para ter bons resultados com um grupo de moléculas funcione bem com outro grupo.⁹⁰ Por isso, a avaliação de qual campo de força melhor representa um sistema e suas propriedades é de suma importância.

4. METODOLOGIA

4.1 Bancos de dados

O principal banco de dados de estruturas de macromoléculas biológicas é o *Protein Data Bank* (PDB).⁹⁹ Este contém estruturas de proteínas e ácidos nucleicos. As estruturas depositadas no PDB são determinadas experimentalmente por técnicas como cristalografia por difração de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN).¹⁰⁰

4.2 Protocolo de Simulação

No presente trabalho, buscou-se identificar as condições ideais para o estudo de influência do pH (neutro e ácido) no processo de conversão estrutural da proteína príon celular. Para tanto, foram avaliados os efeitos da utilização de diferentes campos de força (GROMOS96 43a1¹⁹, GROMOS96 53a6²⁰, AMBER99SB^{21,22}, AMBER99SB-ILDN²³, OPLS-AA/L^{24,25} e CHARMM27²⁶). A configuração inicial da proteína foi obtida a partir da estrutura de RMN depositada no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB ID: 2PRP; modelo 11; resíduos 109-219)¹⁸. A Figura 18, a seguir, apresenta a sequência primária e a estrutura terciária da proteína príon celular do hamster Sírio correspondente ao fragmento de resíduos 109-219:

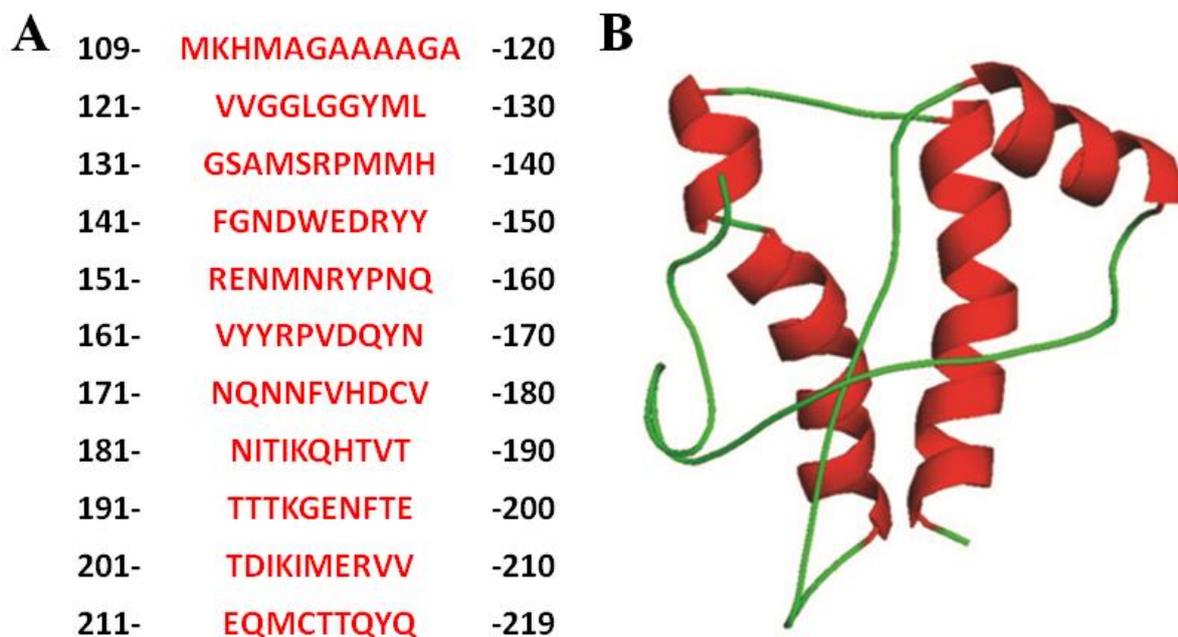


Figura 18: Proteína príon celular do hamster Sírio (PDB ID: 2PrP)¹⁸: A) Sequência primária; B) Estrutura terciária, destacando-se: fitas- β (S1 e S2, não captadas pelo visualizador PYMOL) e três α -hélices (HA, HB e HC).

Para realizar as simulações, foi utilizado o pacote de programas do software GROMACS, versão 4.5.5.¹⁰¹ Para cada uma das simulações realizadas, seguiu-se o protocolo descrito a seguir. O programa `pdb2gmx` foi usado para gerar o arquivo de topologia, o arquivo de coordenadas cartesianas da macromolécula biológica e para selecionar o campo de força. O software Propka 3.1 foi usado para definir os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos.⁸¹ Em pH 7,4 (neutro), os resíduos de aminoácidos lisinas, argininas, ácidos aspárticos e ácidos glutâmicos assumiram suas formas iônicas, enquanto as histidinas foram consideradas neutras. Em pH 3,0 (ácido), os resíduos de aminoácidos lisinas, argininas e histidinas assumiram suas formas iônicas, enquanto os ácidos aspárticos e ácidos glutâmicos foram considerados neutros. Em ambas as condições de pH, a ligação dissulfeto entre os resíduos Cys179 e Cys214 foi preservada.

Na etapa subsequente, os sistemas foram centrados em uma caixa cúbica, com as faces distando de no mínimo 1,5 nm da proteína. A caixa foi preenchida com moléculas de água (do tipo SPC¹⁰² para os campos de força GROMOS96 43a1¹⁹ e GROMOS96 53a6²⁰; TIP3P¹⁰³ para os campos de força AMBER99SB^{21,22}, AMBER99SB-ILDN²³ e CHARMM27^{24,25}; e, TIP4P¹⁰⁴ para o campo de força OPLS-AA/L²⁶). Com isto, o arquivo de topologia foi alterado, gerando-se um novo arquivo de coordenadas, desta vez contendo proteína e água. Foram adicionados, ainda, contra-íons para neutralizar os sistemas: 1 Na⁺ em simulações neutras e 14 Cl⁻ em simulações ácidas.

A etapa seguinte consistiu na minimização de energia do sistema proteína-solvente. Para isto, foi utilizado o algoritmo de minimização LBFGS.^{105,106} A etapa de equilíbrio foi promovida por 200 ps em *ensemble* NVT seguido de 200 ps em *ensemble* NPT. Os comprimentos de todas as ligações de equilíbrio da proteína foram mantidos pelo uso do algoritmo LINCS.¹⁰⁷ As moléculas de água foram restringidas pelo algoritmo SETTLE.¹⁰⁸

A última etapa da simulação consistiu na dinâmica molecular propriamente dita, na qual todos os graus de liberdade foram amostrados. A temperatura (300 K) e a pressão (1 bar) foram mantidas constantes, usando os algoritmos V-rescale¹⁰⁹ e Parrinello-Rahman¹¹⁰, respectivamente. Um raio de corte de 1,25 nm foi definido para as interações de Coulomb e van der Waals. O tratamento das interações eletrostáticas de longo alcance foi promovido pelo método SPME.¹¹¹ As equações de movimentos foram integradas usando o algoritmo *Leap-frog* com um passo de tempo de 2 fs. Para cada estrutura de partida, em um campo de força e um pH específicos, foram realizadas cinco réplicas de 100 ns. As réplicas foram produzidas pelo uso de diferentes valores de semente para a geração das velocidades iniciais. Dessa forma, foram produzidos 60 sistemas, que juntos totalizaram 6,0 μ s de tempo de simulação.

De posse das trajetórias das simulações de DM, foram realizadas análises empregando programas do software GROMACS 4.5.5. As análises realizadas foram: RMSD (*Root Mean Square Deviation*), RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), PCA (Análise de Componentes Principais), SEL (Superfície de Energia Livre), ligações de hidrogênio e evolução de estruturas secundárias (via programa DSSP). Finalmente, o software PYMOL 1.3 (<http://www.pymol.org>)¹¹² foi usado para gerar imagens das estruturas finais assim como das estruturas correspondentes aos clusters mais populosos das simulações.

A partir dessas simulações, foram selecionadas aquelas com melhor desempenho sob pH ácido (baseado no alto conteúdo de folhas- β). As quatro estruturas finais das simulações para os campos de força com melhor desempenho sob pH ácido foram, então, utilizadas como ponto de partida para novas simulações de DM em pH neutro (pH 7.4). Essa situação seria o correspondente celular de a proteína dentro do compartimento endossomal (submetida a pH ácido) retornar à superfície externa celular (onde estaria submetida novamente a pH neutro). Com cada uma das quatro estruturas foram realizadas cinco réplicas de simulação sob pH neutro, totalizando 20 simulações de 100 ns cada. O protocolo empregado nessas simulações é idêntico ao explicado acima para o estudo de influência dos campos de força. Com isso, pretende-se avaliar a estabilidade estrutural do modelo gerado de PrP^{Sc} frente ao seu retorno ao pH neutro.

Todas as simulações e posteriores análises foram realizadas no laboratório do Grupo de Química Teórica (GQT), localizado no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para os sistemas empregados neste trabalho, simulações com duração de 5 ns levaram cerca de 2 dias de cálculos em máquina para serem realizadas.

4.3 Análises

O RMSD calcula o desvio padrão médio quadrático para todos os átomos da proteína. O RMSD pode ser calculado pela fórmula abaixo¹¹³:

$$\text{RMSD}(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (23)$$

$$M = \sum_{i=1}^N m_i \quad (24)$$

Sendo $r_i(t_1)$ e $r_i(t_2)$ as posições do átomo i , respectivamente, nos tempos t_1 e t_2 ; m_i a massa do átomo i ; M o somatório da massa de todos os átomos da molécula.

Ou seja, o RMSD é utilizado para estimar os desvios médios da estrutura da proteína, em relação à estrutura de referência (onde $t_2 = 0$), no decorrer da simulação. Assim, é vislumbrada a evolução da mudança estrutural total da molécula ao longo da simulação. O RMSD pode ser calculado para os átomos da cadeia principal, para os átomos de carbono alfa ($C\alpha$), ou outras opções disponíveis no programa `g_rms` do pacote GROMACS.

O RMSF calcula o desvio padrão das posições atômicas ao longo da simulação com relação às posições de uma estrutura tomada como referência. Ou seja, calcula as flutuações atômicas ao longo da simulação¹¹³.

As ligações de hidrogênio são determinadas pelo estabelecimento de um valor limite para o ângulo acceptor de hidrogênio- doador de hidrogênio – hidrogênio. Este valor limite é equivalente à 30 graus. Além disso, o GROMACS só realiza simulações de ligações de hidrogênio entre átomos que estão distanciados por 0,35 nm.¹¹³ A Figura 19, a seguir, mostra a relação angular (ângulo α) entre o acceptor de hidrogênio (A), o doador de hidrogênio (D) e o átomo de hidrogênio (H).

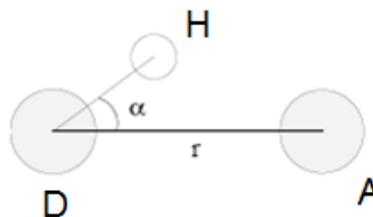


Figura 19: Relação angular (ângulo α) entre o acceptor de hidrogênio (A), o doador de hidrogênio (D) e o átomo de hidrogênio (H).

4.3.1 Análise estrutural de proteínas

A sequência de aminoácidos de uma proteína determina sua estrutura tridimensional, que, por sua vez, determina suas propriedades. Muitas conformações espaciais são possíveis para uma proteína, mas somente uma ou poucas possuem atividade biológica. Essas conformações são designadas nativas¹¹⁴.

Para a realização de análises bem sucedidas, relacionando sequências de aminoácidos e estrutura de proteínas, é necessário uma definição precisa de estrutura secundária. As análises estruturais, do presente trabalho, foram realizadas utilizando o programa DSSP (sigla para *Dictionary of Protein Secondary Structure*, do inglês)¹¹⁵ do pacote GROMACS. Partindo de uma definição de ligações de hidrogênio, o DSSP define voltas (*turns*) e segmentos- β (*β -bridges*); e, baseado nestas, define hélices (α -hélices, 3-hélices e 5-hélices) e folhas- β , respectivamente. Entre as características geometricamente definidas, encontram-se as dobras

(*bends*). Além disso, o programa DSSP define ainda: alças (*coils*) e estrutura (*structure*; que corresponde ao somatório de α -hélices, folhas- β , segmentos- β e voltas).¹¹⁵ Para visualizar em detalhes os algoritmos de definição das estruturas secundárias, ver Anexo A4.

4.3.2 Análise de componentes principais (PCA)

Proteínas funcionais são dotadas de movimentos internos que permitem sua função biológica. Esses movimentos podem ser subtos e envolver correlações complexas entre movimentos atômicos¹¹⁶. Na trajetória de DM de uma proteína, as coordenadas cartesianas contém uma mistura de modos de movimento lentos e rápidos. A análise de componentes principais, PCA (também conhecida como dinâmica essencial, análise quase-harmônica ou coordenadas dinâmicas moleculares ótimas) pode ser usada para separar esses modos de movimentos por amplitude¹¹⁷.

A análise de componentes principais (PCA) é um método estatístico multivariado que permite identificar padrões a partir de um conjunto de dados iniciais (que possui um grande número de variáveis correlacionadas). A técnica reduz o problema para um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas de componentes principais (PC), que respondem pela maior parte da variação associada ao conjunto de dados original.¹¹⁶⁻¹¹⁹

A PCA pode ser aplicada sobre um conjunto de coordenadas de alta-dimensionalidade, $\mathbf{x}(t)$. Após o ajuste translacional e rotacional de todas as estruturas de DM com base na estrutura de referência, a matriz de covariância $N \times N$, C_{ij} , é construída e diagonalizada:¹¹⁷

$$C_{ij} = M_{ii}^{1/2} \overline{((x_i(t) - \overline{x_i(t)})M_{jj}^{1/2}(x_j - \overline{x_j}))} \quad (25)$$

$$R^T C R = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_N) \quad (26)$$

Sendo que a linha superior denota média sobre o tempo; M é uma matriz diagonal contendo as massas das partículas e N é o número de partículas; R é a matriz de transformação ortonormal ou matriz de rotação; a i -ésima coluna de R é o autovetor ou modo principal correspondente do autovalor λ_i . Os autovalores são iguais à variância na direção do autovetor correspondente.

A projeção de \mathbf{x} nos autovetores resulta nos componentes principais, $\mathbf{p}(t)$:¹¹⁷

$$\mathbf{p}(t) = R^T M^{\frac{1}{2}} \mathbf{x}(t) \quad (27)$$

Num processo dinâmico, os componentes principais são função do tempo e respeitam algumas propriedades:¹¹⁹

- 1) A variância de $\mathbf{p}_i(t)$ é igual ao autovalor λ_i :

$$\text{Var}(\mathbf{p}_i) = \lambda_i.$$

- 2) O primeiro componente apresenta a maior variância:

$$\text{Var}(\mathbf{p}_1) > \text{Var}(\mathbf{p}_2) > \dots > \text{Var}(\mathbf{p}_N)$$

Ou

$$\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_N$$

- 3) O total da variância das variáveis originais é igual ao somatório dos autovalores que é igual ao total da variância dos componentes principais:

$$\sum \text{Var}(\mathbf{x}_i) = \sum \lambda_i = \sum \text{Var}(\mathbf{p}_i)$$

- 4) Os componentes principais não são correlacionados entre si:

$$\text{Cov}(\mathbf{p}_i \mathbf{p}_j) = 0$$

Pela diagonalização da matriz dos deslocamentos atômicos, encontra-se que as flutuações posicionais estão concentradas em movimentos correlacionados em um subespaço de somente alguns poucos graus de liberdades (menos do que 1%), enquanto todos os outros graus de liberdade são menos importantes flutuações Gaussianas ortogonais ao subespaço essencial. O movimento fora desse espaço essencial pode ser considerado como essencialmente restrito. Dessa forma, a proteína pode ser representada no espaço essencial que é geralmente explicado por poucos componentes principais.¹¹⁶ Nos casos mais favoráveis, uma significativa fração da variância da distribuição multidimensional pode ser explicada por poucas dimensões.¹¹⁶⁻¹¹⁹

4.3.3 Superfície de energia livre

Um conceito importante para interpretar processos biomoleculares é através do perfil de energia livre das moléculas. A energia livre pode ser descrita pela equação a seguir:¹²⁰

$$\Delta G(r) = -k_B T \ln P(r) \quad (28)$$

Sendo **P** a distribuição de probabilidade do sistema molecular ao longo de uma coordenada **r**. Comumente, se escolhe como coordenadas o raio de giro (RG) e o desvio médio quadrático (RMSD) com relação aos estados energéticos moleculares. O perfil de energia livre é caracterizado por mínimos energéticos (que representam estados conformacionais metaestáveis do sistema) e suas barreiras (que conectam esses estados). Dessa forma, é possível avaliar os caminhos e as energias cinéticas correspondentes às conformações biomoleculares a partir do perfil de energia livre.¹²⁰

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Influência dos Campos de Força

A conversão estrutural da proteína do príon celular sob pH ácido (Figura 20) foi investigada por vários estudos de dinâmica molecular.¹³⁻¹⁷ As simulações detalhadas nesses estudos revelam um aumento de folhas- β e uma concomitante diminuição de conteúdo α -helicoidal sob pH ácido. Esses estudos, porém, apresentam discordâncias a respeito dos eventos envolvidos na conversão estrutural de PrP^C a PrP^{Sc}, tais como: i) se a concentração da formação de folhas- β ocorre na região N-terminal anteriormente desestruturada; ii) qual α -hélice original (HA ou HB) é desestruturada na estrutura intermediária resultante do redobramento de PrP.

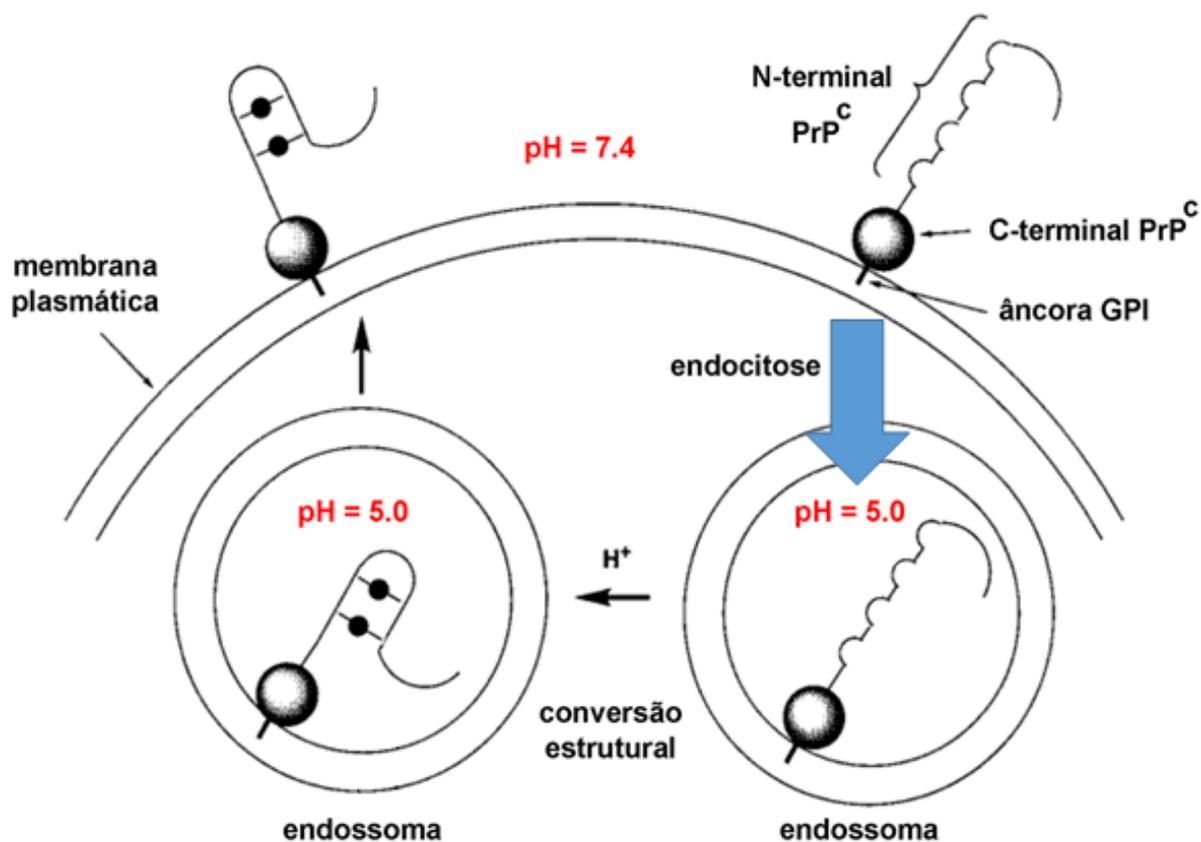


Figura 20: Ciclagem constitutiva da proteína príon celular passando por diferentes condições de pH.⁷⁸

5.1.1 Avaliação geral de todos os campos de força

Para entender os eventos estruturais cruciais na conversão de PrP^C, realizou-se na presente tese um estudo sistemático de dinâmica molecular da proteína príon celular,

detalhando-se múltiplas simulações para vários campos de força: GROMOS96 43a1, GROMOS96 53a6, AMBER99SB, AMBER99SB-ILDN, CHARMM27 e OPLS-AA/L. Como ponto de partida para essas simulações, foi empregada a mesma sequência de aminoácidos da proteína príon celular do hamster Sírio, modelo 11 (fragmento 109-219; PDB ID 2PrP¹⁸). Foram realizadas 60 simulações, considerando 5 réplicas de 100 ns para cada campo de força em condições ácida e neutra. Os resultados para cada campo de força são apresentados como uma média de cinco simulações independentes iniciadas a partir de diferentes velocidades iniciais.

5.1.1.1 Estabilidade das simulações e análises de componentes principais

A Tabela 8, a seguir, mostra o valor da média e do desvio padrão de RMSD de C α do fragmento inteiro da proteína (resíduos 109-219) e das regiões N-terminal (resíduos 109-143) e C-terminal (resíduos 144-219), para as cinco réplicas realizadas em cada campo de força para cada condição de pH.

Tabela 8: Média e desvio padrão de RMSD de C α entre as cinco réplicas para cada um dos campos de força entre 90 e 100 ns de simulação.

Simulação	RMSD de C α (nm) entre 90 e 100 ns					
	N-terminal		C-terminal		TOTAL	
	Média	± Desvio Padrão	Média	± Desvio Padrão	Média	± Desvio Padrão
GROMOS96 53a6_neutro	0,7198	± 0,1503	0,4382	± 0,0797	0,5450	± 0,1027
GROMOS96 53a6_ácido	0,9084	± 0,1772	0,4657	± 0,0097	0,6432	± 0,0825
AMBER99SB_neutro	0,8241	± 0,1519	0,4019	± 0,0794	0,5702	± 0,1062
AMBER99SB_ácido	1,1866	± 0,1287	0,5009	± 0,0474	0,7861	± 0,0687
GROMOS96 43a1_neutro	0,7591	± 0,1109	0,4103	± 0,0627	0,5475	± 0,0714
GROMOS96 43a1_ácido	0,8373	± 0,1927	0,5059	± 0,0894	0,6359	± 0,0967
AMBER99SB-ILDN_neutro	0,8055	± 0,1760	0,3911	± 0,0566	0,5587	± 0,0927
AMBER99SB-ILDN_ácido	0,8260	± 0,1425	0,3490	± 0,0526	0,5496	± 0,0630
OPLS-AA/L_neutro	0,7134	± 0,1752	0,4302	± 0,0692	0,5374	± 0,1051
OPLS-AA/L_ácido	1,0102	± 0,2344	0,5691	± 0,1078	0,7412	± 0,1355
CHARMM27_neutro	0,7359	± 0,0978	0,3615	± 0,0277	0,5117	± 0,0425
CHARMM27_ácido	0,9339	± 0,2692	0,4792	± 0,1292	0,6612	± 0,1685

A Figura 21, a seguir, mostra o valor de RMSD de $C\alpha$ do fragmento inteiro da proteína (resíduos 109-219) em função do tempo de simulação.

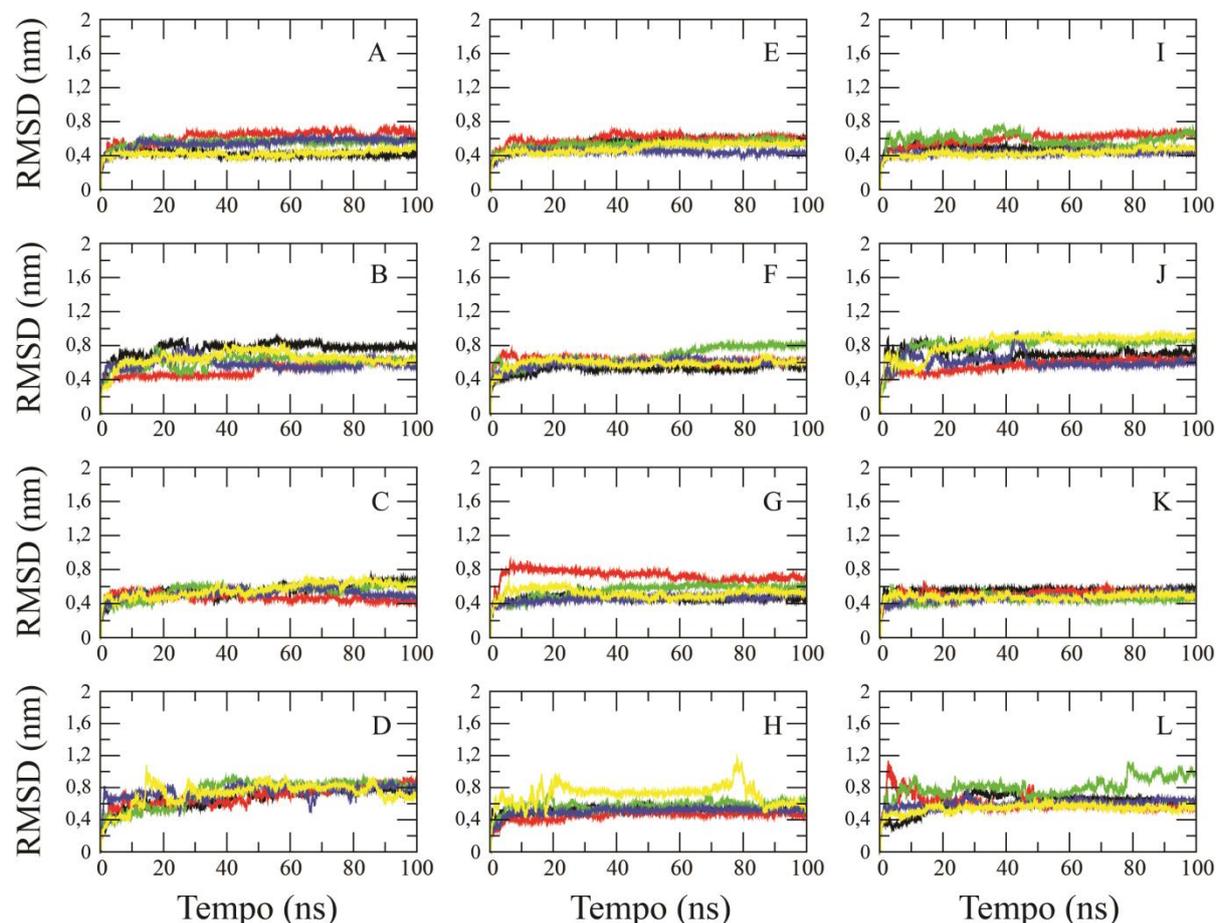


Figura 21: RMSD de $C\alpha$, para o fragmento proteico inteiro (109-219), ao longo do tempo de simulação. Cada gráfico mostra cinco curvas relativas às réplicas para cada campo de força em uma das condições de pH: **A)** GROMOS96 53a6, pH neutro; **B)** GROMOS96 53a6, pH ácido; **C)** AMBER99SB, pH neutro; **D)** AMBER99SB, pH ácido; **E)** GROMOS96 43a1, pH neutro; **F)** GROMOS96 43a1, pH ácido; **G)** AMBER99SB-ILDN, pH neutro; **H)** AMBER99SB-ILDN, pH ácido; **I)** OPLS-AA/L, pH neutro; **J)** OPLS-AA/L, pH ácido; **K)** CHARMM27, pH neutro; **L)** CHARMM27, pH ácido. As cores das curvas correspondem às réplicas: preto = réplica 1; vermelho = réplica 2; verde = réplica 3; azul = réplica 4; amarelo = réplica 5.

Analisando os resultados da Tabela 8 e da Figura 21, observa-se que, para quase todos os campos de força, a média de RMSD das réplicas ácidas é maior do que a das réplicas neutras.

De fato, somente o campo de força AMBER99SB-ILDN mostra comportamento oposto. No entanto, a exclusão da réplica 2 é suficiente para recuperar a mesma tendência apresentada pelos demais campos de força (isso pode ser melhor observado pela Tabela do Apêndice A1, que apresenta os resultados para cada réplica específica).

Foram avaliadas, ainda, as contribuições das regiões N-terminal (resíduos 109-143, Apêndice A2) e C-terminal (resíduos 144-219, incluindo as três α -hélices originais, Apêndice A3). Comparando esses gráficos, observa-se que as curvas de RMSD N-terminais (Apêndice A2) possuem maiores valores de RMSD do que as curvas C-terminais (Apêndice A3). Além disso, o fragmento inteiro da proteína (resíduos 109-219, Tabela 8) possui valores de RMSD inferiores aos das curvas de RMSD N-terminais (Tabela 8) e superiores aos das curvas de RMSD C-terminais (Tabela 8). É importante ressaltar que esse comportamento é observado para todos os campos de força em ambas as condições neutra e ácida. Além disso, é possível associar o padrão de flutuações observado nas curvas de RMSD do fragmento proteico inteiro (Figura 21) com as flutuações observadas nas curvas de RMSD N-terminais (Apêndice A2). O mesmo não é observado para as flutuações das curvas de RMSD C-terminais (Apêndice A3). Esses resultados refletem o fato de a região N-terminal ser um domínio de alta flexibilidade, responsável pelas principais flutuações estruturais da proteína em ambas condições de pH, mais pronunciadamente em pH ácido.

Ainda na Tabela 8, observa-se maiores valores de desvio padrão de RMSD para a região N-terminal do que para a região C-terminal. Esse resultado reforça que a variabilidade da região N-terminal tem maior contribuição para a variabilidade observada entre as réplicas das simulações. Essa variabilidade entre as réplicas, por sua vez, reforça a necessidade de se realizar múltiplas simulações de dinâmica molecular.

Das análises de componentes principais (Apêndices A4-A9), os primeiros dez autovalores explicam cerca de 80 % da variância total em cada uma das 60 simulações de DM. As figuras nos Apêndices A4-A9 (A-E: réplicas neutras; F-J: réplicas ácidas) mostram a projeção das trajetórias de DM sobre o plano definido pelos dois primeiros componentes principais. Desses gráficos, observa-se que cada trajetória explora porções distintas do espaço conformacional. De modo geral, as réplicas ácidas exploram mais amplamente o espaço conformacional do que as réplicas neutras. Uma exceção é percebida para o campo de força GROMOS96 43a1, para o qual observa-se que há uma exploração similar do espaço conformacional para ambas as condições de pH. A discrepância entre as réplicas de DM indicam uma leve, porém importante diferença na exploração do espaço conformacional. Esses

resultados, mais uma vez, corroboram a necessidade de se realizar múltiplas simulações de DM para estabelecer a correta distinção entre as condições neutra e ácida no estudo de conversão conformacional da proteína príon celular.

5.1.1.2 Evolução de estruturas secundárias

De acordo com resultados experimentais, o pH ácido endossomal induz a conversão de PrP^C a PrP^{Sc}.¹⁰⁻¹² Conseqüentemente, espera-se identificar um aumento de folhas- β na região N-terminal de PrP^C quando simulada sob pH ácido. Por outro lado, a estrutura de RMN original deve ser mantida em pH neutro, considerando-se uma situação ideal. Além disso, um bom campo de força deve ser capaz de manter as folhas- β formadas durante a simulação de DM em pH ácido. Ao longo do texto, serão empregadas legendas para designar as estruturas secundárias de acordo com a caracterização espectroscópica de PrP^C por RMN (PDB ID: 2PrP)¹⁸. Dessa forma, HA, HB e HC serão utilizadas para designar as três α -hélices originais, enquanto S1 e S2, para designar as fitas- β originais.

As Figuras 22 a 27, mostram a evolução de estruturas secundárias de resíduos de aminoácidos (obtidas pelo software DSSP) durante as simulações. Avaliando essas figuras, observa-se que os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB apresentam a maior propensão à formação de folhas- β na região N-terminal de PrP^C em pH ácido. Em condição neutra, o campo de força GROMOS96 53a6 permite o desenovelamento das fitas- β S1 e S2 em duas das réplicas (Figura 22 A e D), enquanto nas demais réplicas essas fitas- β são mantidas nos últimos 40 ns de simulação (Figura 22, B, C e E). A α -hélice HB é parcialmente desestruturada em todas as simulações (Figura 22 A-E). Em condição ácida, esse campo de força resulta num significativo aumento de folhas- β na região N-terminal e, concomitantemente, parece estabilizar mais as α -hélices originais (Figura 22 F, G, H e J) do que a condição neutra. Na réplica I, a α -hélice HA é substituída por 5-hélice após 80 ns de simulação (Figura 22 I). Em quase todas as réplicas, a região N-terminal de HB é substituída por uma estrutura curva (bend, do inglês; Figura 22 F, H, I e J).

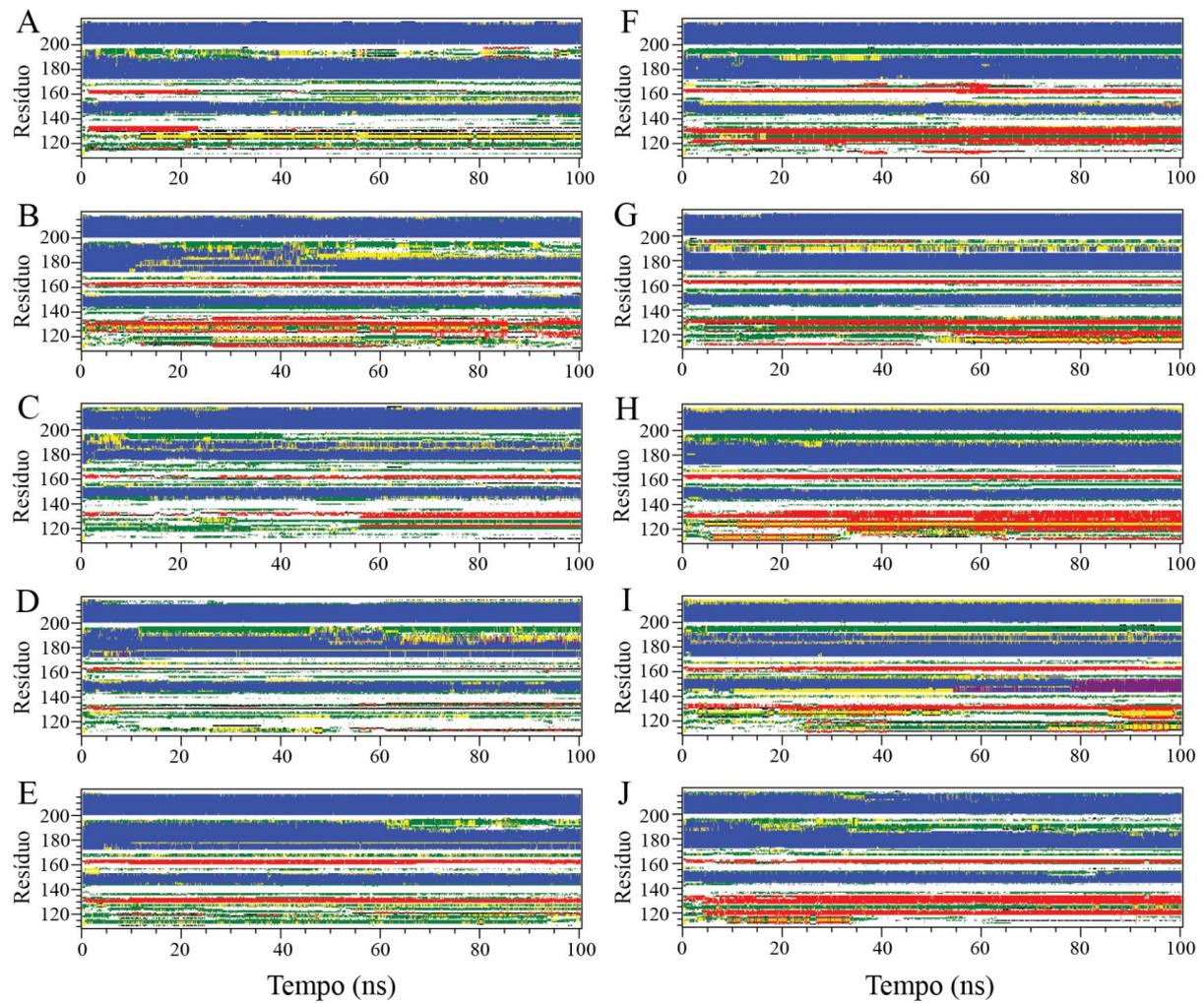


Figura 22: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força GROMOS96 53a6. Cada gráfico (obtido pelo programa DSSP) mostra uma das cinco réplicas para as condições neutra e ácida. A) - E) réplicas neutras; F) - J) réplicas ácidas. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: branco = alça; vermelho = folhas- β ; preto = segmento β ; verde = dobra; amarelo = volta; azul = α -hélice; roxo = 5-hélice; e cinza = 3-hélice.

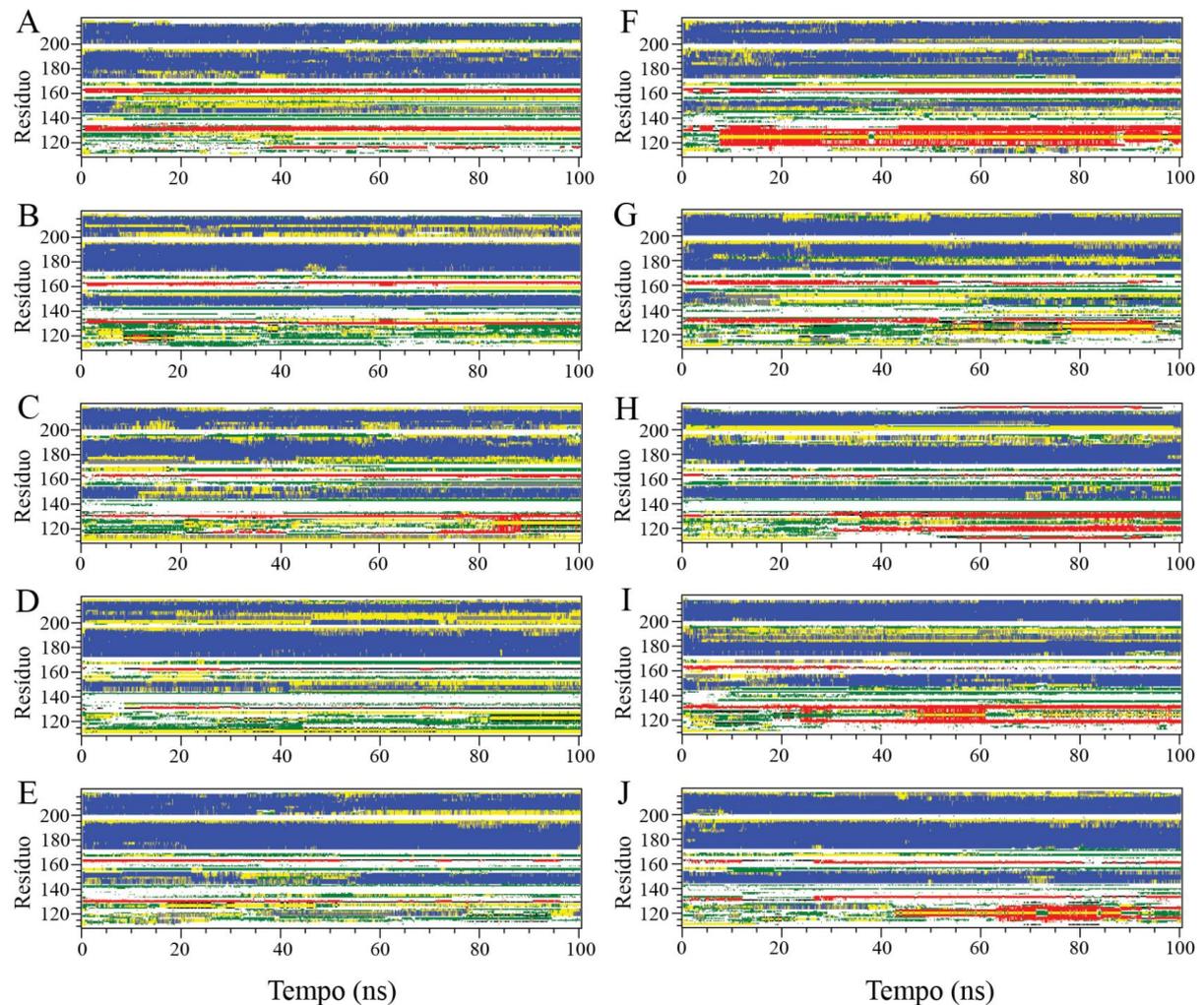


Figura 23: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força AMBER99SB. Cada gráfico (obtido pelo programa DSSP) mostra uma das cinco réplicas para as condições neutra e ácida. A) - E) réplicas neutras; F) - J) réplicas ácidas. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: branco = alça; vermelho = folhas- β ; preto = segmento β ; verde = dobra; amarelo = volta; azul = α -hélice; roxo = 5-hélice; e cinza = 3-hélice.

Para o campo de força AMBER99SB em condição neutra, as fitas- β S1 e S2 assim como as α -hélices HA e HC mostram-se instáveis ou desestruturadas durante as simulações (Figura 23 A-E). Em condição ácida, o conteúdo de folhas- β na região N-terminal tem um significativo aumento em todas as réplicas, com exceção da réplica G (Figura 23 F-J).

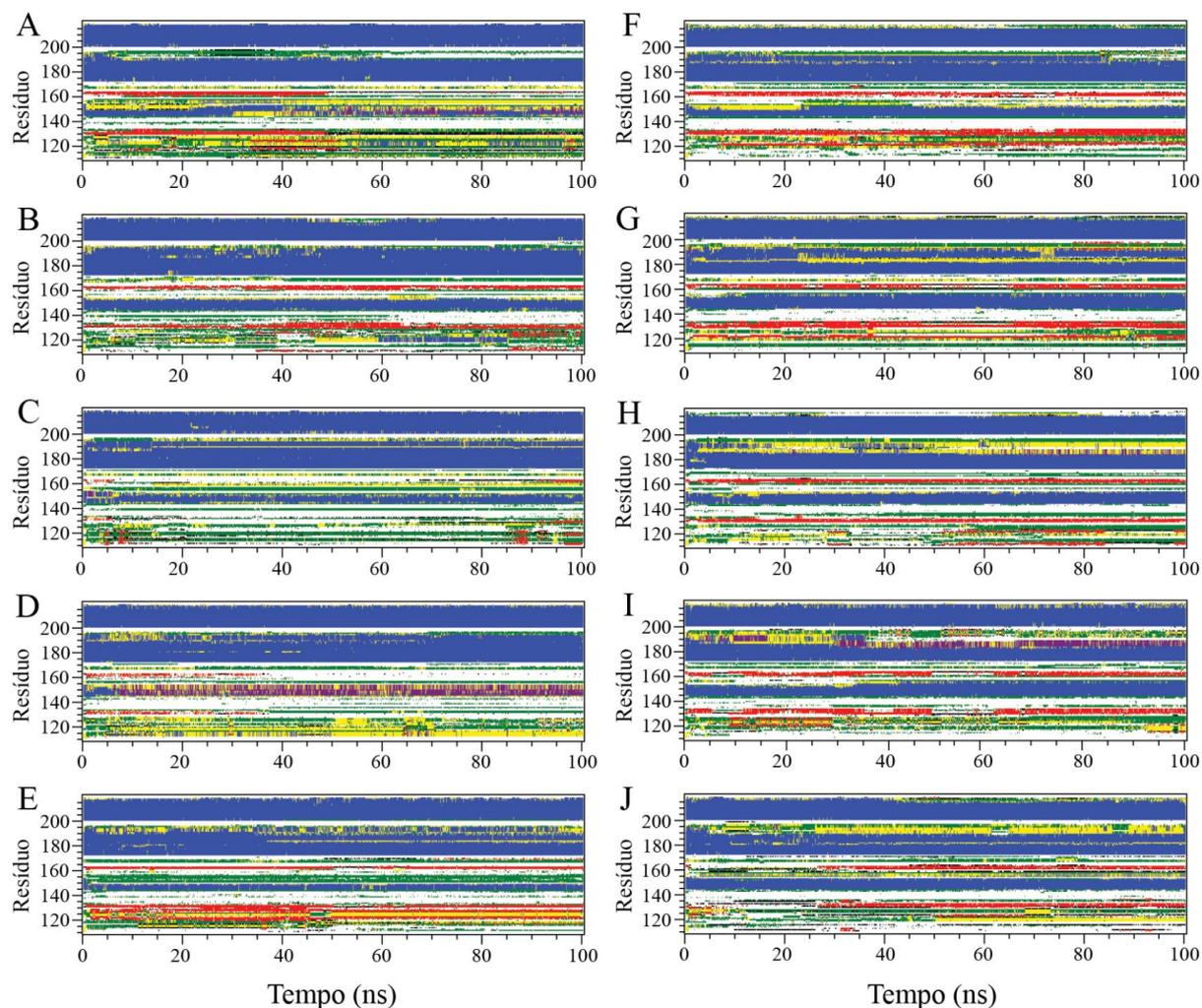


Figura 24: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força GROMOS96 43a1. Cada gráfico (obtido pelo programa DSSP) mostra uma das cinco réplicas para as condições neutra e ácida. A) - E) réplicas neutras; F) - J) réplicas ácidas. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: branco = alça; vermelho = folhas- β ; preto = segmento β ; verde = dobra; amarelo = volta; azul = α -hélice; roxo = 5-hélice; e cinza = 3-hélice.

Para o campo de força GROMOS96 43a1 em condição neutra, as α -hélices HB e HC (Apêndice A12, A-E) mostram-se mais estáveis do que no campo de força GROMOS96 53a6. Na maioria das simulações nessa condição, a α -hélice HA e as fitas- β S1 e S2 são amplamente desestruturadas ao longo das simulações (Figura 24 A, C e D). A região C-terminal da α -hélice HB é desestruturada e as fitas- β S1 e S2 são mantidas na maioria das simulações em pH ácido (Figura 24 F-J). No entanto, comparado aos resultados do campo de força GROMOS96 53a6, ocorre um aumento menos significativo do conteúdo de folhas- β .

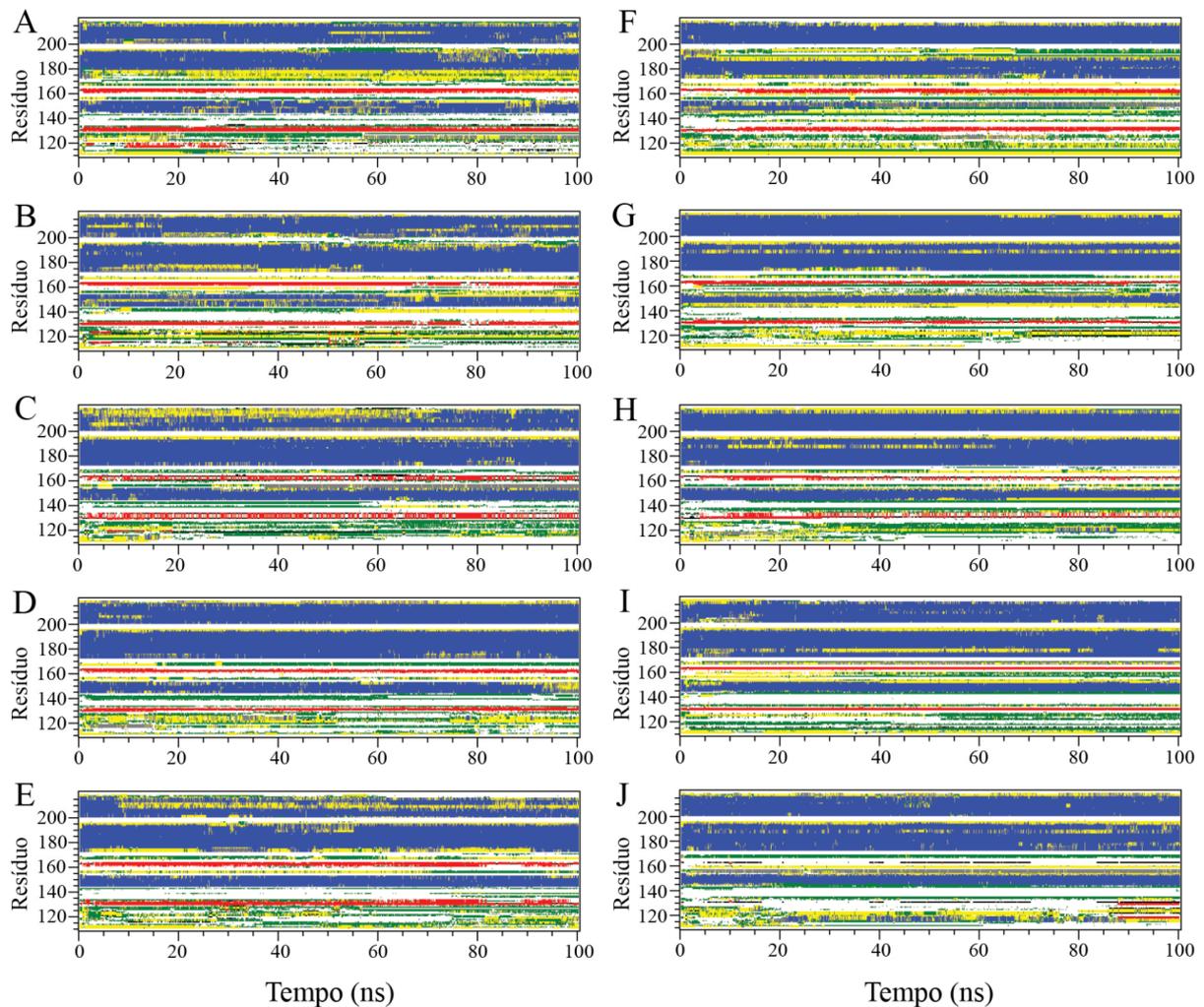


Figura 25: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força AMBER99SB-ILDN. Cada gráfico (obtido pelo programa DSSP) mostra uma das cinco réplicas para as condições neutra e ácida. A) - E) réplicas neutras; F) - J) réplicas ácidas. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: branco = alça; vermelho = folhas- β ; preto = segmento β ; verde = dobra; amarelo = volta; azul = α -hélice; roxo = 5-hélice; e cinza = 3-hélice.

O conteúdo de α -hélices assim como de folhas- β é similar em ambas as condições para o campo de força AMBER99SB-ILDN (Figura 25 A-J). É importante ressaltar que esse resultado contradiz os estudos experimentais que mostram um aumento de folhas- β em condição ácida.

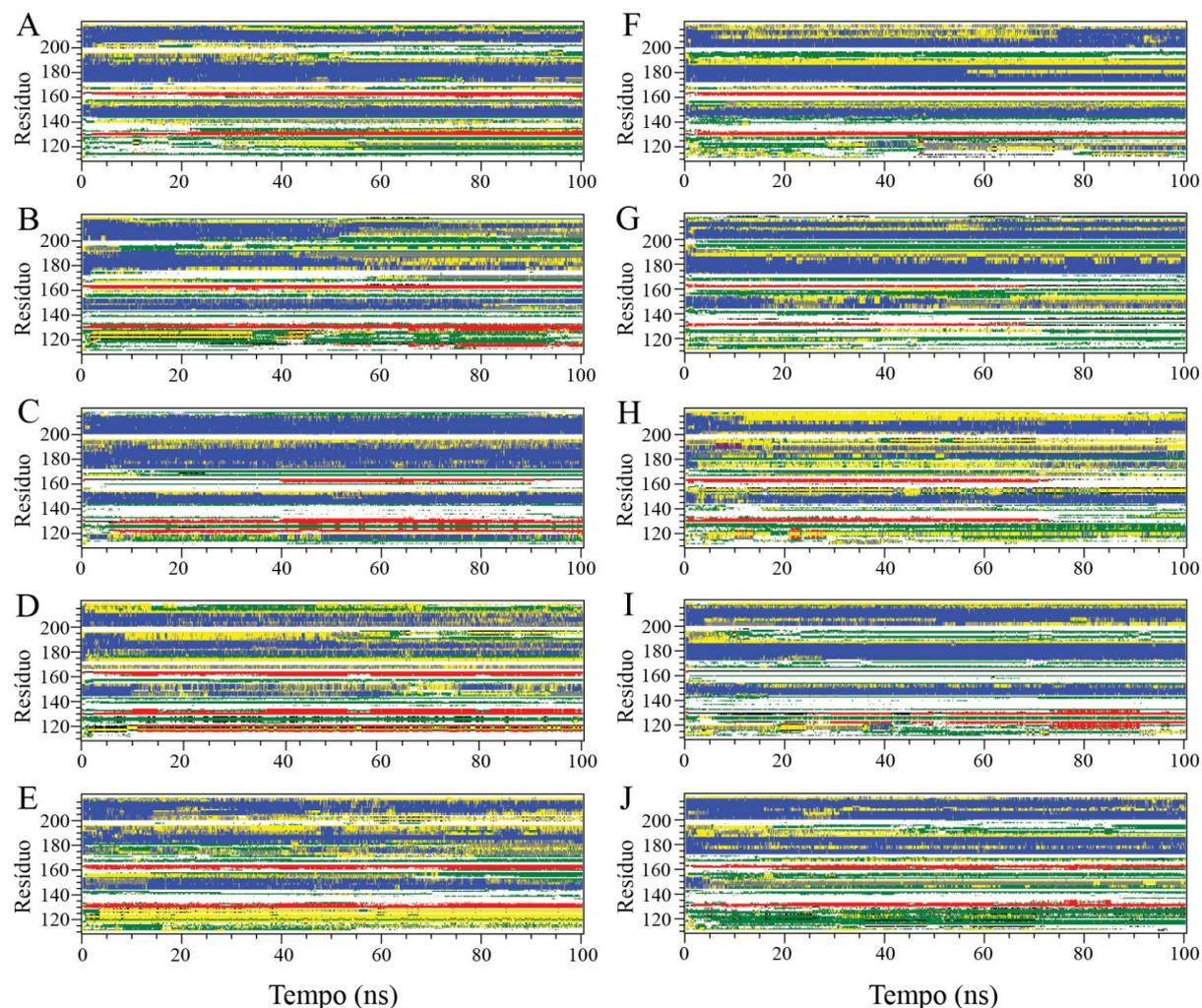


Figura 26: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força OPLS-AA/L. Cada gráfico (obtido pelo programa DSSP) mostra uma das cinco réplicas para as condições neutra e ácida. A) - E) réplicas neutras; F) - J) réplicas ácidas. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: branco = alça; vermelho = folhas- β ; preto = segmento β ; verde = dobra; amarelo = volta; azul = α -hélice; roxo = 5-hélice; e cinza = 3-hélice.

No campo de força OPLS-AA/L, a maioria das estruturas secundárias regulares são desestruturadas. Contradizendo o esperado experimentalmente, observa-se, ainda, um aumento de folhas- β em três réplicas em condição neutra (Figura 26 B-D).

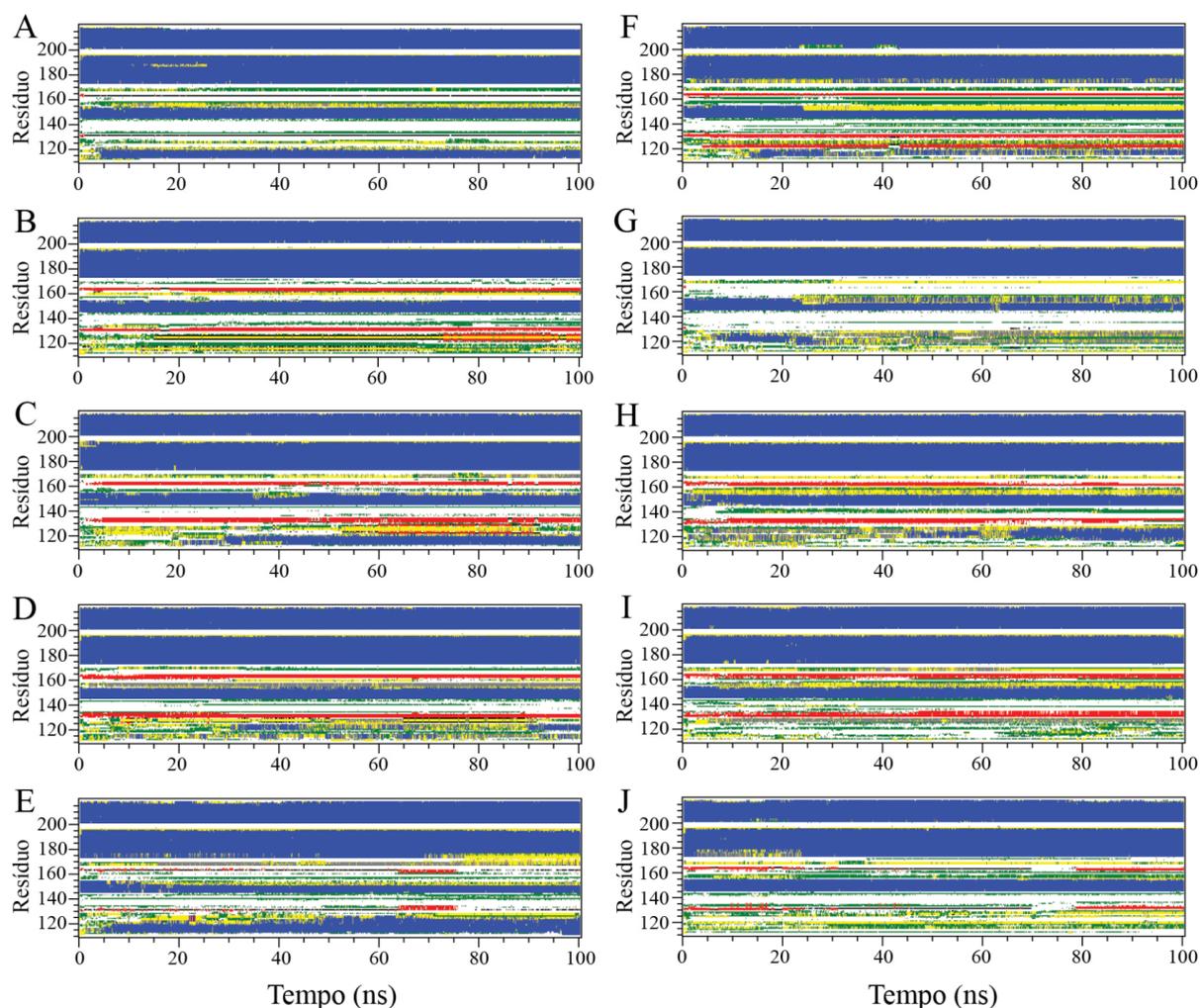


Figura 27: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação para o campo de força CHARMM27. Cada gráfico (obtido pelo programa DSSP) mostra uma das cinco réplicas para as condições neutra e ácida. A) - E) réplicas neutras; F) - J) réplicas ácidas. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: branco = alça; vermelho = folhas- β ; preto = segmento β ; verde = dobra; amarelo = volta; azul = α -hélice; roxo = 5-hélice; e cinza = 3-hélice.

No campo de força CHARMM27, as α -hélices HA, HB e HC mostram-se muito estáveis em condição neutra (Figura 27 A-E), enquanto a região C-terminal da α -hélice HA é desenovelada em algumas das réplicas em pH ácido (Figura 27 F-I). Observa-se também uma tendência à formação de novas α -hélices na região N-terminal em pH neutro (Figura 27 A, C, D e E) e em pH ácido (Figura 27 F, G e H), o que contradiz os resultados experimentais. O conteúdo de folhas- β , por outro lado, é mantido em três réplicas em ambas as condições de pH (Figura 27 B, C, D, F, H e I).

5.1.1.3 Número de resíduos em estruturas secundárias

As Figuras 28 e 29 mostram os valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de resíduos de aminoácidos envolvidos em α -hélices e folhas- β , respectivamente, calculados sobre os últimos 10 ns de simulação. Pela Figura 28, observa-se que o campo de força GROMOS96 53a6 apresenta o maior número médio de resíduos de aminoácidos em folhas- β para o pH ácido. Para esse campo de força, a condição ácida possui um número significativamente maior de folhas- β (14 versus 6 resíduos; Figura 28) e um conteúdo levemente maior de α -hélices (39 versus 38 resíduos; Figura 29) do que a condição neutra. De forma similar, o campo de força AMBER99SB em pH ácido mostra maiores valores médios de resíduos em folhas- β (9 versus 4; Figura 28) e em α -hélices (37 versus 36; Figura 29) do que em pH neutro. Já o campo de força GROMOS96 43a1 em pH ácido apresenta maior número de resíduos em folhas- β (8 versus 5; Figura 28) do que em pH neutro, porém um menor número de resíduos em α -hélices (37 versus 36; Figura 29). O campo de força AMBER99SB-ILDN apresenta o mesmo valor médio de resíduos em α -hélices (41 resíduos; Figura 29) em ambas as condições de pH. Além disso, a condição neutra possui um valor médio de folhas- β levemente maior do que a condição ácida (6 versus 4; Figura 28). O campo de força OPLS-AA/L subestima o conteúdo de α -hélices em ambas as condições de pH. De fato, há uma diminuição mais acentuada de α -hélices em pH neutro (24 versus 28 resíduos; Figura 29). Ressalta-se, ainda, que para esse campo de força, a condição neutra mostra uma maior propensão à formação de folhas- β do que a condição ácida (8 versus 3 resíduos; Figura 28). Por outro lado, o campo de força CHARMM27 superestima o conteúdo de α -hélices (54, em pH neutro, versus 51, em pH ácido; Figura 29). Isso se deve à manutenção das α -hélices originais (HA, HB e HC), mas também relaciona-se com uma tendência que esse campo de força mostra em formar novas α -hélices na região N-terminal (Figura 27 A, C, D, E, F, G, H), pronunciadamente em pH neutro. Além disso, esse campo de força apresenta um baixo conteúdo de folhas- β (5, em pH ácido, versus 4 resíduos, em pH neutro; Figura 28).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

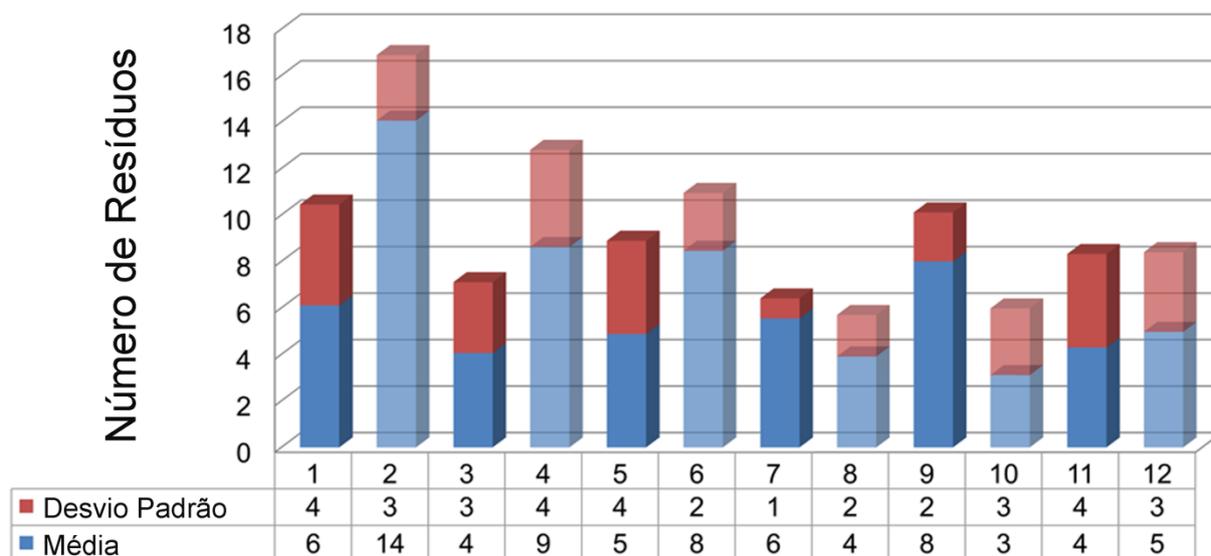


Figura 28: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de resíduos de aminoácidos envolvidos em folhas- β entre 90 e 100 ns de simulação para o fragmento 109-219: 1) GROMOS96 53 a6, pH neutro; 2) GROMOS96 53a6, pH ácido; 3) AMBER99SB, pH neutro; 4) AMBER99SB, pH ácido; 5) GROMOS96 43a1, pH neutro; 6) GROMOS96 43a1, pH ácido; 7) AMBER99SB-ILDN, pH neutro; 8) AMBER99SB-ILDN, pH ácido; 9) OPLS-AA/L, pH neutro; 10) OPLS-AA/L, pH ácido; 11) CHARMM27, pH neutro; 12) CHARMM27, pH ácido.

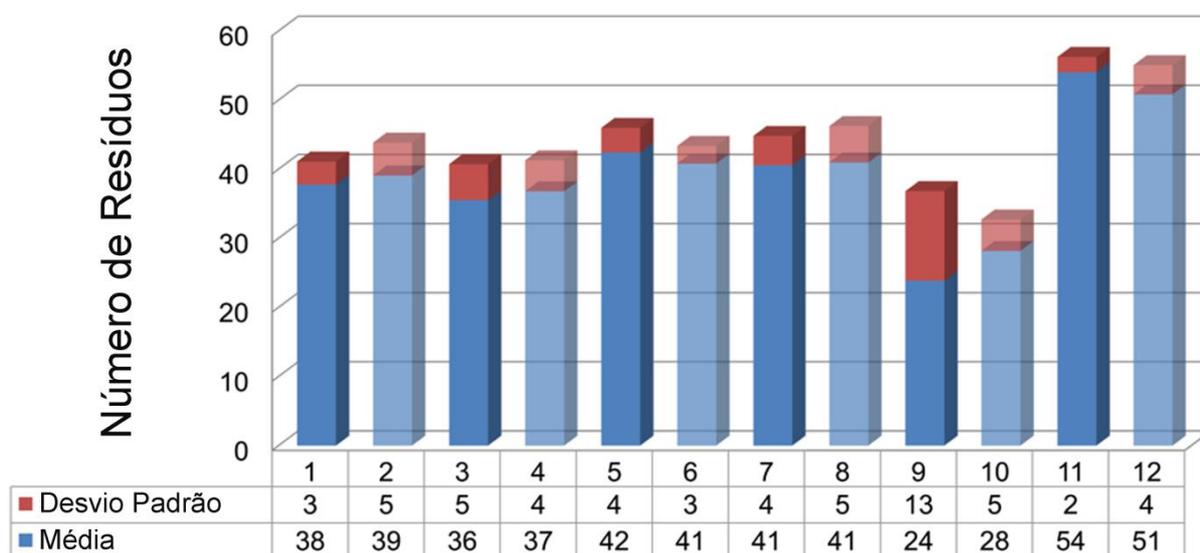


Figura 29: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de resíduos de aminoácidos envolvidos em α -hélices entre 90 e 100 ns de simulação para o fragmento 109-219: 1) GROMOS96 53 a6, pH neutro; 2) GROMOS96 53a6, pH ácido; 3) AMBER99SB, pH neutro; 4) AMBER99SB, pH ácido; 5) GROMOS96 43a1, pH neutro; 6) GROMOS96 43a1, pH ácido; 7) AMBER99SB-ILDN, pH neutro; 8) AMBER99SB-ILDN, pH ácido; 9) OPLS-AA/L, pH neutro; 10) OPLS-AA/L, pH ácido; 11) CHARMM27, pH neutro; 12) CHARMM27, pH ácido.

De maneira geral, observa-se que somente os campos de força GROMOS96 53a6, AMBER99SB e GROMOS96 43a1 apresentam maiores conteúdos de folhas- β em pH ácido do que em pH neutro (Figura 28). Em relação ao campo de força GROMOS96, o conjunto de parametrização 53a6 possui melhor performance (em relação à formação de folhas- β) em pH ácido do que o conjunto de parametrização 43a1. Adicionalmente, os campos de força AMBER99SB-ILDN e OPLS-AA/L exibem maiores conteúdos de folhas- β em pH neutro do que em pH ácido (Figura 28). Finalmente, o campo de força CHARMM27 mostra conteúdos similares de folhas- β em ambas as condições de pH (Figura 28). Em relação ao conteúdo de α -hélices, observa-se que os campos de força GROMOS96 53a6, AMBER99SB, GROMOS96 43a1 e AMBER99SB-ILDN apresentam valores médios similares, enquanto os campos de força OPLS-AA/L e CHARMM27 mostram maiores discrepâncias em relação aos demais. Dentre todos os campos de força, o OPLS-AA/L exibe o maior desenovelamento de α -hélices, enquanto o CHARMM27 apresenta o maior conteúdo de α -hélices (em ambas as condições de pH; Figura 29).

5.1.1.4 Ligações de hidrogênio

A Figura 30 mostra os valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) das ligações de hidrogênio intermoleculares, calculados para os últimos 10 ns de simulação.

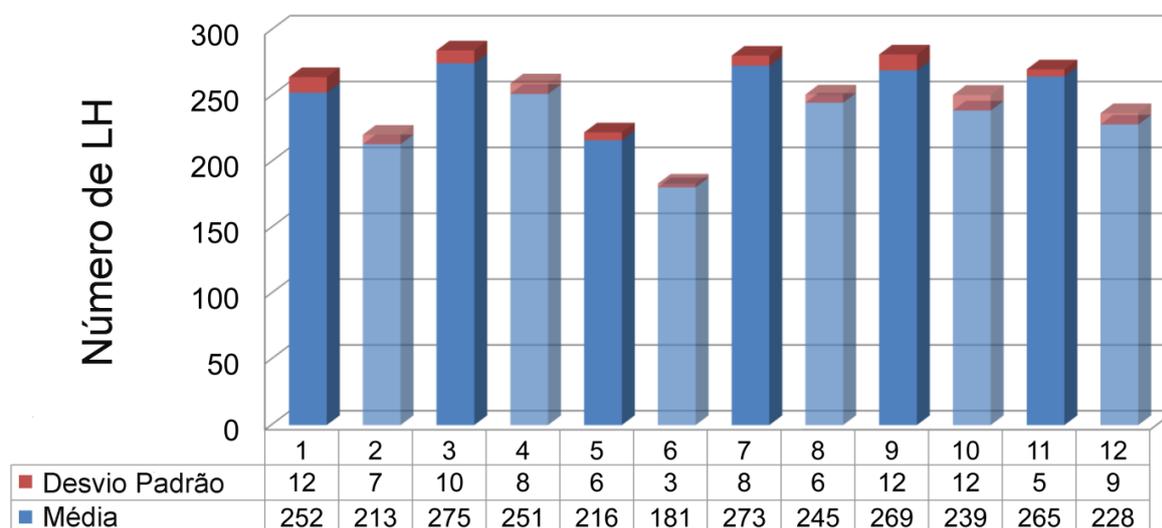


Figura 30: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intermoleculares, calculados para os últimos 10 ns de simulação para o fragmento 109-219. 1) GROMOS96 53 a6, pH neutro; 2) GROMOS96 53a6, pH ácido; 3) AMBER99SB, pH neutro; 4) AMBER99SB, pH ácido; 5) GROMOS96 43a1, pH neutro; 6) GROMOS96 43a1, pH ácido; 7) AMBER99SB-ILDN, pH neutro; 8) AMBER99SB-ILDN, pH ácido; 9) OPLS-AA/L, pH neutro; 10) OPLS-AA/L, pH ácido; 11) CHARMM27, pH neutro; 12) CHARMM27, pH ácido.

Da Figura 30, observa-se que as simulações em pH neutro mostram maior número médio de ligações de hidrogênio do que as simulações em pH ácido. Isso indica que as estruturas em condição neutra apresentam maior solubilidade em água do que as estruturas em condição ácida, como já era esperado, dada a conhecida insolubilidade de PrP^{Sc}.

As Figuras 31 e 32 mostram os valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares, calculados para os últimos 10 ns de simulação.

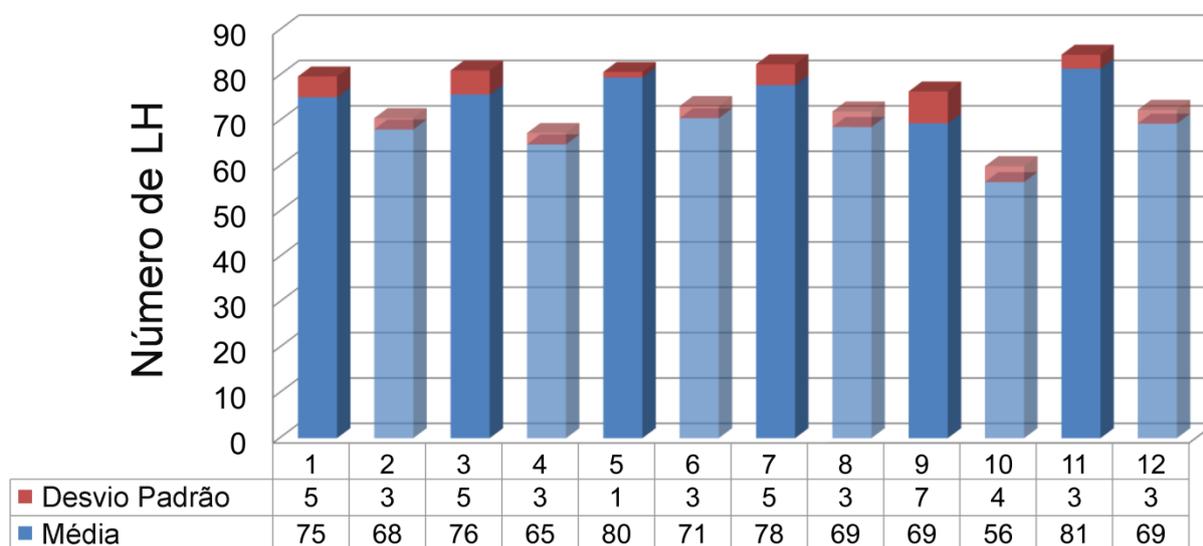


Figura 31: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares totais para o fragmento 109-219, calculados para os últimos 10 ns de simulação: 1) GROMOS96 53 a6, pH neutro; 2) GROMOS96 53a6, pH ácido; 3) AMBER99SB, pH neutro; 4) AMBER99SB, pH ácido; 5) GROMOS96 43a1, pH neutro; 6) GROMOS96 43a1, pH ácido; 7) AMBER99SB-ILDN, pH neutro; 8) AMBER99SB-ILDN, pH ácido; 9) OPLS-AA/L, pH neutro; 10) OPLS-AA/L, pH ácido; 11) CHARMM27, pH neutro; 12) CHARMM27, pH ácido.

Na Figura 31 observa-se que, para todos os campos de força, o número total de ligações de hidrogênio intramoleculares para o fragmento inteiro da proteína (resíduos 109-219) também é maior em condição neutra. Em outras palavras, a soma de todas as ligações de

hidrogênio responsáveis pela manutenção das estruturas secundárias e terciárias é maior em condição neutra.

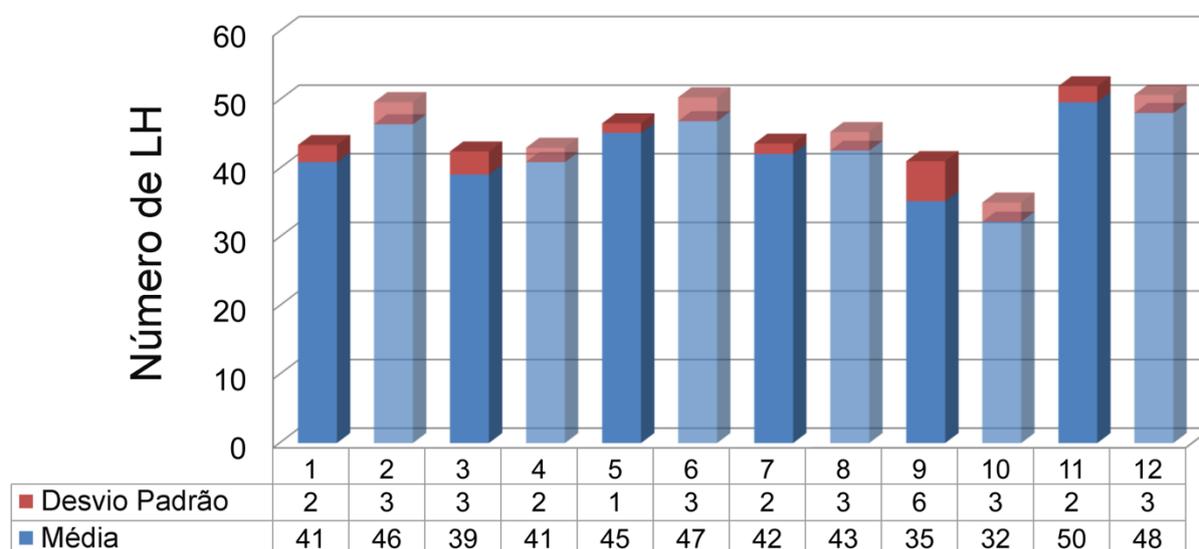


Figura 32: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal para o fragmento 109-219, calculados para os últimos 10 ns de simulação: 1) GROMOS96 53 a6, pH neutro; 2) GROMOS96 53a6, pH ácido; 3) AMBER99SB, pH neutro; 4) AMBER99SB, pH ácido; 5) GROMOS96 43a1, pH neutro; 6) GROMOS96 43a1, pH ácido; 7) AMBER99SB-ILDN, pH neutro; 8) AMBER99SB-ILDN, pH ácido; 9) OPLS-AA/L, pH neutro; 10) OPLS-AA/L, pH ácido; 11) CHARMM27, pH neutro; 12) CHARMM27, pH ácido.

Considerando apenas as ligações de hidrogênio intramoleculares referentes à cadeia principal para o mesmo fragmento de proteína (Figura 32), ocorre uma inversão dessa tendência para os campos de força GROMOS96 53a6, AMBER99SB, GROMOS96 43a1 e AMBER99SB-ILDN. Para esses campos de força, o desenovelamento de estruturas secundárias é maior em condição neutra. Para entender como isso afeta os domínios N-terminal (resíduos 109-143) e C-terminal (resíduos 144-219, incluindo as três α -hélices originais), também foi calculado o número de ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal para essas regiões.

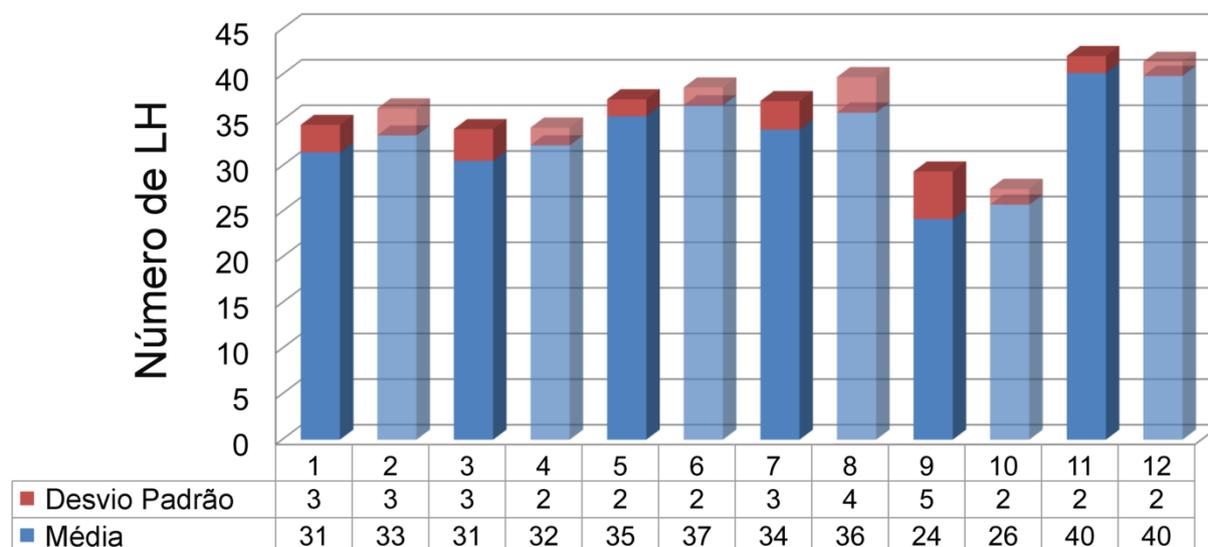


Figura 33: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal para o fragmento 144-219, calculados para os últimos 10 ns de simulação: 1) GROMOS96 53 a6, pH neutro; 2) GROMOS96 53a6, pH ácido; 3) AMBER99SB, pH neutro; 4) AMBER99SB, pH ácido; 5) GROMOS96 43a1, pH neutro; 6) GROMOS96 43a1, pH ácido; 7) AMBER99SB-ILDN, pH neutro; 8) AMBER99SB-ILDN, pH ácido; 9) OPLS-AA/L, pH neutro; 10) OPLS-AA/L, pH ácido; 11) CHARMM27, pH neutro; 12) CHARMM27, pH ácido.

A partir da Figura 33, observa-se que o número médio de ligações de hidrogênio intramoleculares C-terminal é maior em pH ácido para quase todos os campos de força. Somente o campo de força CHARMM27 apresenta o mesmo valor médio para ambas as condições de pH. Esses resultados corroboram nossas conclusões sobre o número médio de resíduos de α -hélices, já discutidos na Figura 29.

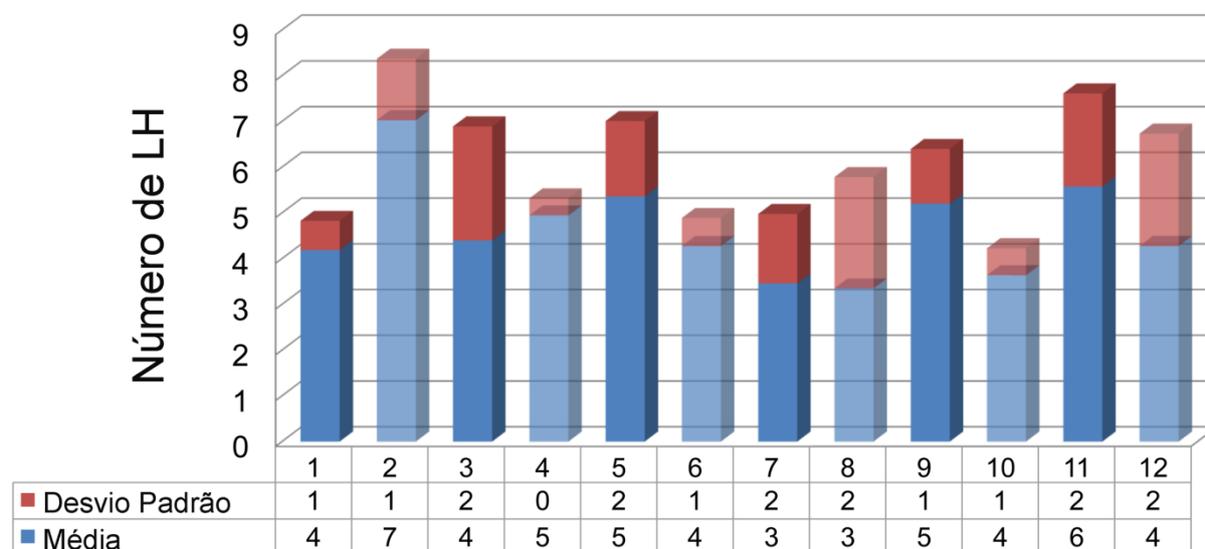


Figura 34: Valores de média e desvio padrão (entre as cinco réplicas) de ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal para o fragmento 109-143, calculados para os últimos 10 ns de simulação: 1) GROMOS96 53 a6, pH neutro; 2) GROMOS96 53a6, pH ácido; 3) AMBER99SB, pH neutro; 4) AMBER99SB, pH ácido; 5) GROMOS96 43a1, pH neutro; 6) GROMOS96 43a1, pH ácido; 7) AMBER99SB-ILDN, pH neutro; 8) AMBER99SB-ILDN, pH ácido; 9) OPLS-AA/L, pH neutro; 10) OPLS-AA/L, pH ácido; 11) CHARMM27, pH neutro; 12) CHARMM27, pH ácido.

A partir da Figura 34, observa-se que GROMOS96 53a6 e AMBER99SB são os únicos campos de força em que o número médio de ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal no domínio N-terminal é maior em pH ácido do que em pH neutro. Este resultado está de acordo com o maior número de resíduos em folhas- β na região N-terminal, como discutido anteriormente na Figura 28. Por outro lado, os campos de força GROMOS96 43a1, OPLS-AA/L e CHARMM27 mostram valores maiores em pH neutro, enquanto o AMBER99SB-ILDN mostra o mesmo valor em ambas as condições de pH (Figura 34). Esses resultados não se correlacionam perfeitamente com o conteúdo de folhas- β apresentado na Figura 28. No entanto, isso já é esperado em alguns casos, uma vez que as ligações de hidrogênio intramoleculares da cadeia principal são a soma das ligações de hidrogênio em todas as estruturas secundárias e não apenas das ligações de hidrogênio responsáveis pela formação de α -hélices e folhas- β .

5.1.1.5 Flexibilidade de resíduos de aminoácidos

A Figura 35 mostra os gráficos de RMSF de $C\alpha$ para o intervalo de 0 a 100 ns de simulação para o fragmento 109-219. Cada curva representa a média entre as cinco réplicas em cada condição. As regiões correspondentes às estruturas secundárias (folhas- β : S1 e S2; α -hélices: HA, HB e HC) são identificadas em cada gráfico dessa figura. Também foram analisados os gráficos de RMSF de $C\alpha$ a cada 20 ns para cada campo de força individualmente em cada condição de pH (Apêndices A10-A15). Para o campo de força GROMOS96 53a6 (Figura 35 A), as curvas neutra e ácida mostram flexibilidades similares. Exceção pode ser observada na região N-terminal (resíduos 109-120), onde a curva ácida tem maior flexibilidade. Outra diferença entre as curvas é um pico (ao redor do resíduo 193) de maior flexibilidade (0.46 nm) na condição neutra. Analisando a figura do Apêndice A10, observa-se que apenas os três primeiros intervalos de tempo (0-20, 20-40 e 40-60 ns, Apêndice A10, A-C) apresentam flexibilidade significativamente maior na região N-terminal para a condição ácida. Além disso, a maior flexibilidade na condição neutra (em torno do resíduo 193) surge apenas nos últimos dois intervalos de tempo (60-80 e 80-100 ns, Apêndice A10, D-E). Isso está relacionado à desestruturação N-terminal da α -hélice HB nas réplicas neutras D e E (Figura 22 D e E, respectivamente) nesses intervalos de tempo.

Para o campo de força AMBER99SB (Figura 35 B), a curva neutra possui menor flexibilidade do que a curva ácida ao longo de toda a sequência de aminoácidos. Este comportamento é observado em todos os intervalos de tempo (0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100 ns, Apêndice A11 A-E, respectivamente). Os campos de força GROMOS96 43a1 e AMBER99SB-ILDN (Figura 35 C e D, respectivamente) exibem comportamento semelhante em ambas as condições de pH, incluindo a região N-terminal. Esse mesmo comportamento é observado nos intervalos de tempo específicos nos gráficos de RMSF de $C\alpha$ (0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100ns, Apêndice A12, A-E, e Apêndice A13, A-E, respectivamente). Para os campos de força OPLS-AA/L (Figura 35 E) e CHARMM27 (Figura 35 F), as curvas ácidas apresentam maior flexibilidade do que as curvas neutras. Analisando o RMSF de $C\alpha$ para os intervalos de tempo específicos, para ambos os campos de força, observa-se que os três primeiros intervalos de tempo apresentam discrepâncias entre as condições neutras e ácidas (Apêndice A14, A-C, e Apêndice A15, A-C, respectivamente). No entanto, nos últimos dois intervalos de tempo, as curvas convergem a um padrão de flexibilidade muito similar, inclusive na região N-terminal (Apêndice A14, D-E e Apêndice A15, D-E).

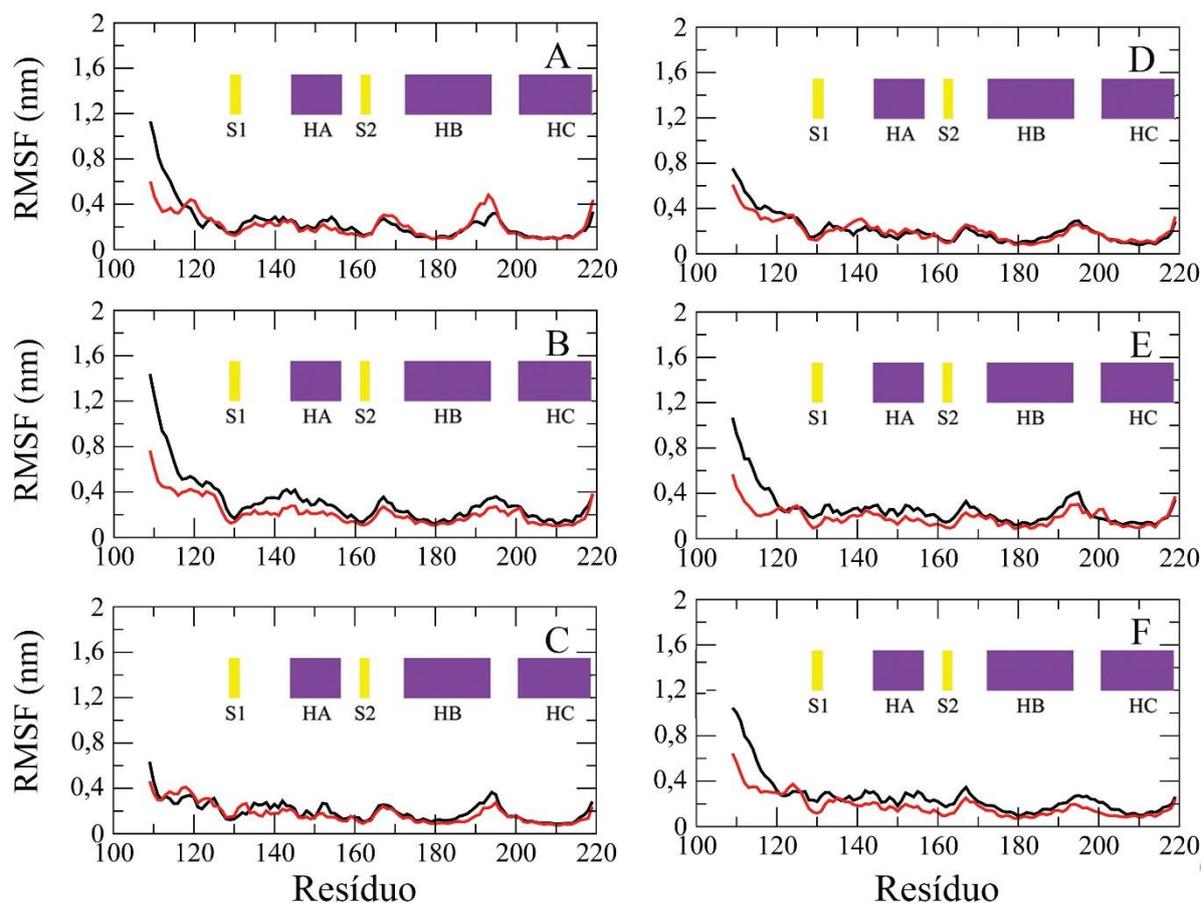


Figura 35: RMSF de $C\alpha$ para o intervalo de 0 a 100 ns de simulação para o fragmento 109-219: a) GROMOS96 53a6; b) AMBER99SB; c) GROMOS96 43a1; d) AMBER99SB-ILDN; e) OPLS-AA/L; f) CHARMM27. Legenda: curvas pretas = média entre as réplicas ácidas; curvas vermelhas = média entre as réplicas neutras.

Na Figura 35 observa-se ainda que para todos os campos de força, as curvas nas duas condições de pH apresentam valores de RMSF de $C\alpha$ inferiores a 0.45 nm. Somente as regiões N-terminais (resíduos 109-125) apresentam maiores valores de flexibilidade. De fato, somente os campos de força GROMOS96 53a6, AMBER99SB, OPLS-AA/L e CHARMM27 mostram altas flexibilidades N-terminais, atingindo valores superiores a 1.0 nm para a condição ácida. Por outro lado, os campos de força GROMOS96 43a1 e AMBER99SB-ILDN apresentam comportamentos muito semelhantes em ambas as condições de pH, inclusive na região N-terminal.

5.1.2 Análises adicionais para os campos de força selecionados

De acordo com as análises coletivas, conclui-se que o campo de força OPLS-AA/L subestima o conteúdo de α -hélices, enquanto o campo de força CHARMM27 o superestima.

Consequentemente, esses campos de força não parecem a melhor opção para estudar a conversão da proteína príon celular. Por outro lado, os campos de força GROMOS96 43a1 e AMBER99SB-ILDN não permitem uma distinção significativa entre as condições de pH. Já os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB apresentam os maiores acréscimos no conteúdo de folhas- β , assim como o maior número de ligações de hidrogênio intramoleculares na cadeia principal do domínio N-terminal sob pH ácido. Além disso, esses campos de força reproduzem de forma satisfatória a condição neutra. Portanto, selecionou-se uma das cinco réplicas em ambas as condições de pH como as simulações mais representativas para cada um desses campos de força. Nas próximas seções, serão discutidos em detalhes a estabilidade e alguns aspectos estruturais relevantes observados durante essas simulações.

5.1.2.1 Estabilidade das simulações

A Figura 36 mostra os valores de RMSD de $C\alpha$ em função do tempo de simulação. Para o campo de força GROMOS96 53a6, os valores médios de RMSD para condições ácida e neutra nos últimos 5 ns são de 0,64 e 0,49 nm, respectivamente (Figura 36 A). No campo de força AMBER99SB, as simulações ácida e neutra atingem, nos últimos 5 ns, 0,74 e 0,41 nm, respectivamente (Figura 36 B). Em ambos os campos de força, as simulações em condição ácida desviam mais das estruturas iniciais do que aquelas em condição neutra. Este resultado concorda com estudos experimentais *in vitro* que indicam maiores mudanças estruturais na proteína príon celular sob pH ácido.

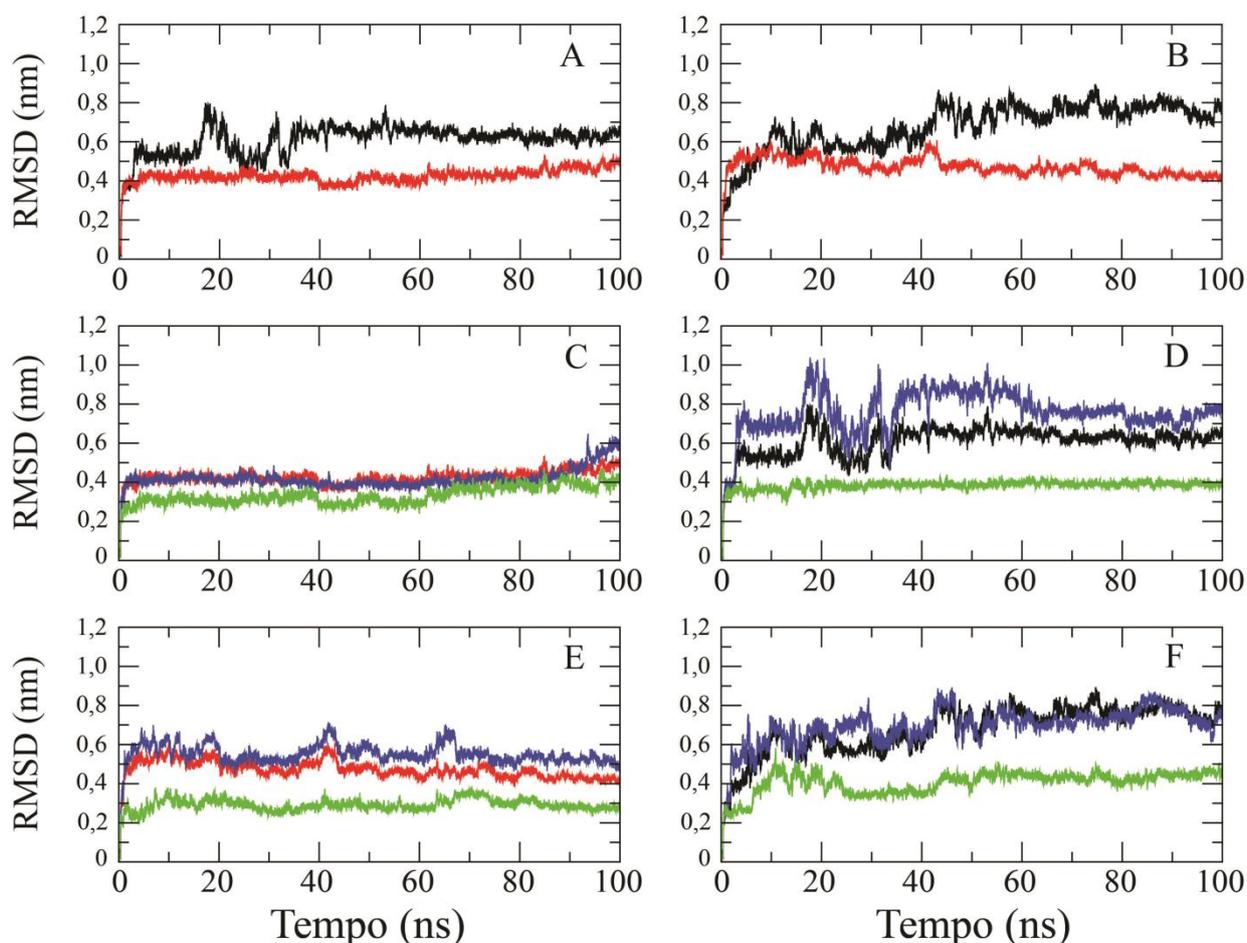


Figura 36: RMSD de $C\alpha$ em função do tempo de simulação: **A)** GROMOS96 53a6; condições ácida e neutra; **B)** AMBER99SB; condições ácida e neutra; **C)** GROMOS96 53a6, pH neutro; **D)** GROMOS96 53a6, pH ácido; **E)** AMBER99SB, pH neutro; **F)** AMBER99SB, pH ácido. As curvas pretas e vermelhas representam o RMSD sob toda a sequência de aminoácidos (109-219) sob pH ácido e neutro, respectivamente. As curvas azuis representam o RMSD na região N-terminal (109-143). As curvas verdes representam o RMSD sob a região C-terminal (144-219).

Para avaliar a contribuição isolada das porções N-terminal e C-terminal, também foram analisadas as curvas de RMSD de $C\alpha$ referentes a esses domínios. A Figura 36 (C-F) mostra uma comparação entre as curvas de RMSD do fragmento inteiro da proteína (resíduos 109-219) em relação às regiões N-terminal (resíduos 109-143) e C-terminal (resíduos 144-219, incluindo os três originais α -hélices). Para o campo de força GROMOS96 53a6 em pH neutro (Figura 30 C), os valores médios de RMSD para os fragmentos N-terminal (curva azul), total (curva vermelha) e C-terminal (curva verde) nos últimos 5 ns são de 0,59, 0,49 e 0,41 nm, respectivamente. Em pH ácido (Figura 36 D), os valores médios de RMSD são de 0,76, 0,64 e

0,38 nm, respectivamente. Os valores similares de RMSD C-terminal, assumidos pelas condições neutra e ácida, enfatizam que a principal diferença entre essas condições reside na região N-terminal. Para o campo de força AMBER99SB em pH neutro (Figura 36 E), os valores médios de RMSD para os fragmentos N-terminal (curva azul), total (curva preta) e C-terminal (curva verde) nos últimos 5 ns são de 0,49, 0,41 e 0,27 nm, respectivamente. Em pH ácido (Figura 36 F), os valores médios de RMSD foram de 0,74, 0,74 e 0,43 nm, respectivamente. Para esse campo de força, ambas as regiões N-terminal e C-terminal contribuem para diferenças entre as condições ácida e neutra. De fato, as porções N-terminal e C-terminal se desviam mais da estrutura inicial na condição ácida do que na neutra. A Figura 36 (C-F) mostra que o comportamento das curvas de RMSD do fragmento inteiro (resíduos 109-219) está intrinsecamente relacionado com a flexibilidade da região N-terminal.

5.1.2.2 Números de resíduos em estruturas secundárias

A Figura 37 mostra o número de resíduos de aminoácidos envolvidos com estruturas secundárias específicas durante o tempo de simulação. Para o campo de força GROMOS96 53a6 a pH neutro (Figura 37 A), o teor de α -hélices diminui de 47 para 41 resíduos, enquanto o conteúdo de folhas- β aumenta de 4 para 10 resíduos. De fato, observa-se o alongamento C-terminal de S1 e N-terminal de S2 entre 10 e 67 ns (Figura 22 E). Fitas- β adicionais também são formadas nessas regiões. O desenovelamento C-terminal de HB é evidenciado como uma forte redução no conteúdo de α -hélices após 60 ns (Figura 22 E e Figura 37 A). Em pH ácido (Figura 37 B), observa-se uma redução no teor de α -hélices de 46 a 41 resíduos e um incremento na estrutura da folhas- β de 6 a 19 resíduos. Além disso, o conteúdo de alças (*coils*) diminuiu de 32 para 27 resíduos, como evidência adicional do alongamento da folhas- β na região N-terminal (Figura 22 H e Figura 37 B). Ao final da simulação, ambas as condições de pH apresentam valores semelhantes de elementos de dobra (*bend*) e volta (*turn*): aproximadamente cerca de 15 e 7 resíduos, respectivamente (Figura 37 A e B).

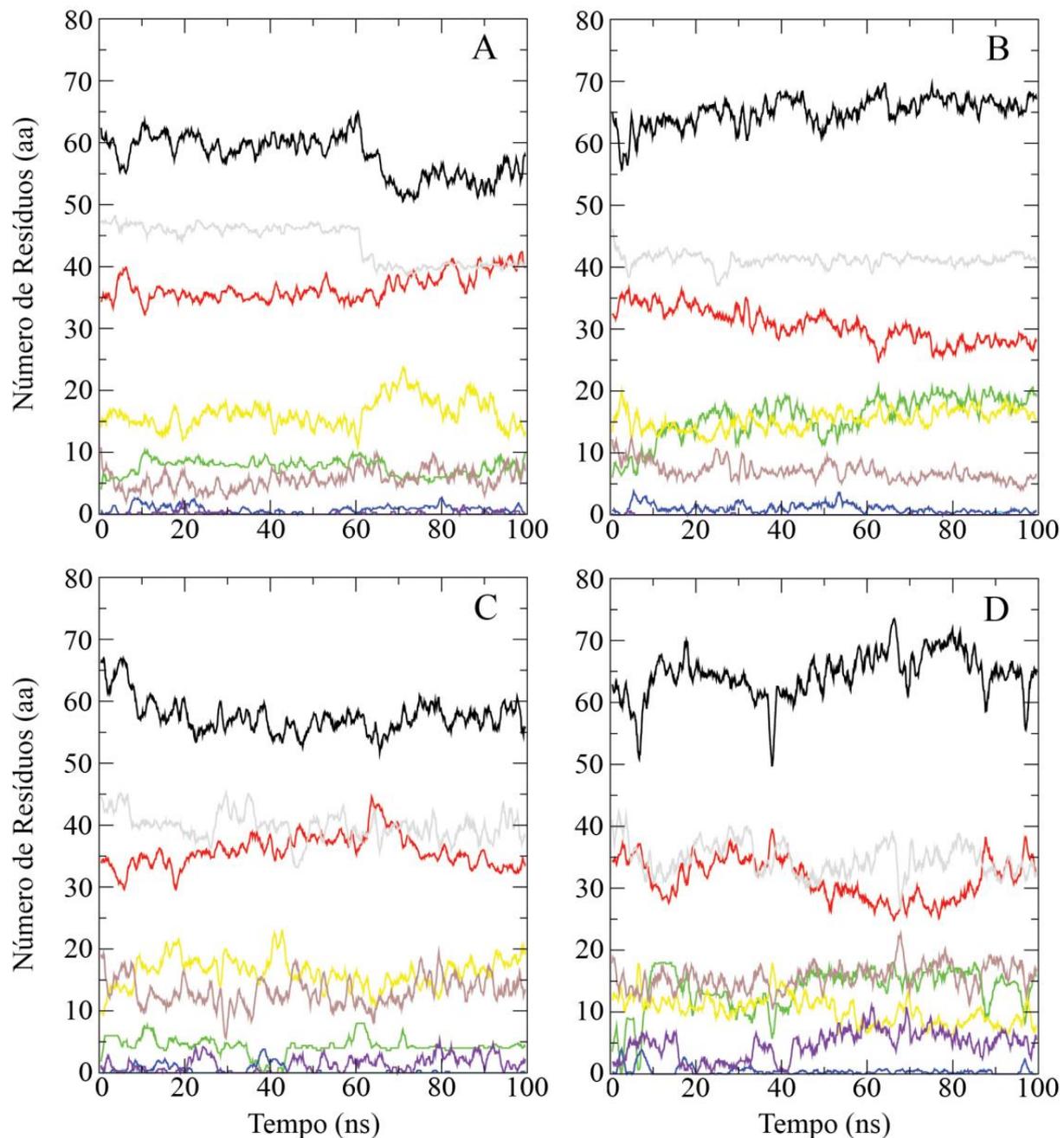


Figura 37: Número de resíduos de aminoácidos por estrutura secundária em função do tempo de simulação (obtido pelo programa DSSP). **A)** GROMOS96 53a6, pH neutro; **B)** GROMOS96 53a6, pH ácido; **C)** AMBER99SB, pH neutro; **D)** AMBER99SB, pH ácido. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: preto = estrutura (soma de α -hélice, folhas- β , segmento- β e volta); vermelho = alça (*coil*); verde = folhas- β ; azul = segmento- β ; amarelo = dobra (*bend*); marrom = volta (*turn*); cinza = α -hélice; azul claro = 5-hélice; roxo = 3-hélice.

Para o campo de força AMBER99SB em pH neutro (Figura 37 C), observa-se uma diminuição do teor de α -hélices de 45 para 38 resíduos e um ligeiro aumento de folhas- β de 2 para 4 resíduos. Em pH ácido (Figura 37 D), observa-se uma diminuição de α -hélices de

41 a 33 resíduos e um concomitante aumento de folhas- β de 4 a 16 resíduos. Para esse campo de força (Figura 37 C e D), a condição ácida apresenta um número significativamente menor de resíduos em dobra (*bend*) do que a condição neutra (7 versus 20 resíduos). Essa discrepância está intimamente relacionada com a região N-terminal que, em condição ácida, é rica em folhas- β e em condição neutra é rica em voltas (*turns*, Figura 23 B e F, respectivamente). Além disso, a condição ácida apresenta maior número de resíduos de volta (*turn*, 16 versus 13) e de 3-hélices (6 contra 2) quando comparada à condição neutra (Figura 37 C e D). O surgimento de ambas dessas estruturas está relacionado ao desenovelamento das α -hélices ao longo das simulações em ambas as condições de pH.

5.1.2.3 Superfície de energia livre

A Figura 38 mostra a superfície de energia livre produzida, plotando a energia livre (kJ/mol) versus o número de resíduos de α -hélices e folhas- β .

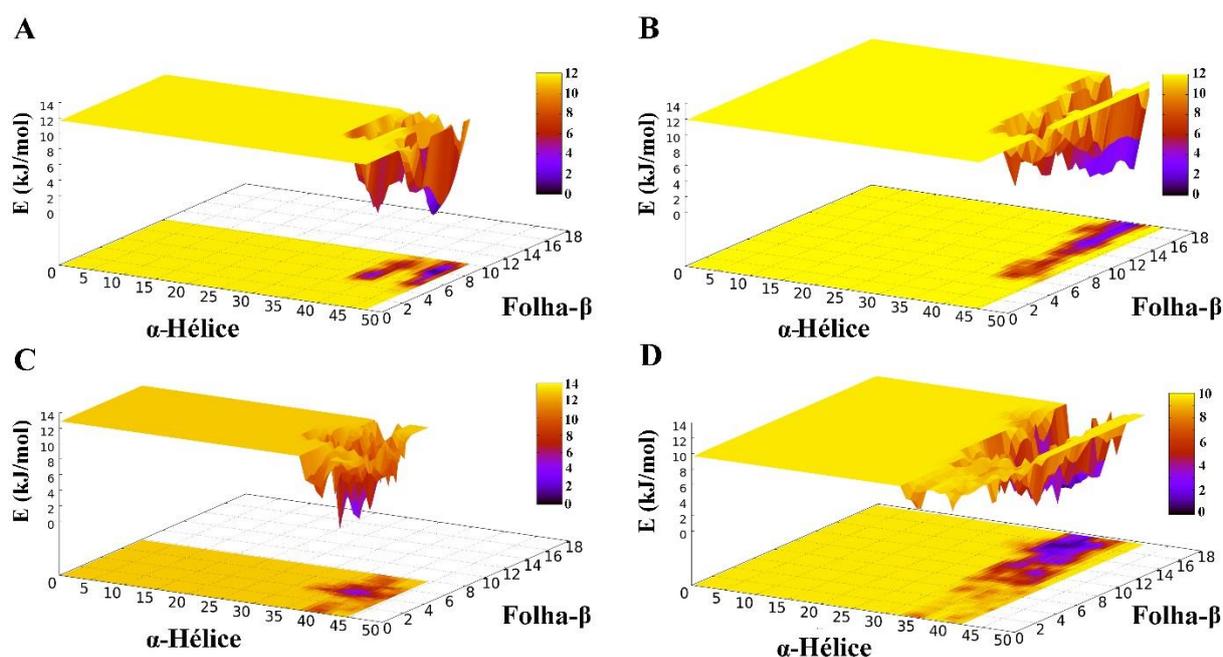


Figura 38: Superfície de energia livre: A) GROMOS96 53a6, pH neutro; B) GROMOS96 53a6, pH ácido; C) AMBER99SB, pH neutro; D) AMBER99SB, pH ácido.

A projeção bidimensional da superfície de energia livre pode ser encontrada no capítulo de Apêndices, Figura A16. Para ambos os campos de força, a condição ácida não apenas resultou em uma superfície de energia livre mais ampla que a neutra, mas também produziu uma exploração mais ampla das regiões de mínimo de energia livre. Para o campo de força

GROMOS96 53a6, observa-se que a condição ácida produz o mesmo valor para o mínimo de energia livre (12 kJ/mol) que a condição neutra (Figura 38 A e B). São encontradas duas regiões de mínimo de energia livre na condição neutra (Figura 38 A), mas apenas uma região de mínimo de energia livre na condição ácida (Figura 38 B). Por outro lado, para o campo de força AMBER99SB, a condição ácida exibiu uma diferença menor em energia livre (10 kJ/mol; Figura 38 D) do que a neutra (14 kJ/mol; Figura 38 C). Para este campo de força, observa-se uma região de mínimo de energia livre significativa em ambas as condições de pH (Figura 38 C e D). Entretanto, sob condição ácida, a região de mínimo de energia livre é mais ampla que a neutra (Figura 38). É interessante notar que, para ambos os campos de força, a energia livre mínima relacionada à condição neutra tem menor conteúdo de folhas- β e maior conteúdo α -helicoidal do que a condição ácida.

5.1.2.4 Ligações de hidrogênio

A estrutura de partida obtida via RMN, PDB ID 2PRP¹⁸, possui duas ligações de hidrogênio associadas a folha- β original: MET129(O)-TYR163(H) e GLY131(H)-VAL161(O). As Figuras 39 e 40 monitoram a distância entre os átomos de oxigênio e hidrogênio para os pares de aminoácidos MET129-TYR163 e GLY131-VAL161, respectivamente, ao longo das simulações. Aqui assume-se que distâncias de cerca de 2 Å correspondem a uma ligação de hidrogênio. Para o campo de força GROMOS96 53a6 em pH neutro, as ligações de hidrogênio originais, MET129(O)-TYR163(H) e GLY131(H)-VAL161(O), bem como duas ligações de hidrogênio adicionais, MET129(H)-TYR163(O) e GLY131(O)-VAL161(H), são observadas ao longo da simulação (Figura 39 A e Figura 40 A, respectivamente). Em pH ácido, apenas as ligações de hidrogênio MET129(O)-TYR163(H), GLY131(H)-VAL161(O) e MET129(H)-TYR163(O) são observadas (Figura 39 B e Figura 40 B, respectivamente).

Para o campo de força AMBER99SB em pH neutro, as ligações de hidrogênio originais, MET129(O)-TYR163(H) e GLY131(H)-VAL161(O), são mantidas durante toda a simulação. A ligação de hidrogênio MET129(H)-TYR163(O) é observada somente após 40 ns, enquanto GLY131(O)-VAL161(H) é mantida apenas até 40 ns (Figura 39 C e Figura 40 C, respectivamente). Em pH ácido, as ligações de hidrogênio MET129(O)-TYR163(H) e GLY131(H)-VAL161(O) são mantidas ao longo da simulação, enquanto MET129(H)-TYR163(O) é observada apenas até 60 ns (Figura 39 D e Figura 40 D). Por outro lado,

GLY131(O)-VAL161(H) excede a distância de ligação de hidrogênio permitida (atingindo valores em torno de 4,5 Å) durante toda a simulação (Figura 40 D).

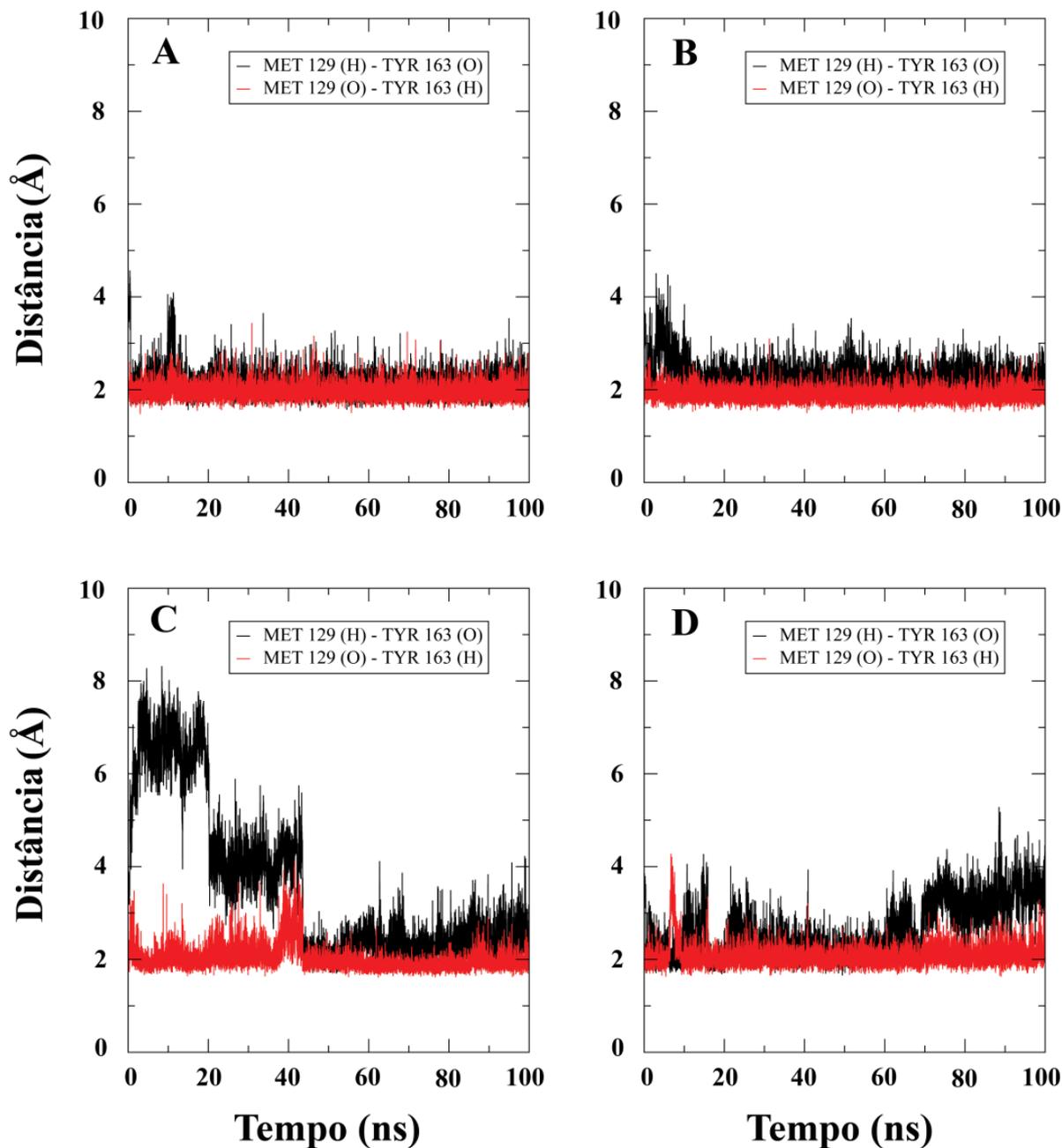


Figura 39: Distância entre os átomos de oxigênio e hidrogênio dos resíduos de aminoácidos MET129 e TYR163 ao longo do tempo de simulação: A) GROMOS96 53a6, pH neutro; B) GROMOS96 53a6, pH ácido; C) AMBER99SB, pH neutro; D) AMBER99SB, pH ácido.

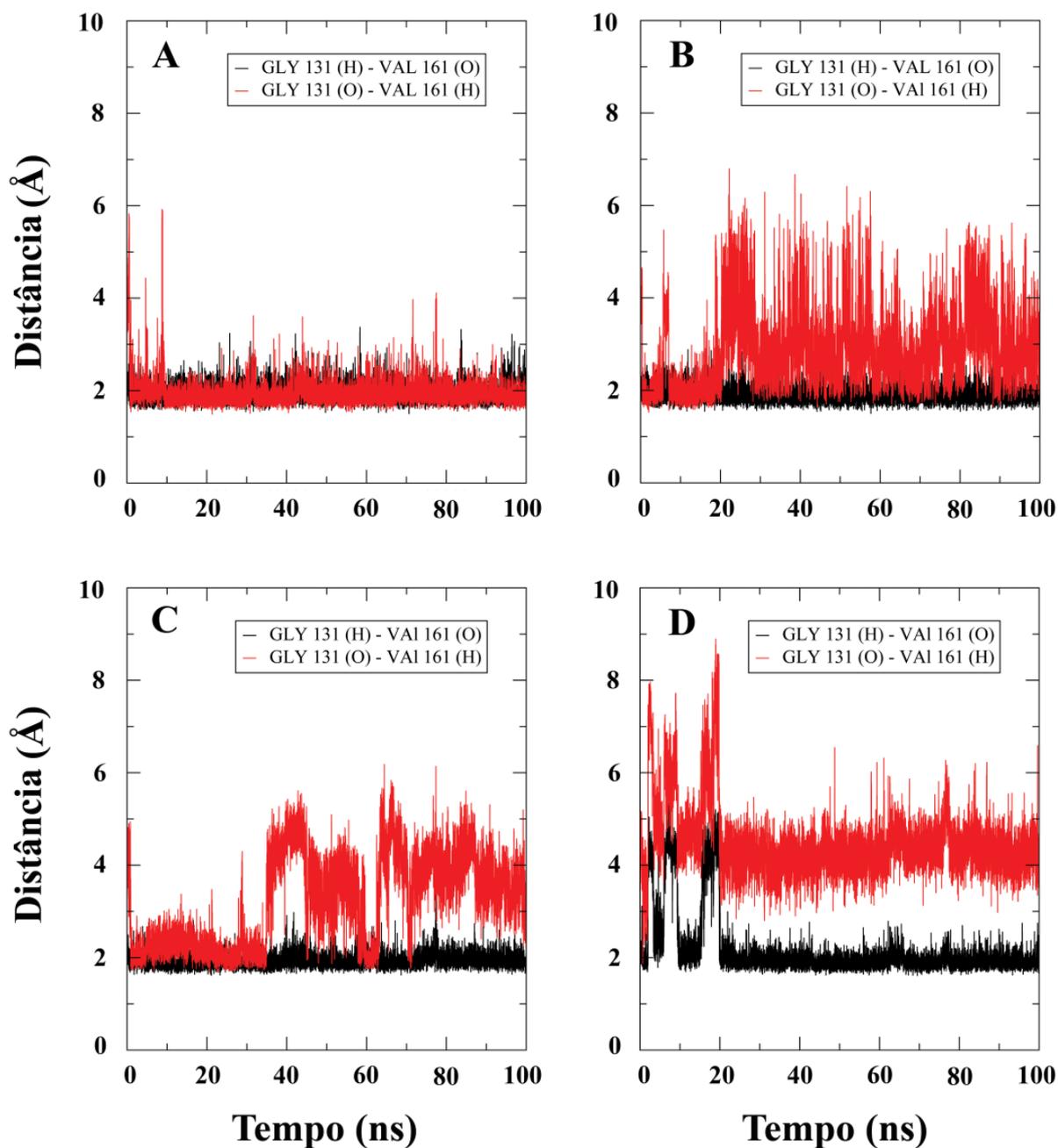


Figura 40: Distância entre os átomos de oxigênio e hidrogênio dos resíduos de aminoácidos GLY131 e MET161 ao longo do tempo de simulação: A) GROMOS96 53a6, pH neutro; B) GROMOS96 53a6, pH ácido; C) AMBER99SB, pH neutro; D) AMBER99SB, pH ácido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 9 sintetiza as ligações de hidrogênio da cadeia principal envolvidas nos contatos de folhas- β para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB em pH neutro e ácido para a estrutura tridimensional correspondente ao cluster mais populoso em cada simulação.

Tabela 9: Ligações de hidrogênio da cadeia principal envolvendo contatos de folhas- β para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB em condição neutra e ácida. As ligações de hidrogênio foram avaliadas para a estrutura tridimensional (empregando o *software* PYMOL) correspondente ao cluster mais populoso em cada simulação (incluindo todas as réplicas).

Simulação	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5
GROMOS96 53a6 pH neutro	115-130	131-161	129-163	129-163	119-130
	189-196	131-161	131-161	131-161	119-130
	189-196	129-163	131-161		129-163
	129-163	129-163	122-128		129-163
	131-160	112-134	122-128		131-161
	132-161	112-134			131-161
	132-161	133-135			
GROMOS96 53a6 pH ácido	122-128	122-128	133-161	129-163	*118-120
	122-128	122-128	131-133	129-163	*120-128
	129-163	129-163	131-161	131-161	*128-130
	*129-163	129-163	129-163	131-161	*130-118
	161-163	131-161	129-163		120-128
	131-161	131-161	119-128		120-122
	*129-131		119-128		129-163
	**131-161		122-125		131-161
	**131-133		112-121		132-161
	120-130		120-128*		
	118-132*		128-125*		
	130-132*		125-122*		
		122-120*			
AMBER99SB pH neutro	129- 163	129 - 163	129- 163	129-163	129- 163
	129 - 163	131 - 161	129 - 163		129 - 163
	131- 161		131- 161	131 - 161	
	131- 161				
AMBER99SB pH ácido	117-130	117-128	119-130	120-128	118-120
	120-128	119-126	119-130	118-130	118-121
	120-128	119-122	121-127	118-130	118-121
	122-126	129-163	121-128	131-161	131-161
	122-126	131-161	129-163		132-161
	122-125	131-161	131-161		132-161
	129-163				
	131-161				

Para o campo de força GROMOS96 53a6, o pH ácido mostra em média um maior número de ligações de hidrogênio do que o pH neutro. O mesmo comportamento é observado para o campo de força AMBER99SB. Além disso, as ligações de hidrogênio apresentadas na Tabela 9 estão de acordo com as indicadas nas Figura 39 e 40. É interessante notar que não é possível encontrar um padrão de ligações de hidrogênio específico relacionado à formação de folhas- β na região N-terminal. Isso pode ser indicativo da necessidade de um fator adicional (como a dimerização) para estabilizar a estrutura do prion e seu padrão de ligações de hidrogênio.

5.1.2.5 Direcionalidade da cauda N-terminal

Para entender o movimento da cauda N-terminal, foi calculada a distância entre o átomo de $C\alpha$ do resíduo MET109 e o átomo de $C\alpha$ N-terminal (ASN172) e C-terminal (THR193) da α -hélice HB (Figura 41). Inicialmente, a cauda N-terminal é direcionada para o C-terminal da HB. Para o GROMOS96 53a6 em pH neutro, a distância MET109-ASN172 é mantida, mas a distância MET109-THR193 é progressivamente aumentada até 3 nm ao longo da simulação. A cauda N-terminal está a meio caminho entre as extremidades N e C-terminais de HB (Figura 41 A). Para AMBER99SB sob pH neutro, a distância MET109-ASN172 é mantida em 3,7 nm, enquanto que a distância MET109-THR193 é mantida em 0,8 nm nos últimos 20 ns de simulação. Para este campo de força sob pH neutro, a cauda N-terminal aponta para a C-terminal de HB (Figura 41 C). Para ambos os campos de força sob condições ácidas, as caudas N-terminais apontam para a extremidade N-terminal da α -hélice HB: em ambos os casos, a distância MET109-ASN172 é mantida abaixo de 3 nm e MET109-THR193, superior a 3 nm (Figura 41 B e D). Este movimento da cauda N-terminal, em condição ácida, em direção à extremidade N-terminal da α -hélice HB favorece o alongamento da folha β .

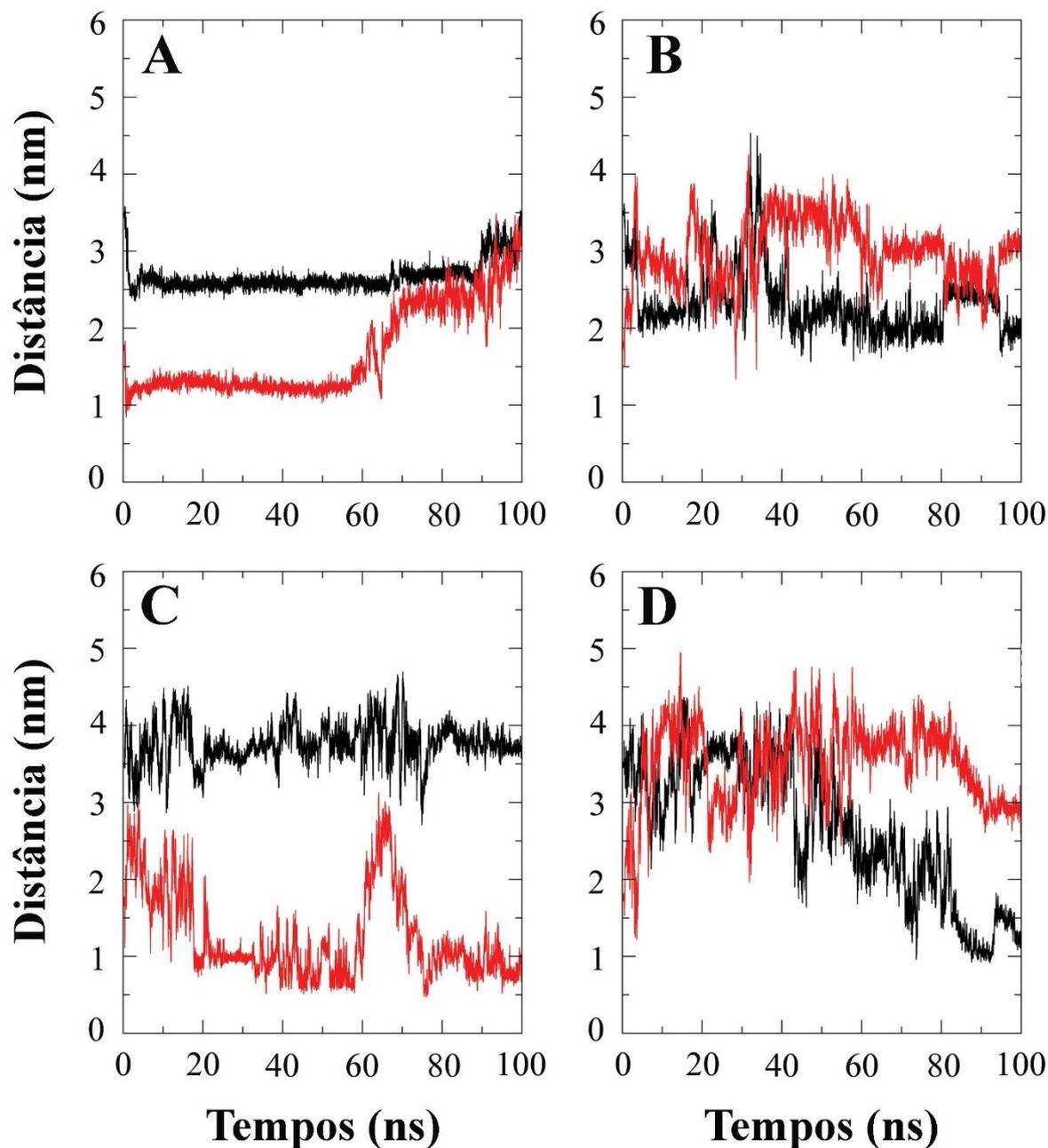


Figura 41: Distância entre os átomos de Ca do resíduo MET109 e as extremidades N-terminal (ASN172, curvas pretas) e C-terminal (THR193, curvas vermelhas) da α -hélice HB ao longo das simulações: A) GROMOS96 53a6, pH neutro; B) GROMOS96 53a6, pH ácido; C) AMBER99SB, pH neutro; D) AMBER99SB, pH ácido.

5.1.2.6 Estruturas representativas das simulações

A Figura 42, a seguir, mostra as estruturas representativas das simulações para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB:

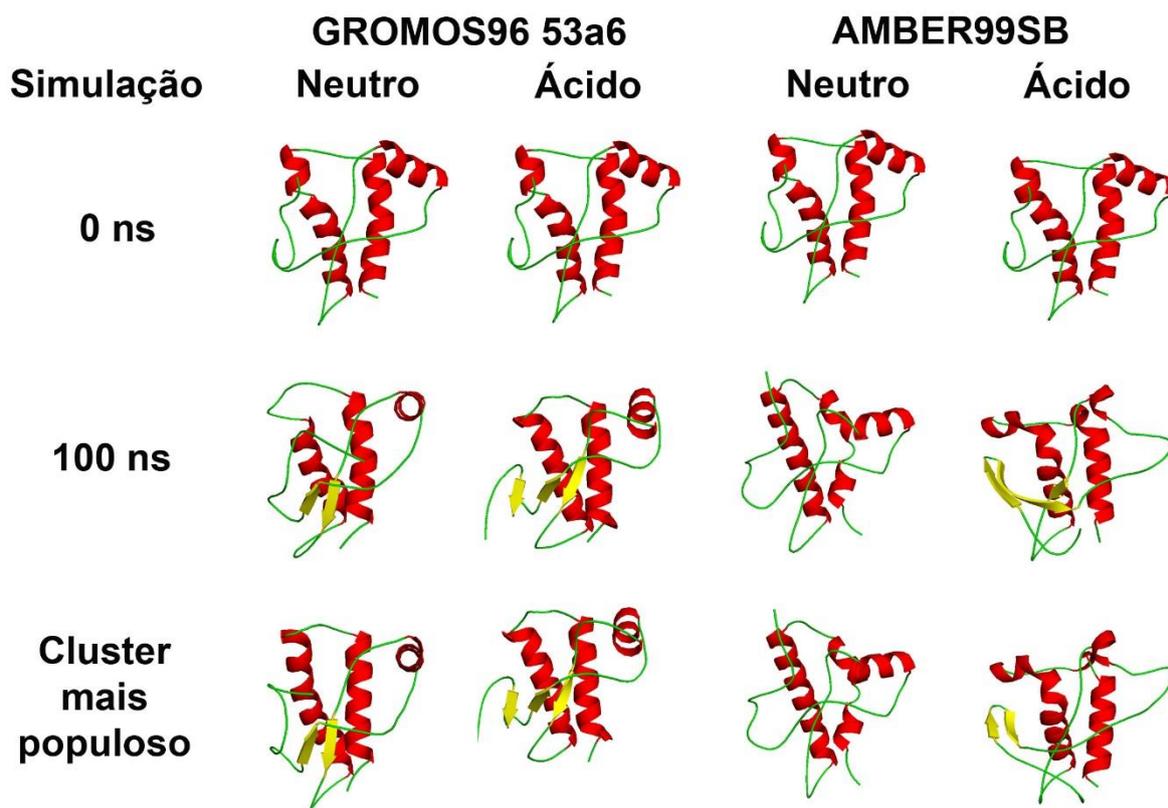


Figura 42: Imagens das estruturas tridimensionais dos instantes de tempo correspondentes a 0 e 100 ns e do cluster representativo de cada uma das simulações para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB (obtidas pelo software PYMOL)⁹⁴.

A Figura 42 corrobora os resultados discutidos nas seções anteriores, mostrando que no instante de tempo inicial (0 ns) as estruturas tridimensionais da proteína são similares à estrutura do PDB (2PRP, Figura 18 B). Ao término das simulações (100 ns), é possível perceber a discrepância entre as estruturas simuladas sob pH ácido e neutro em ambos os campos de força, GROMOS96 53a6 e AMBER99SB. As estruturas em condição neutra apresentam nitidamente menor conteúdo de folhas- β na região N-terminal do que as estruturas em condição ácida. A mesma conclusão pode ser tirada observando-se as estruturas representativas dos clusteres mais populosos em cada simulação. Além disso, as estruturas dos clusteres também indicam uma boa manutenção de α -hélices em condição neutra.

5.1.3 Discussão Parcial

Os seis campos de força analisados mostraram diferentes propensões de conteúdo de estruturas secundárias. O uso de velocidades iniciais distintas levou as réplicas a seguir caminhos diferentes. Conforme indicado anteriormente por outro estudo⁹⁶, encontramos diferenças no balanço de hélices e conformações estendidas associadas a cada campo de força. Isto está possivelmente relacionado à diferença na rugosidade do perfil de energia dos campos de força. No que diz respeito ao campo de força OPLS-AA/L, nossas simulações revelaram uma alta propensão a formar estrutura secundária tipo *bend* (dobra) ao invés de folhas- β na região N-terminal, especialmente sob pH ácido (Apêndice A14). Esse achado está de acordo com a falha observada neste campo de força para capturar a formação de β -*hairpin* em peptídeos humanos Nrf2, que apresentaram-se enriquecidos com conformações de *bend* (dobra).⁹⁶ Matthes e colaboradores mostraram que o campo de força OPLS-AA/L tem uma forte dependência das condições iniciais devido a uma amostragem conformacional mais lenta, o que é corroborado pelos nossos resultados.⁹² Por outro lado, o campo de força CHARMM27 superestima o conteúdo α -helicoidal em nossas simulações sob pH neutro e ácido (Apêndice A15 e Figura 23) e , que também está de acordo com a literatura.^{92,93,96,98} Um estudo prévio mostrou a formação de estruturas α -helicoidais em vez β -*hairpin* em peptídeos humanos Nrf2.⁹⁶ É interessante notar que a quarta α -hélice na região N-terminal já estava prevista em um estudo teórico de Huang e colaboradores.¹²¹ Apesar disso, dados estruturais (de RMN e cristalografia de raios X) para PrP^C não suportam este achado teórico.^{18,51-56}

Além disso, as simulações com os campos de força GROMOS96 43a1 e AMBER99SB-ILDN são incapazes de distinguir diferentes condições de pH, ao passo que os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB produzem um aumento significativo de folhas- β sob pH ácido e mantêm satisfatoriamente a estrutura experimental em pH neutro (Figuras 22, 23 e 36). Trabalho anterior de Lindorff-Larsen e colaboradores mostrou que AMBER99SB-ILDN desestabiliza as hélices de um peptídeo de 15 resíduos.⁹⁵ Eles também demonstraram que AMBER99SB*-ILDN resulta em um melhor equilíbrio de hélice-*coil* do que AMBER99SB-ILDN para o mesmo sistema peptídico.⁹⁵ Lin e colaboradores¹²² apontaram diferenças nas duas parametrizações GROMOS96 relativas à estabilização dos estados α -helicoidais. Na verdade, eles mostraram que os estados α -helicoidais na parametrização 43a1 são aproximadamente 15 kJ/mol mais estáveis que no conjunto de parâmetros 53a6.¹²² No presente trabalho, os resultados para esses dois conjuntos de parametrização correspondem a essas observações. Em nossas simulações com GROMOS96 43a1, observamos a substituição de algumas α -hélices

por 5-hélices (precursoras de π -hélices, Apêndice A12 A, D e I), o que está de acordo com a literatura.⁹⁶

Em um estudo comparativo da propensão de estrutura secundária de diferentes campos de força, Matthes e colaboradores obtiveram GROMOS96 53a6 como o campo de força que forma mais abundantemente folhas- β .⁹² Cino e colaboradores descobriram que o peptídeo Neh2 simulado com GROMOS96 53a6 continuou a se dobrar em conformação em β -hairpin e permaneceu estável mesmo para temperaturas mais elevadas.⁹⁶ Eles também mostraram formação de β -hairpin de peptídeos com campo de força AMBER99SB.⁹⁶ Nossas simulações aplicadas à proteína de príon celular estão de acordo com essas descobertas. Além disso, trabalhos anteriores apontaram que o campo de força AMBER99SB tende a subestimar o conteúdo α -helicoidal de peptídeos helicoidais⁹², o que é confirmado por nossos resultados.

A partir de nossas simulações, claramente podemos identificar os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB como os mais adequados. O maior conteúdo de folhas- β foi encontrado nas simulações com o campo de força GROMOS96 53a6, enquanto que AMBER99SB produz o maior grau de ruptura α -helicoidal sob pH ácido (Figuras 22 e 23). É interessante notar que, para ambos os campos de força, o alongamento da folhas- β parece ser guiado pelo movimento da cauda N-terminal para a extremidade N-terminal da α -hélice HB em condições ácidas (Figura 35). A mesma observação já foi apresentada por Langella e colaboradores¹⁵ em um estudo com a proteína do príon celular humana simulada sob pH ligeiramente ácido com o campo de força GROMOS87.

Várias propriedades distintas foram calculadas a partir de nossas simulações. Todos os campos de força fornecem RMSD maiores em condições ácidas do que em pH neutro (Tabela 8 e Figura 21), de acordo com dados já publicados.^{13,15,16,76} Além disso, observamos que o RMSD para a região N-terminal excede os RMSDs de toda a sequência proteica e do domínio C-terminal (Tabela 8). Além disso, os RMSFs são maiores no domínio N-terminal, pelo menos para os campos de força GROMOS96 53a6, AMBER99SB, OPLS-AA/L e CHARMM27 (Figura 29 A, B, E e F, respectivamente). Em simulações com o campo de força GROMOS96 53a6, a α -hélice no domínio N-terminal é substituída por uma *bend* (dobra, Figura A10 A-J, em Apêndices). Além disso, os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB alongam a folha- β na região N-terminal (Figura A10 F-H, J, em Apêndices, e Figura A11 F, H-J). Esses achados estão de acordo com outros estudos de DM.^{15,16} Experimentalmente, foi demonstrado que a α -hélice HB está envolvida na transição conformacional¹²³⁻¹²⁵ e o domínio N-terminal (resíduos 90-124) é apontado como uma região extremamente importante para a conversão do PrP^C em PrP^{Sc}.¹²¹²⁶⁻¹²⁹

Outra descoberta importante de nossos estudos de DM está relacionada com as ligações de hidrogênio N-terminal originais, Met129(O)-Tyr163(H) (Figura 33) e Gly131(H)-Val161(O) (Figura 34), que são mantidas em ambas as condições de pH para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB. No entanto, as ligações de hidrogênio subjacentes, Met129(H)-Tyr163(O) (Figura 33) e Gly131(O)-Val161(H) (Figura 34), não são mantidas em todas as simulações. Além disso, achamos que essas ligações de hidrogênio não estão presentes nos *clusters* mais populosos das réplicas de DM para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB em condições ácidas e neutras (Tabela 9). Borgohain e colaboradores já haviam mostrado que o alongamento da folhas- β não é acompanhado pela formação de novas ligações de hidrogênio.¹³⁰ Vale ressaltar que não pudemos encontrar um padrão de ligações de hidrogênio intramoleculares associadas às estruturas representativas dos *clusters* mais populosos em cada simulação. Esta poderia ser uma prova da necessidade de um fator adicional (como a dimerização) para estabilizar ainda mais a estrutura proteica e seu padrão de ligações de hidrogênio.

Quanto à diferença nos perfis de energia livre (Figura 32), não fomos capazes de detectar diferenças significativas de energia livre para os dois estados de pH para o campo de força GROMOS96 53a6. Por outro lado, as simulações com o campo de força AMBER99SB produziram uma energia livre maior para a condição de pH neutro, de acordo com dados calorimétricos para huPrP90-231.¹³¹

Os campos de força empregados nesse trabalho foram otimizados para sistemas biológicos. No entanto, devido à falta de dados experimentais quantitativos para a estrutura patológica dos príons, é possível somente delinear conclusões qualitativas sobre a performance dos campos de força. Além disso, as mudanças conformacionais observadas representam um passo importante na compreensão da conversão estrutural da proteína príon celular. Os campos de força mais recentes (tais como AMBER14SB¹³², CHARMM36¹³³ e GROMOS96 54a6¹³⁴) ainda não foram empregados no contexto de príons, mas serão investigados no futuro como continuação do presente trabalho. Além do mais, no presente trabalho foram utilizados somente os modelos de água recomendados para cada campo de força. Smith e colaboradores⁹⁸ avaliaram a influência de diferentes modelos de água, para diferentes campos de força, para o pequeno peptídeo A β ₂₁₋₃₀. No entanto, para compreender essa questão para o caso do príon seriam necessárias exaustivas simulações que estão fora do escopo do presente trabalho, mas que serão realizadas no futuro.

5.2 Retorno ao pH neutro

Do estudo de influência de campos de força, conclui-se que os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB foram os únicos que resultaram em acréscimo no conteúdo de folhas- β sob pH ácido. Baseado no alto conteúdo de folhas- β , as estruturas finais das simulações correspondentes às réplicas F e H (Figura 22 e Figura 23) para esses campos de força sob pH ácido foram, então, utilizadas como ponto de partida para novas simulações de DM em pH neutro (pH 7.4). Essa situação seria o correspondente celular de a proteína dentro do compartimento endossomal (submetida a pH ácido) retornar à superfície externa celular (onde estaria submetida novamente a pH neutro; Figura 43). Com isso, pretende-se avaliar a estabilidade estrutural do modelo gerado de PrP^{Sc} frente ao seu retorno ao pH neutro.

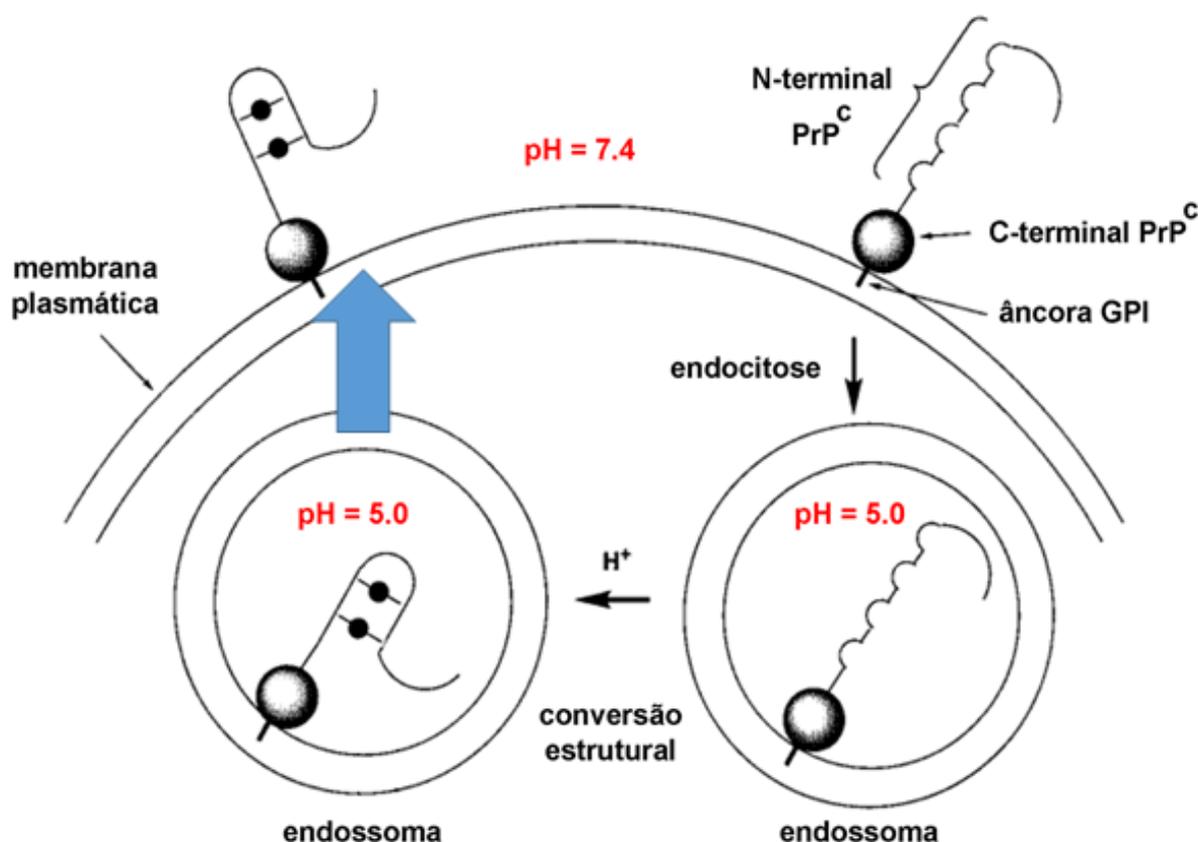


Figure 43: Ciclagem constitutiva da proteína príon celular passando por diferentes condições de pH.⁷⁸

5.2.1 Estabilidade das simulações e análises de componentes principais

Nas próximas seções, as simulações em pH neutro iniciadas a partir das estruturas finais das simulações selecionadas em pH ácido, réplicas F e H, serão denominadas de estrutura 1 e estrutura 2, respectivamente. A partir de cada uma dessas estruturas foram realizadas cinco réplicas de simulação (com diferentes velocidades iniciais) em pH neutro (7,4). Totalizando, dessa forma, 20 simulações de retorno ao pH neutro de 100 ns cada.

Da análise conjunta da Tabela 10 e da Figura 44, é possível observar que, para ambos os campos de força, a estrutura 2 apresentou menores valores de RMSD do que a estrutura 1. Ainda, os maiores valores de média e desvio padrão de RMSD foram observados para a estrutura 1 simulada com o campo de força AMBER99SB (Tabela 10).

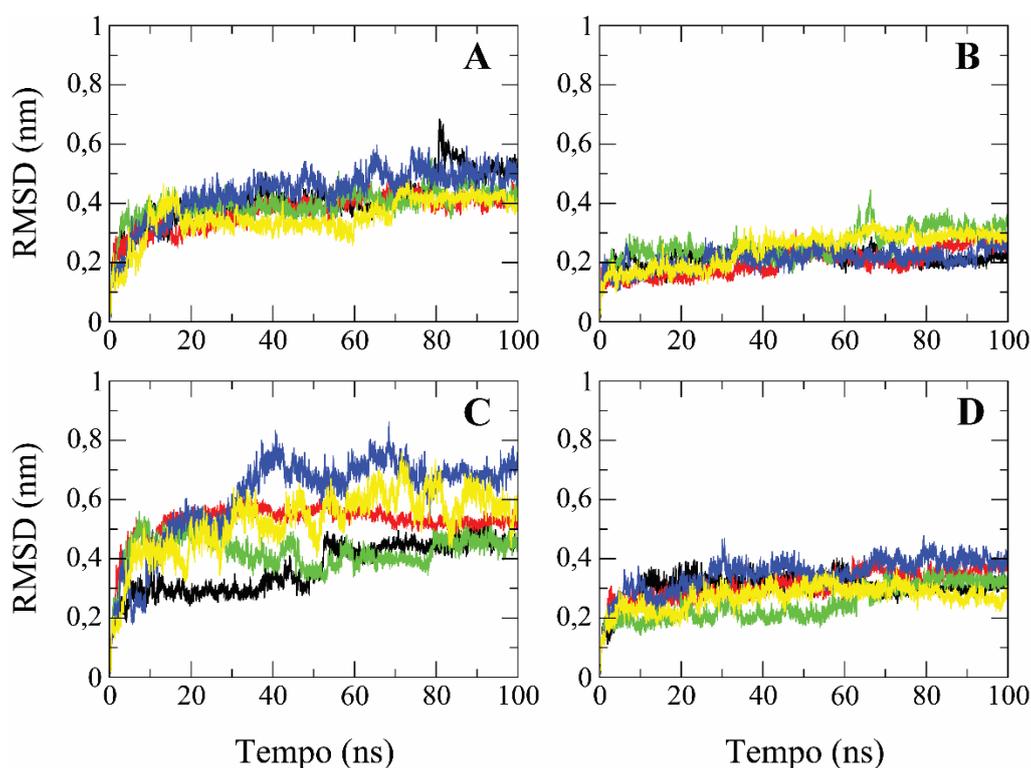


Figura 44: RMSD de C_{α} para o fragmento proteico inteiro (109-219), ao longo do tempo de simulação: **A)** GROMOS96 53a6, estrutura 1; **B)** GROMOS96 53a6, estrutura 2; **C)** AMBER99SB, estrutura 1; **D)** AMBER99SB, estrutura 2. As cores das curvas correspondem às réplicas: preto = réplica 1; vermelho = réplica 2; verde = réplica 3; azul = réplica 4; amarelo = réplica 5.

Tabela 10: Média e desvio padrão de RMSD de C α entre as cinco réplicas para cada um dos campos de força entre 90 e 100 ns de simulação.

Simulação	TOTAL	N-terminal	C-terminal
GROMOS53a6_estrutura_1	0.45 \pm 0.05	0.44 \pm 0.11	0.38 \pm 0.07
GROMOS53a6_estrutura_2	0.27 \pm 0.04	0.19 \pm 0.05	0.28 \pm 0.04
AMBERSB_estrutura_1	0.54 \pm 0.10	0.53 \pm 0.11	0.39 \pm 0.09
AMBERSB_estrutura_2	0.33 \pm 0.05	0.38 \pm 0.07	0.26 \pm 0.04

As contribuições de RMSD de C α das regiões N-terminal (resíduos 109-143) e C-terminal (resíduos 144-219) estão apresentadas nas Figuras dos Apêndices 17 e 18. Analisando essas figuras em conjunto com a Tabela 10, observa-se que a região N-terminal apresentou maiores média e desvio padrão de RMSD do que a região C-terminal para as estruturas 1 e 2 do campo de força AMBER99SB e para a estrutura 1 do campo de força GROMOS96 53a6. Situação inversa é observada para a estrutura 2 do campo de força GROMOS96 53a6. É interessante ressaltar que os valores de RMSD total de ambas as estruturas em ambos os campos de força ficaram inferiores às médias obtidas para os mesmos campos de força no capítulo anterior, tanto sob pH ácido como sob pH neutro.

A Figura 45, a seguir, apresenta a análise de componentes principais para cada uma das réplicas das simulações com cada campo de força.

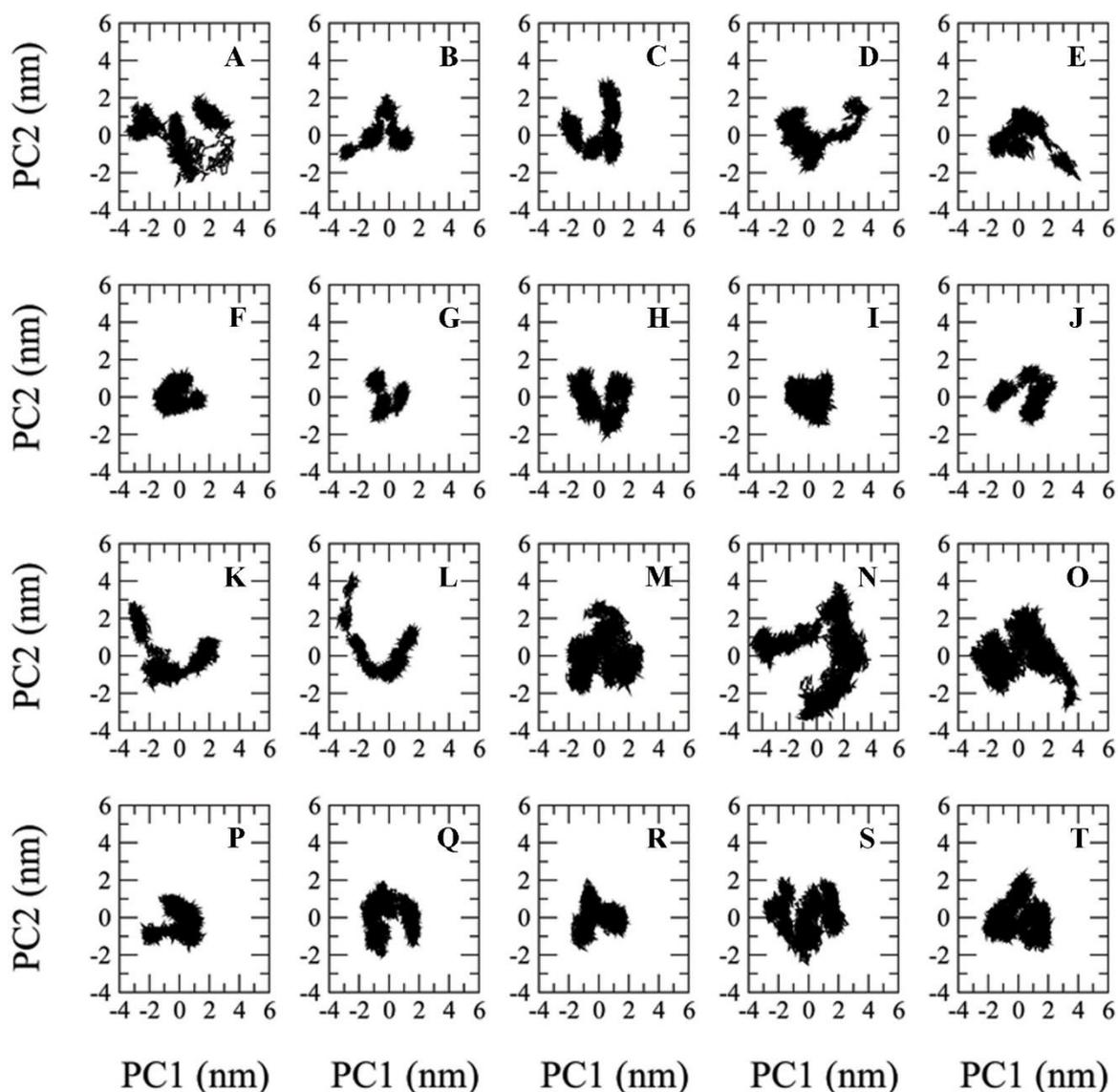


Figura 45: Análise de componentes principais. Projeção sobre os dois primeiros componentes: **A-E)** GROMOS95 53a6, estrutura 1; **F-J)** GROMOS95 53a6, estrutura 2; **K-O)** AMBER99SB, estrutura 1; **P-T)** AMBER99SB, estrutura 2.

Da Figura 45, observa-se que, para ambos os campos de força, as réplicas com a estrutura 1 exploraram mais o espaço conformacional do que as réplicas com a estrutura 2. Essa observação concorda com os maiores valores de RMSD apresentados pelas réplicas da estrutura 1 (Tabela 10 e Figura 44). Ressalta-se ainda que as réplicas da estrutura 2 exploraram regiões muito similares do espaço conformacional em ambos os campos de força.

5.2.2 Evolução de estruturas secundárias

As Figuras 46 e 47 apresentam a evolução de estruturas secundárias dos resíduos de aminoácidos (obtidas pelo software DSSP).

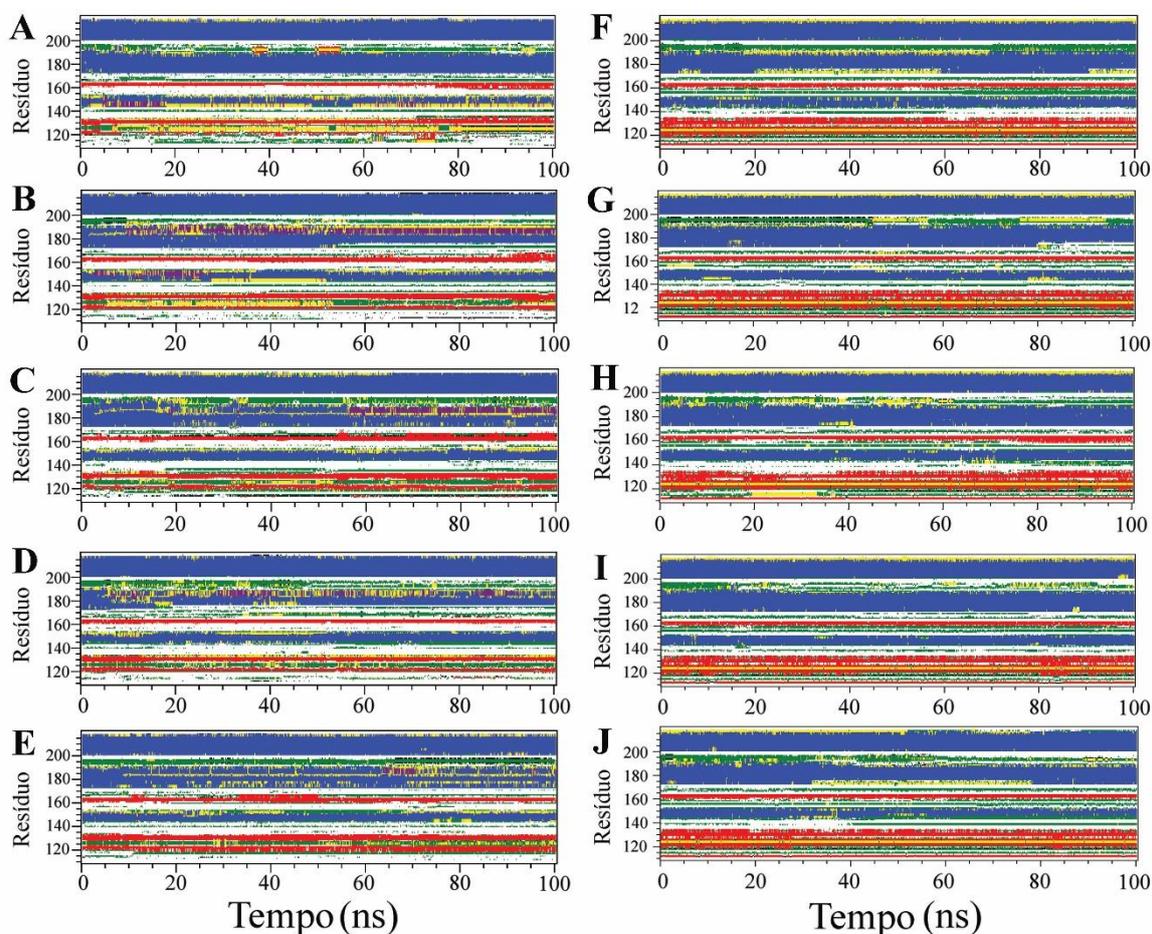


Figura 46: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação, obtidos pelo programa DSSP, para o campo de força GROMOS96 53a6: A) – E) réplicas da estrutura 1 em pH neutro; F) - J) réplicas da estrutura 2 em pH neutro. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: branco = alça; vermelho = folhas- β ; preto = segmento β ; verde = dobra; amarelo = volta; azul = α -hélice; roxo = 5-hélice; e cinza = 3-hélice.

Avaliando a Figura 46, observa-se que para o campo de força GROMOS96 53a6 a α -hélice HA é parcialmente desestruturada para as réplicas da estrutura 1 (Figura 46 A, B, C e E, principalmente), enquanto que para as réplicas da estrutura 2 ela encontra-se mais conservada (Figura 46 F-J). A região C-terminal da α -hélice HB (resíduos 185-190) é parcialmente desestruturada, formando 5-hélices em quatro das réplicas da estrutura 1 (Figura 46 B-E). Não é observada a formação de 5-hélices para as réplicas da estrutura 2 (Figura 46 F-

J). A estrutura *bend* entre as α -hélices HB e HC é parcialmente mantida nas réplicas das estruturas 1 e 2 (Figura 46). A α -hélice HC é bem conservada nas réplicas da estrutura 1 (Figura 46 A-E), mas para as réplicas da estrutura 2 ocorre uma desestruturação C-terminal (resíduos 215-217; Figura 46 F-J). Analisando a região N-terminal, observa-se que as réplicas da estrutura 2 apresentam um maior conteúdo de folhas- β do que as réplicas da estrutura 1 (Figura 46 A-E; F-J).

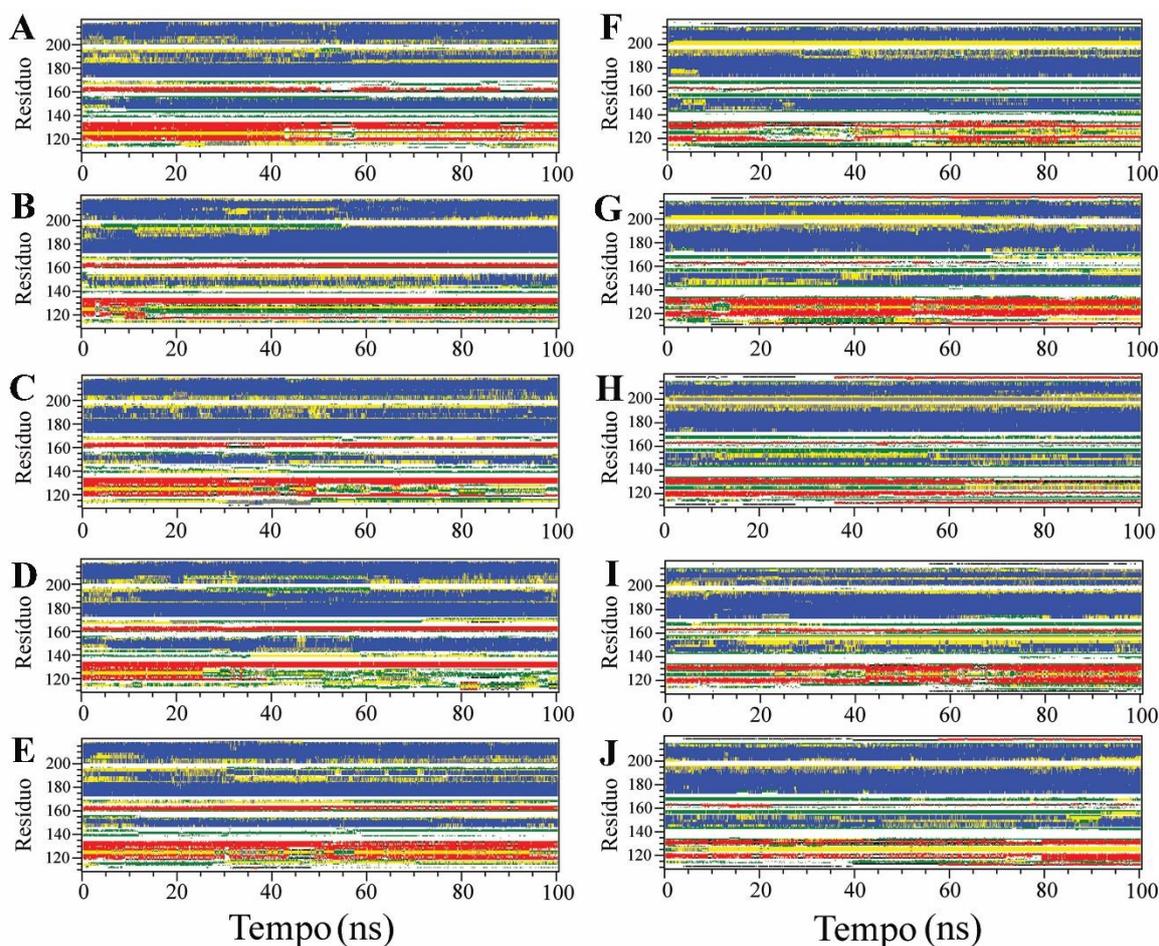


Figura 47: Estrutura secundária de resíduos de aminoácidos durante a simulação, obtidos pelo programa DSSP, para o campo de força AMBER99SB: **A) – E)** réplicas da estrutura 1 em pH neutro; **F) - J)** réplicas da estrutura 2 em pH neutro. Cada cor representa uma estrutura secundária específica: branco = alça; vermelho = folhas- β ; preto = segmento β ; verde = dobra; amarelo = volta; azul = α -hélice; roxo = 5-hélice; e cinza = 3-hélice.

Para o campo de força AMBER99SB, observa-se que a α -hélice HA é desestruturada em três das réplicas da estrutura 1 (Figura B, C e E) e em quatro das réplicas da estrutura 2 (Figura 47 G-J). A região C-terminal de HB também apresenta-se parcialmente desestruturada em três réplicas de ambas estruturas (Figura 47 A, C, E, F, G e H), assim como a região N-

terminal de HC (Figura 47 A-E; F-I). É interessante notar que as três α -hélices encontram-se parcialmente desestruturadas em *turns*. Em relação ao conteúdo de folhas- β na região N-terminal, duas das réplicas da estrutura 1 (Figura 47 A e E) e duas da estrutura 2 (Figura 47 G e I) mantiveram o conteúdo ao longo da simulação.

5.2.3 Número de resíduos em estruturas secundárias

A Figura 48 apresenta o conteúdo médio de α -hélices e de folhas- β nos últimos 10 ns de simulação. Avaliando a Figura 48 A, observa-se que para o campo de força GROMOS96 53a6 a estrutura 2 reteve o conteúdo α -helicoidal mais do que a estrutura 1 (38 versus 35 resíduos). Para o campo de força AMBER99SB (Figura 48 A) ocorreu a situação inversa (37 versus 42 resíduos, para as estruturas 2 e 1, respectivamente). Para o campo de força GROMOS96 53a6, a estrutura 2 apresentou um conteúdo médio de folhas- β maior que a estrutura 1 (16 versus 13 resíduos; Figura 48 B). Para o campo de força AMBER99SB, as estruturas 1 e 2 tiveram o mesmo valor médio (11 resíduos; Figura 48 B), mas a estrutura 2 apresentou um desvio padrão significativamente maior (5 versus 2; Figura 2A). Assim, o campo de força GROMOS96 53a6 foi o que obteve o melhor desempenho: permitiu maior desestruturação α -helicoidal e, ao mesmo tempo, manteve maior conteúdo de folhas- β .

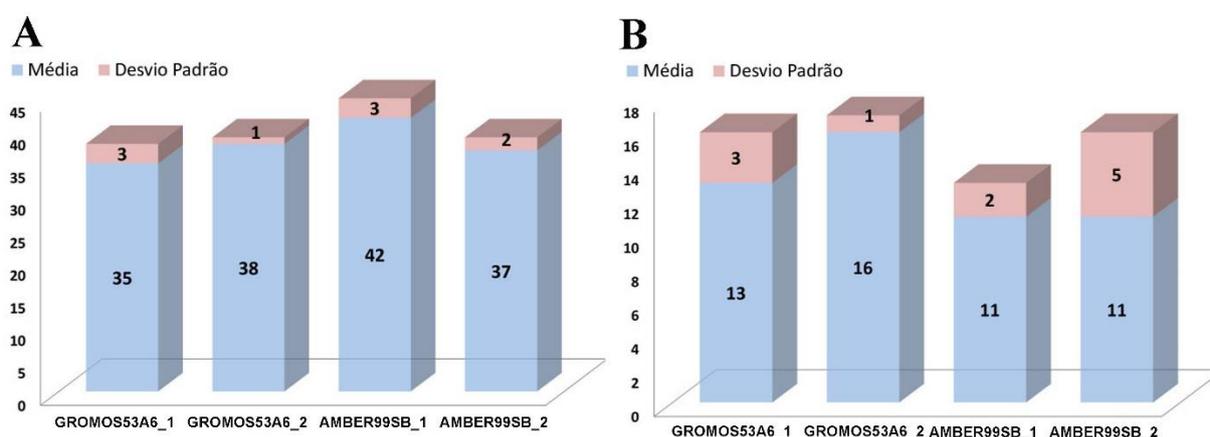


Figura 48: Média e desvio padrão do número de resíduos em: A) α -hélice; B) folhas- β .

5.2.4 Ligações de hidrogênio

A Tabela 11 resume os valores de média e desvio padrão das ligações de hidrogênio intermoleculares proteína-solvente e intramoleculares proteína-proteína para simulações antigas (médias entre as cinco réplicas das simulações, do capítulo 7, para pH neutro e ácido para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB designadas aqui de G53_pH7,

G53_pH3, SB_pH7 e SB_pH3) e as novas simulações de retorno ao pH neutro (designadas na Tabela 11 como G53_pH7_estr1, G53_pH7_estr2, SB_pH7_estr1 e SB_pH7_estr2). Analisando esta tabela, observa-se que o número de ligações de hidrogênio intermoleculares aumentou na passagem do pH ácido para o neutro. Os valores médios apresentados pelos dois campos de força foram, no entanto, menores do que os valores apresentados nas simulações antigas em pH neutro (para o campo de força GROMOS96 53a6 sob pH neutro, 252; para o campo de força AMBER99SB sob pH neutro, 275). Deste resultado, compreende-se que do retorno do pH ácido para o pH neutro obtém-se uma estrutura proteica distinta, possivelmente intermediária, entre as duas condições originais de pH (neutro e ácido).

Analisando as ligações de hidrogênio proteína-proteína intramoleculares da cadeia principal para todo o fragmento (resíduos 109-219) e para o fragmento N-terminal (resíduos 109-143), novamente observa-se que os valores médios de ligações foram diferentes dos apresentados pelas simulações anteriores sob condições neutra e ácida. É interessante notar que ambos os campos de força obtiveram valores similares, em torno de 44 ligações de hidrogênio intramoleculares para o fragmento inteiro (109-219). Esse resultado é um indicativo de que o retorno ao pH neutro parece estabilizar as estruturas simuladas. Além disso, o número de ligações de hidrogênio na região N-terminal foi maior que o obtido nas simulações anteriores em condição neutra. Isso implica que a transição do estado ácido para o neutro parece ter gerado uma nova estrutura intermediária entre as duas condições de pH estudadas. De fato, as ligações de hidrogênio envolvidas na estrutura da folhas- β parecem ser estabilizadas na região N-terminal.

Tabela 11: Média e desvio padrão do número de ligações de hidrogênio.

	Fragmento 109-219 LH Intermolecular	Fragmento 109-219 LH Intramolecular	Fragmento 109-143 (N-terminal) LH Intramolecular
Simulações Originais			
G53_pH7	252 ± 12	41 ± 2	4 ± 1
G53_pH3	213 ± 7	46 ± 3	7 ± 1
SB_pH7	275 ± 10	39 ± 3	4 ± 2
SB_pH3	251 ± 8	41 ± 2	5 ± 0
Novas Simulações			
G53_pH7_estr1	244 ± 5	44 ± 3	5 ± 1
G53_pH7_estr2	239 ± 7	45 ± 1	8 ± 0
SB_pH7_estr1	271 ± 3	43 ± 2	4 ± 1
SB_pH7_estr2	272 ± 6	44 ± 2	6 ± 1

5.2.5 Flexibilidade de resíduos de aminoácidos

As Figuras 49 e 50 mostram o RMSF dos átomos de $C\alpha$ a cada 20 ns de simulação (Figura 49 AE, Fig. 50 AE) e para todo o intervalo de tempo do tempo de simulação, 0-100 ns (Figura 49 F, Figura 50 F). Para o campo de forças GROMOS96 53a6, as curvas médias (obtidas entre as cinco réplicas de simulação) das estruturas 1 e 2 apresentam flexibilidades semelhantes. Além disso, este campo de força apresenta um pico (em torno do resíduo 193) de flexibilidade de 0,45 nm. Este pico está associado à desestruturação C-terminal da α -hélice HB em inúmeras replicações de simulação (Figura 46). É interessante notar que o retorno ao pH neutro levou a uma diminuição da flexibilidade N-terminal em comparação com as simulações anteriores sob pH ácido. Isso parece estar associado com a manutenção das folhas- β na região N-terminal.

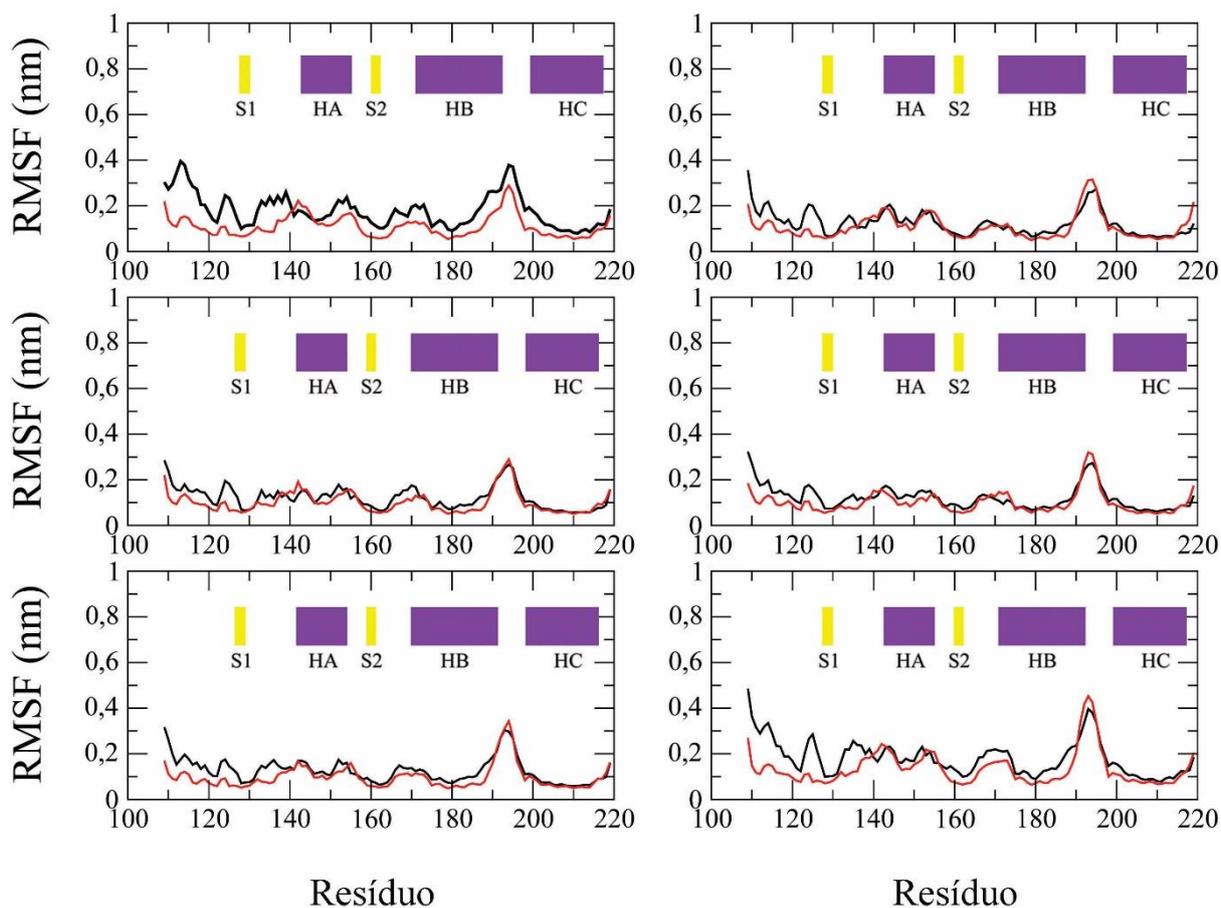


Figura 49: RMSF de C α para o campo de força GROMOS96 53a6 para intervalos de tempo específicos: a) 0 a 10 ns; b) 20 a 40 ns; c) 40 a 60 ns; d) 60 a 80 ns; e) 80 a 100 ns; f) 0 a 100 ns. As cores das curvas correspondem à média entre as cinco réplicas das estruturas: preto = estrutura 1; vermelho = estrutura 2.

Para o campo de força AMBER99SB, existe uma maior flexibilidade na região N-terminal (entre os resíduos 109-140) em comparação com o campo de força do campo GROMOS96 53a6. Além disso, um pico (em torno do resíduo 193) de flexibilidade de 0,45 nm (Fig. 4F) também foi observado, possivelmente associado com a desestruturação da região C-terminal da α -hélice HB (Fig. 4 B, D, F). Para ambos os campos de força, a média das réplicas da estrutura 1 apresentaram em todos os intervalos de tempo maior flexibilidade do que a das respectivas réplicas da estrutura 2 (Figura 49 e Figura 50). Esse resultado está de acordo com os maiores valores de RMSD demonstrados por essas estruturas.

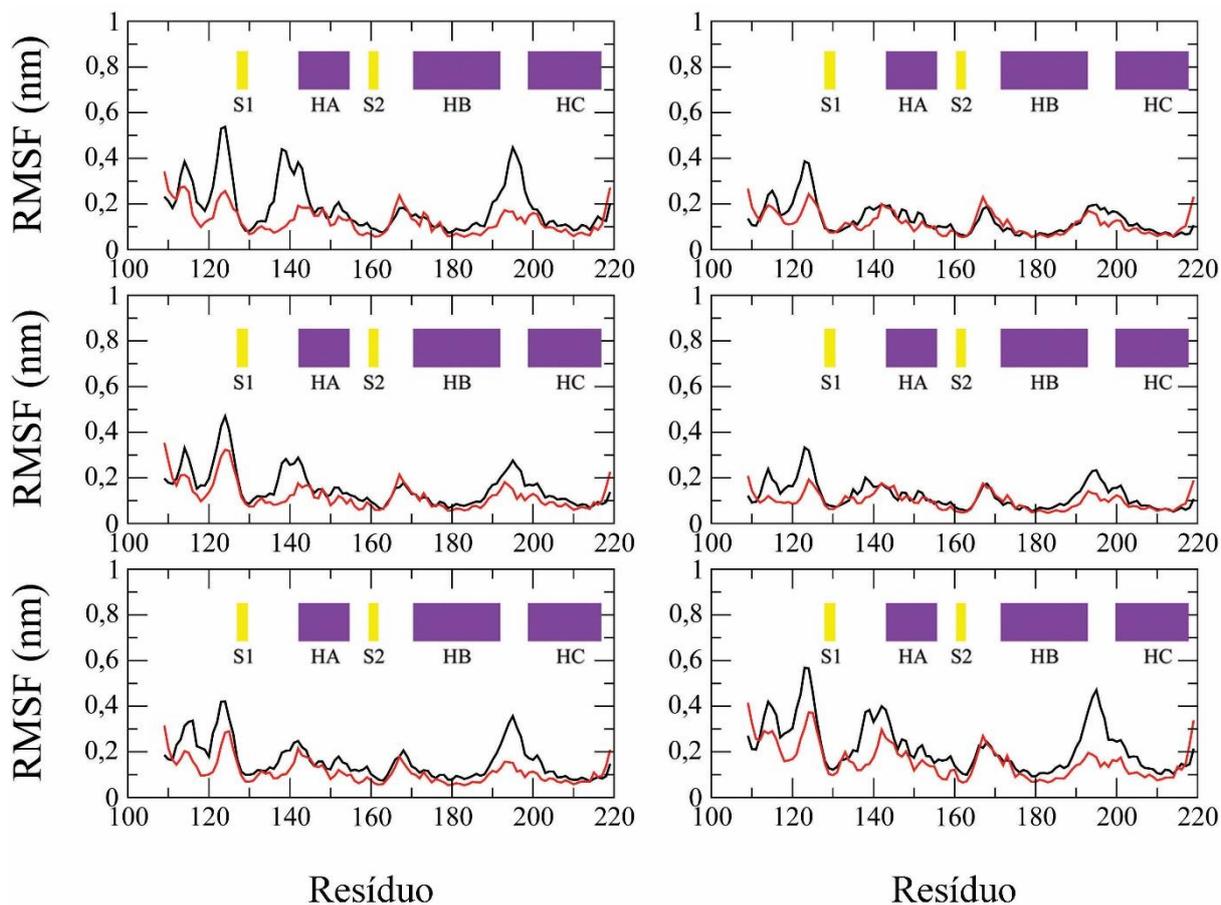


Figura 50: RMSF de Ca para o campo de força AMBER99SB para intervalos de tempo específicos: a) 0 a 10 ns; b) 20 a 40 ns; c) 40 a 60 ns; d) 60 a 80 ns; e) 80 a 100 ns; f) 0 a 100 ns. As cores das curvas correspondem à média entre as cinco réplicas das estruturas: preto = estrutura 1; vermelho = estrutura 2.

5.2.6 Direcionalidade da Cauda N-terminal

A Figura 51 mostra a distância entre o aminoácido N-terminal, MET109, e os aminoácidos C-terminal (THR193) e N-terminal (ASN172) da α -hélice HB. A partir da Figura 51, observamos que a distância MET109-ASN172 é mantida abaixo de 3 nm, enquanto a distância MET109-THR193 é mantida acima de 3 nm para réplicas das estruturas 1 e 2 em ambos os campos de força. Isso significa que a passagem do pH ácido para o neutro não altera a direcionalidade da cauda N-terminal. Portanto, com o retorno ao pH neutro a cauda N-terminal continua direcionada para a N-terminal da α -hélice HB.

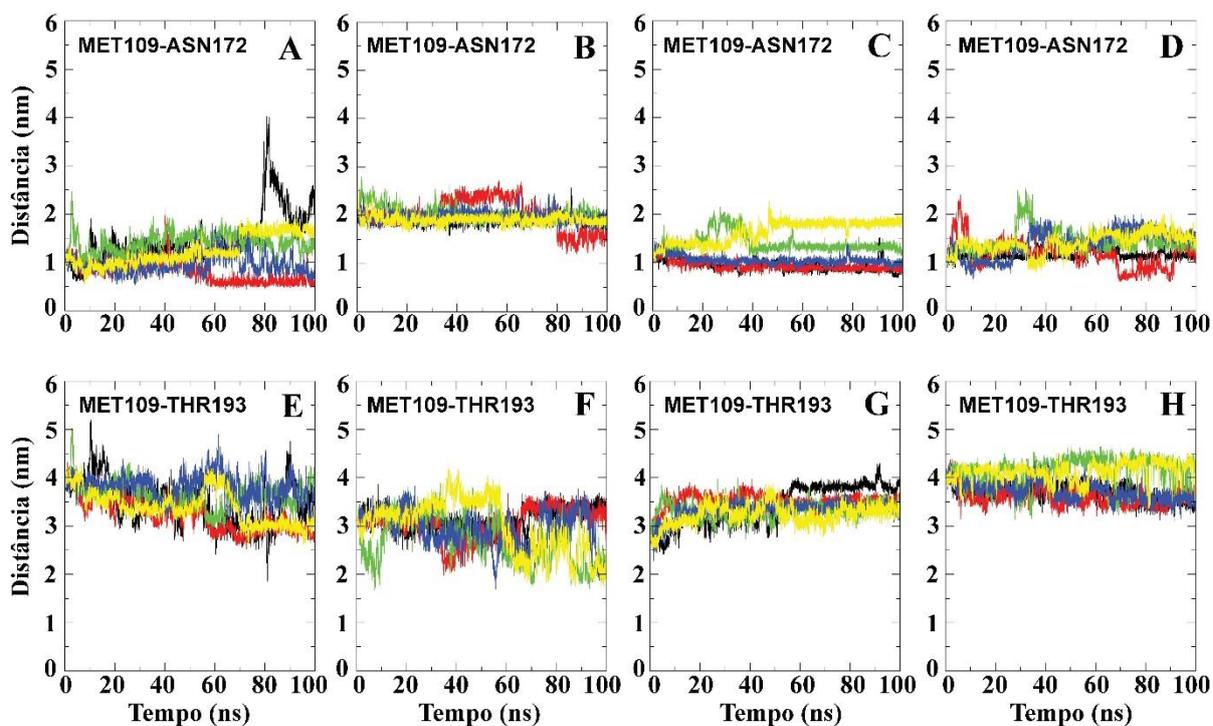


Figura 51: Distância entre os átomos de Ca do resíduo MET109 e as extremidades N-terminal (ASN172): A) GROMOS96 53a6, estrutura 1; B) GROMOS96 53a6, estrutura 2; C) AMBER99SB, estrutura 1; D) AMBER99SB, estrutura 2; e C-terminal (THR193) da α -hélice HB ao longo das simulações: E) GROMOS96 53a6, estrutura 1; F) GROMOS96 53a6, estrutura 2; G) AMBER99SB, estrutura 1; H) AMBER99SB, estrutura 2. As cores das curvas correspondem às réplicas: preto = réplica 1; vermelho = réplica 2; verde = réplica 3; azul = réplica 4; amarelo = réplica 5.

5.2.7 Discussão Parcial

No presente capítulo, tem-se o intuito de investigar o retorno ao pH neutro e o possível mecanismo de reversibilidade de PrP^{Sc} a PrP^C. Para tanto, as estruturas finais das simulações sob pH ácido, Seção 5.1.2, para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB foram usadas como ponto de partida para novas simulações de DM sob pH neutro.

Com base nos resultados de RMSD de C α (Figura 44 e Tabela 10) é possível observar um efeito estabilizante sobre a estrutura global da proteína propiciada pelo seu retorno ao pH neutro. Essa observação concorda com o trabalho de Vila-Viçosa e colaboradores.¹³⁵ Os resultados das análises de PCA (Figura 45) e de RMSF (Figuras 49 e 50) corroboram o efeito estabilizante sobre a estrutura proteica, enfatizando-se a estabilização da cauda N-terminal cuja flexibilidade é diminuída no retorno ao pH neutro (Figuras 49 e 50).

A partir dos resultados de análises de estrutura secundária (Figuras 46, 47 e 48) não é possível observar reversibilidade conformacional. Pelo contrário, tem-se a manutenção de folhas- β na região N-terminal da proteína. Esse resultado concorda com a literatura.¹³⁵ Em relação à direcionalidade da cauda N-terminal (Figura 51), essa se mantém como anteriormente observada em pH ácido, ou seja: a cauda N-terminal continua apontando para a extremidade N-terminal da α -hélice HB. Esse resultado em conjunto com as análises de estrutura secundária (Figuras 46, 47 e 48) aponta para a não reversibilidade de PrP^{Sc}.

As análises de ligações de hidrogênio (Tabela 11) apontam que o retorno ao pH neutro produz uma estrutura intermediária entre as duas condições de pH (neutro e ácido) originalmente simuladas (Seção 5.1.2). Isso pode ser um indício de que a estrutura esteja retornando a sua conformação original sob pH neutro. Embora esse último resultado seja indício de uma plausível reversibilidade, os demais resultados apontam para a não reversibilidade de estrutura.

Jackson e colaboradores apontam que uma vez que a ligação dissulfeto é reduzida, é possível observar a reversibilidade por dicroísmo circular.¹³⁶ Jenkins e colaboradores mostram que é possível reverter PrP^{Sc} a PrP^C por meio de altas concentrações de GndHCl.¹³⁷ Ainda, Hornemann e colaboradores mostram que os resíduos C-terminais (121-231) de PrP de ratos atuam como unidade de dobramento autônoma que sofre um processo de dobramento/redobramento cooperativo e reversível.¹³⁸ No entanto, esse redobramento leva a uma molécula indistinguível da proteína recombinante nativa, não apresentando a primeira α -hélice da estrutura.^{138,139} Por outro lado, trabalhos experimentais na literatura^{140,141}

ênfatizam que estruturas convertidas sob pH muito ácido não são suscetíveis de reversibilidade. Esse parece ser justamente o caso de nossas simulações. Além disso, considerando-se que um equilíbrio conecte as isoformas PrP^C e PrP^{Sc} é natural que haja um percentual de estruturas na forma de PrP^{Sc}, conforme observado por nossas simulações.

6. CONCLUSÕES

Da avaliação geral de todos os campos de força, observa-se maiores valores de desvio padrão de RMSD (Seção 5.1.1.1) para a região N-terminal do que para a região C-terminal. Esse resultado reforça que a variabilidade da região N-terminal tem maior contribuição para a variabilidade observada entre as réplicas das simulações. Das análises de componentes principais (Seção 5.2.1), observa-se que as réplicas ácidas exploram mais amplamente o espaço conformacional do que as réplicas neutras. A discrepância entre as réplicas de DM indicam uma leve, porém importante diferença na exploração do espaço conformacional. Esses resultados, mais uma vez, corroboram a necessidade de se realizar múltiplas simulações de DM para estabelecer a correta distinção entre as condições neutra e ácida no estudo da conversão conformacional da proteína príon celular.

Ainda de acordo com as análises coletivas (Seção 5.1.1), conclui-se que o campo de força OPLS-AA subestima o conteúdo de α -hélices, enquanto o campo de força CHARMM27 o superestima. Conseqüentemente, esses campos de força não parecem a melhor opção para estudar a conversão da proteína príon celular. Por outro lado, os campos de força GROMOS96 43a1 e AMBER99SB-ILDN não permitem uma distinção significativa entre as condições de pH. Já os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB apresentam os maiores acréscimos no conteúdo de folhas- β , assim como o maior número de ligações de hidrogênio intramoleculares na cadeia principal do domínio N-terminal sob pH ácido. Além disso, esses campos de força reproduzem de forma satisfatória a condição neutra. Portanto, selecionou-se uma das cinco réplicas em ambas as condições de pH como as simulações mais representativas para cada um desses campos de força.

Analisando as réplicas para os campos de força GROMOS96 53a6 e AMBER99SB (Seção 5.1.2), observa-se que o primeiro campo de força permite, em condição ácida, um aumento mais acentuado de folhas- β na região N-terminal do que o segundo. O campo de força GROMOS96 53a6 apresenta ainda um maior número de ligações de hidrogênio promovendo a manutenção do núcleo de folhas- β na região N-terminal, em ambas as condições de pH, do que o campo de força AMBER99SB. Dessa forma, conclui-se que GROMOS96 53a6 parece ser o campo de força mais promissor para investigar a influência do pH no processo de conversão estrutural da proteína príon celular. Além do mais, é de extrema importância ressaltar que essas conclusões só podem ser obtidas a partir de um grande conjunto de réplicas de simulação.

A partir dos resultados da Seção 5.2, observa-se a não reversibilidade da proteína em seu retorno ao pH neutro. Esse resultado concorda com o trabalho de Bjorndahl e colaboradores¹³⁶, no qual não é observada reversibilidade de estruturas convertidas sob pH muito ácido. É possível que sob valores de pH intermediários seja observada a reversibilidade da estrutura de PrP^{Sc}. Além disso, considerando-se que um equilíbrio conecte as isoformas PrP^C e PrP^{Sc} é natural que haja um percentual de estruturas na forma de PrP^{Sc}, conforme observado por nossas simulações.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade do presente trabalho, pretende-se realizar novas simulações com campos de força mais atuais, entre eles GROMOS96 54A6¹³⁴, AMBER14SB¹³² e CHARMM2736¹³³. Além disso, pretende-se investigar a influência dos modelos de água (SPC, TIP3P e TIP4P) sobre o conteúdo de estrutura secundária dos campos de força já estudados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prusiner, S. B. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science*. **1982**, 216, 136.
2. Prusiner, S. B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 13363.
3. Stahl, N. & Prusiner, S. B. Prions and Prion Proteins. *FASEB J.* **1991**, 5, 2799.
4. Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T. Seeding 'One-Dimensional Crystallization' of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie? *Cell* **1993**, 73, 1055.
5. Priola, S. A. & Mcnally, K. L. The Role of the Prion Protein Membrane Anchor in Prion Infection. *Prion* **2009**, 3, 134.
6. Stefureac, R. I., Madampage, C. A., Andrievskaia, O. & Lee, J. S. Nanopore Analysis of the Interaction of Metal Ions with prion Proteins and Peptides 1. *Biochem. Cell Biol.* **2010**, 88, 347.
7. Giese, A., Levin, J., Bertsch, U. & Kretzschmar, H. Effect of Metal Ions on De Novo Aggregation of Full-length Prion Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 320, 1240.
8. Kushnirov, V. V, Kochneva-, N. V, Chechenova, M. B., Frolova, N. S. & Ter-avanessian, M. D. Prion Properties of the Sup35 Protein of Yeast *Pichia Methanolica*. *EMBO J.* **2000**, 19, 324.
9. Milhavet, O. *et al.* Prion Infection Impairs the Cellular Response to Oxidative Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 13938.
10. Gasset, M., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J. & Prusiner, S. B. Perturbation of the Secondary Structure of the Scrapie Prion Protein Under Conditions that Alter Infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90, 1.
11. Hornemann, S. & Glockshuber, R. A scrapie-like Unfolding Intermediate of the Prion Protein Domain PrP(121-231) Induced by Acidic pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 6010.
12. Swietnicki, W., Petersen, R., Gambetti, P. & Surewicz, W. K. pH-dependent Stability and Conformation of the Recombinant Human Prion Protein PrP(90-231). *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 27517.
13. Alonso, D. O., DeArmond, S. J., Cohen, F. E. & Daggett, V. Mapping the Early Steps in the pH-induced Conformational Conversion of the Prion Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 2985.

14. Sekijima, M., Motono, C., Yamasaki, S., Kaneko, K. & Akiyama, Y. Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophys. J.* **2003**, 85, 1176.
15. Langella, E., Improta, R. & Barone, V. Checking the pH-induced Conformational Transition of Prion Protein by Molecular Dynamics Simulations: Effect of Protonation of Histidine Residues. *Biophys. J.* **2004**, 87, 3623.
16. Campos, S. R. R., Machuqueiro, M. & Baptista, A. M. Constant-pH Molecular Dynamics Simulations Reveal a Beta-Rich Form of the Human Prion Protein. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 12692.
17. Xu, Z., Lazim, R., Mei, Y. & Zhang, D. Stability of the Beta-Structure in Prion Protein: A Molecular Dynamics Study based on Polarized Force Field. *Chem. Phys. Lett.* **539–2012**, 540, 239.
18. James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donnes, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 10086.
19. Chiu, S.-W., Pandit, S. A., Scott, H. L. & Jakobsson, E. An Improved United Atom Force Field for Simulation of Mixed Lipid Bilayers. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 2748.
20. Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E. & van Gunsteren, W. F. A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1656.
21. Sorin, E. J. & Pande, V. S. Exploring the Helix-Coil Transition via All-Atom Equilibrium Ensemble Simulations. *Biophys. J.* **2005**, 88, 2472.
22. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A. & Simmerling, C. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, 65, 712.
23. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O. & Shaw, D. E. Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber ff99SB Protein Force Field. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2010**, 78, 1950.
24. Mackerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera, J., Yin, D. & Karplus, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins †. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 3586.
25. Mackerell, A. D., Feig, M. & Brooks, C. L. Extending the Treatment of Backbone

- Energetics in Protein Force Fields : Limitations of Gas-Phase Quantum Mechanics in Reproducing Protein Conformational Distributions in Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1400.
26. Kaminski, G. a, Friesner, R. a, Tirado-rives, J. & Jorgensen, W. L. Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 6474.
27. Doenças priônicas, SBPC, v. 37, nº 218, agosto 2005.
28. Lledo, Pierre-Marie. História das vacas loucas. Instituto Piaget, 2002, 1-160.
29. <http://cienciahoje.uol.com.br/colunas/deriva-genetica/microbios-sem-dna> (acessado em 01/04/2018 às 19h).
30. a. Chen, C. & Dong, X-P. Epidemiological characteristics of human prion diseases. *Infectious Diseases of Poverty* **2016**, 5, 1.
- b. <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-reported-cases-worldwide-excluding-the-united-kingdom> (acessado em 01/04/2018 às 18h).
- c. <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-cases-in-the-united-kingdom> (acessado em 01/04/2018 às 18h).
31. Bateman, D., Hilton, D., Love, S., Zeidler, M., Beck, J. & Collinge, J.; Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-year-old in the UK. *Lancet* **1995**, 346, 1155.
32. Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J. & Birkett, C. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **1997**, 389, 498.
33. Situação epidemiológica dos casos da doença de Creutzfeldt-Jakob, Brasil, 2005 a 2013, *Boletim Epidemiológico - Ministério da Saúde*, V. 37, nº 22 (2016).
34. Head, M. W. & Ironside, J. W. Review: Creutzfeldt-Jakob disease: Prion protein type, disease phenotype and agent strain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2012**, 38, 296.
35. Masters, C. L., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J. Creutzfeldt-Jakob Disease Virus Isolations from the Gerstmann-Straussler Syndrome. *Brain* **1981**, 104, 559.

36. Medori, R., Tritschler, H.-J., LeBlanc, A., Villare, F. & Manetto, V. Fatal Familial Insomnia, a Prion Disease with a Mutation at Codon 178 of the Prion Protein Gene. *N. Engl. J. Med.* **1992**, 326, 444.
37. Gajdusek, D. C. Unconventional Viruses and the Origin and Disappearance of Kuru. *Science.* **1977**, 197, 943.
38. Prusiner, S. B. An Introduction to Prion Biology and Diseases. In: Prusiner, S. B. Prion Biology and Diseases. New York: CSHL Press, 1999, p. 1-66.
39. Matrianni, J. A. The genetics of prion diseases. *Genetics in Medicine.* **2010**, 12, 187.
40. Linden, R., Martins, V.R., Prado, M. A. M., Cammarota, M., Izquierdo, I. & Brentani, R. R. Physiology of the Prion Protein. *Physiol. Rev.* **2008**, 88, 673.
41. Fournier, J-G., Escaig-Haye, F., de Villemeur, T. B., Robain, O., Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Dormont, D., Brown, P. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. *Cell and Tissue Research.* **1998**, 292, 77.
42. Wopfner, F. *et al.* Analysis of 27 Mammalian and 9 Avian PrPs Reveals High Conservation of Flexible Regions of the Prion Protein. *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 1163.
43. Bolton, D. C., Meyer, R. K. & Prusiner, S. B. Scrapie PrP 27-30 Is a Sialoglycoprotein. *J. Virol.* **1985**, 53, 596.
44. Oesch, B. *et al.* A Cellular Gene Encodes Scrapie PrP 27-30 Protein. *Cell* **1985**, 40, 735.
45. Prusiner, S. B. Molecular Biology of Prion Diseases. *Science.* **1991**, 252, 1515.
46. Calzolari, L. *et al.* NMR structures of three single-residue variants of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 8340.
47. Zahn, R. *et al.* NMR Solution Structure of the Human Prion Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 145.
48. Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. & Prusiner, S. B. Scrapie Prion Protein Contains a Phosphatidylinositol Glycolipid. *Cell* **1987**, 51, 229.
49. Vey, M. *et al.* Subcellular Colocalization of the Cellular and Scrapie Prion Proteins in Caveolae-like Membranous Domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 14945.
50. Peters, P. J. *et al.* Trafficking of Prion Proteins Through a Caveolae-mediated Endosomal Pathway Peter. *Journal Cell Biol.* **2003**, 162, 703.

51. Baral, P. K., Swayampakula, M., Aguzzi, A. & James, M. N. G. X-ray Structural and Molecular Dynamical Studies of the Globular Domains of Cow, Deer, Elk and Syrian Hamster Prion Proteins. *J. Struct. Biol.* **2015**, 192, 37.
52. Lee, S. *et al.* Conformational Diversity in Prion Protein Variants Influences Intermolecular Beta-sheet Formation. *EMBO J.* **2009**, 29, 251.
53. Haire, L. F. *et al.* The Crystal Structure of the Globular Domain of Sheep Prion Protein. *J. Mol. Biol.* **2004**, 336, 1175.
54. Lysek, D. A. *et al.* Prion protein NMR structures of cats , dogs , pigs , and sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102, 640.
55. Damberger, F. F., Christen, B., Pérez, D. R., Hornemann, S. & Wüthrich, K. Cellular Prion Protein Conformation and Function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 17308.
56. Biljan, I. *et al.* Structural Basis for the Protective Effect of the Human Prion Protein Carrying the Dominant-Negative E219K Polymorphism. *Biochem. J.* **2012**, 446, 243.
57. Brown, D. R. Prion and prejudice: Normal protein and the synapse. *Trends Neurosci.* **2001**, 24, 85.
58. Acevedo-morantes, C. Y. & Wille, H. The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models — Considerations and Pitfalls. *Viruses* **2014**, 6, 3875.
59. Aguzzi, A., Baumann, F. & Bremer, J. The Prion's Elusive Reason for Being. *Annu. Rev. Neurosci.* **2008**, 31, 439.
60. Martins, V.R., Mercadante, A.F., Cabral, A.L.B., Freitas, A.R.O. & Castro, R.M.R.P.S. Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* **2001**, 34, 585.
61. Wulf, M-A., Senatore, A. & Aguzzi, A. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biology.* **2017**, 15, 1.
62. Meyer, R. K. *et al.* Separation and Properties of Cellular and Scrapie Prion Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 2310.
63. Caughey, B. W. *et al.* Secondary Structure Analysis of the Scrapie-Associated Protein PrP 27-30 in Water by Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* **1991**, 30, 7672.
64. Pan, K. *et al.* Conversion of Alpha-Helices into Beta-Sheets features in the Formation of the Scrapie Prion Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90, 10962.
65. Huang, Z., Prusiner, S.B. & Cohen, F.E. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding and Design.* **1995**, 1, 13.

66. Caughey, B., Raymond, G.J., Callahan, M.A., Wong, C., Baron, G.S. & Xiong, L-W. Interactions and Conversions of prion protein isoforms. In: Caughey, B. *Advances in Protein Chemistry*. V.57 Prion Proteins. Academic Press: Toronto (2001).
67. Ross, C. a & Poirier, M. a. Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease. *Nat. Med.* **2004**, 10 Suppl, S10.
68. Demarco, M. L., Silveira, J., Caughey, B. & Daggett, V. Structural Properties of Prion Protein Protofibrils and Fibrils : An Experimental Assessment of Atomic Models. *Biochemistry* **2006**, 45, 15573.
69. Harris, D. a. Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12, 429.
70. Soto, C. Transmissible Proteins : Expanding the Prion Heresy. *Cell.* **2013**, 149, 968.
71. http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2010/09/100921_alzheimerrelatorio_ba.shtml (acessado em 13/08/2017 às 13h).
72. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2012:136E:0035:0044:PT:PDF> (acessado em 13/08/2017 às 17h).
73. <http://agencia.fapesp.br/15285> (acessa em 13/08/2017 às 21h).
74. Cobb, N. J., Sönnichsen, F. D., Mchaourab, H. & Surewicz, Witold, K. Molecular architecture of human prion protein amyloid : A parallel, in-register β -structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 18946.
75. Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 8342.
76. DeMarco, M. L. & Daggett, V. From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 2293.
77. Diaz-espinoza, R. & Soto, C. High-resolution structure of infectious prion protein : the final frontier. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 370.
78. Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C.M., Avdievich, N.I., Antholine, W.E., Olmstead, M.M., Vrislink, A., Gerfen, G.J., Peisach, J., Scott, W.G. & Millhauser, G.L. Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein. *Biochemistry* **2002**, 41, 3991.
79. Nelson, D.L. & Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed: Porto Alegre (2011).
80. Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C.W. *Fundamentos de Bioquímica, A vida em nível molecular*. Artmed: Porto Alegre (2008).

81. a. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3 : Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, 7, 525.
b. Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, 7, 2284.
82. van Gunsteren, W.F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hünenberger, P.H., Krüger, P., Mark, A. E., Scott, W. R. P. & Tironi, I. G. Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, 45, 4064.
83. Lindahl, E. R. Molecular Dynamics Simulations. In: *Molecular Modeling of Proteins*. Humana Press: Hertfordshire (2008).
84. Martínez, L., Borin, I. A. & Skaf, M. S. Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. In: *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. Livraria da Física: São Paulo (2007).
85. McQuarrie, D. A. *Statistical Mechanics*. University Science Books: New York (1976).
86. Birkhoff, G. D. Proof of the ergodic theorem. *PNAS.* **1931**, 12, 656.
87. http://www.emmsb.lncc.br/vemmsb/vemmsb_teorico/Kaline1.pdf (acessado em 12/06/2018 às 14 h).
88. Leach, A. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Pearson: Harlow (2001).
89. Scherer, C. *Métodos Coputacionais da Física*. Livraria da Física: São Paulo (2005).
90. Ponder, J. W. & Case, D. a. Force fields for protein simulations. *Adv. Protein Chem.* **2003**, 66, 27.
91. Lopes, P. E. M., Guvench, O. & Mackerell, A. D. Current status of protein force fields for molecular dynamics. *Methods Mol. Biol.* **2015**, 1215, 47.
92. Matthes, D. & de Groot, B.L. Secondary Structure Propensities in Peptide Folding Simulations: A systematic Comparison of Molecular Mechanics Interaction Schemes. *Biophysical Journal.* **2009**, 97, 599.
93. Sakae, Y. & Okamoto, Y. Folding simulations of three proteins having all α -helix, all β -strand and α/β -structures. *Molecular Simulation.* **2010**, 36, 302.
94. Lange, O.F., van der Spoel, D. & Groot, B. L. Scrutinizing molecular mechanics force fields on the submicrosecond timescale with NMR data. *Biophysical Journal.* **2010**, 99, 647.

95. Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Piana, S., Eastwood, M. P., Dror, R. O. & Shaw, D.E. Systematic validation of protein force fields against experimental data. *PlosOne*. **2012**, 7, 1.
96. Cino, E.A., Choy, W-Y. & Karttunen, M. Comparison of secondary structure formation using 10 different force fields in microsecond molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*. **2012**, 8, 2725.
97. Pantelopulos, G. A., Mukherjee, S. & Voelz, V. A. Microsecond simulations of mdm2 and its complex with p53 yield insight into force field accuracy and conformational dynamics. *Proteins*. **2015**, 83, 1665.
98. Smith, M. D., Rao, J. S., Segelken, E. & Cruz, L. Force-field induced bias in the structure of A β ₂₁₋₃₀: a comparison of OPLS, ABER, CHARMM, and GROMOS force fields. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2015**, 55, 2587.
99. Protein Data Bank at <<https://www.rcsb.org/>> (acessado em 14/06/2018 às 14h).
100. Lesk, A. M. *Introdução á Bioinformática*. Artmed: São Paulo (2008).
101. van der Spoel, D. *et al.* GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1701.
102. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. V. G. and J. H. Interaction models for water inrelation to protein hydration. *Intermol. Forces* **1981**, 331.
103. Jorgensen, W. L. & Madura, J. D. Solvation and Conformation of Methanol in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1407.
104. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J. & Madura, J. D. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926.
105. Byrd, R. H., Lu, P., Nocedal, J. & Zhu, C. A Limited Memory Algorithm for Bound Constrained Optimization. *SIAM J. Sci. Comput.* **1995**, 16, 1190.
106. Zhu, C., Byrd, R. H., Lu, P. & Nocedal, J. Algorithm 778: L-BFGS-B: Fortran Subroutines for Large-Scale Bound-Constrained Optimization. *ACM Trans. Math. Softw.* **1997**, 23, 550.
107. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. . C. & Fraaije, J. G. E. M. 3 LINCS : a Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, 18, 1463.
108. Miyamoto, S. & Kollman, P. A. SETTLE: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models. *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 952.
109. Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical Sampling Through Velocity Rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, 126, 14101.

110. Parrinello, M. & Rahman, A. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method Polymorphic Transitions in Single Crystals. *J. Appl. Phys.* **1981**, 52, 7182.
111. Essmann, U. *et al.* A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J Chem Phys* **1995**, 103, 8577.
112. PYMOL 1.3 at <<http://www.pymol.org>> (acessado em 27/06/2018 às 16h).
113. Abraham, M., Hess, B., van der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS Reference Manual - Version 5.1 (2015).
114. Campbell, M. K. & Farrell, S. O. *Bioquímica*. (Paraninfo, 2004).
115. Kabsch, W. & Sander, C. Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* **1983**, 22, 2577.
116. Amadei, A., Linssen, A.B.M. & Berendsen, H.J.C. Essential Dynamics of Proteins. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. **1993**, 17, 412.
117. Hess, B. Convergence of sampling in protein simulations. *Physical Review E*. **2002**, 65, 1.
118. Hess, B. Similarities between principal component of protein dynamics and random diffusion. *Physical Review E*. **2000**, 62, 8438.
119. Bro, R. & Smilde, A. K. Principal Component Analysis. *Anal. Methods* **2014**, 6, 2812.
120. Stock, G., Jain, A., Riccardi, L. & Nguyen, P. H. in *Protein and Peptide Folding, Misfolding, and Non-Folding* (ed. Schweitzer-Stenner, R.) 57–77 (Wiley, 2012).
121. Huang, Z., Gabriel, J.-M., Balwin, M. A., Fletterick, R. J., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 7139.
122. Lin, Z., van Gusteren, W. F. & Liu, H. Conformational state-specific free energy differences by one-step perturbation: Protein secondary structure preferences of the GROMOS 43A1 and 53A6 force fields. *J. Comput. Chem.* **2011**, 32, 2290.
123. Gilis, D. & Rooman, M. PoPMuSiC, an algorithm for predicting protein mutant stability changes. Application to prion proteins. *Protein Eng.* **2000**, 13, 849.
124. Kallberg, Y., Gustafsson, M., Persson, B., Thyberg, J. & Johansson, J. Prediction of amyloid fibril-forming proteins. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 12945.
125. Mormon, J.-P., Prat, K., Dupuis, F. & Callebaut, I. Structural features of prions explored by sequence analysis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 1366.

126. Peretz, D., Williamson, R. A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R. B., Rozenshteyn, R., James, T. L., Houghten, R. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Burton, D. R. A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 614.
127. Inouye, H. & Kirschner, D. A. Polypeptide Chain Folding in the Hydrophobic Core of Hamster Scrapie Prion: Analysis by X-Ray Diffraction. *J. Struct. Biol.* **1998**, 122, 247.
128. Heller, J., Kolbert, A.C., Larsen, R., Ernst, M., Bekker, T., Baldwin, M., Wemmers, D.E., Prusiner, S. B & Pines, A. Solid-state NMR studies of the prion protein H1 fragment. *Protein Sci.* **1996**, 5, 1655.
129. Satheeshkumar, K. S. & Jayakumar, R. Conformational Polymorphism of the Amyloidogenic Peptide Homologous to Residues 113–127 of the Prion Protein. *Biophys. J.* **2003**, 85, 473.
130. Borgohain, G., Dan, N. & Paul, S. Use of molecular dynamics simulation to explore structural facets of human prion protein with pathogenic mutations. *Biophys. Chem.* **2016**, 213, 32.
131. Apetri, A. C. & Surewicz, W. K. Atypical Effect of Salts on the Thermodynamic Stability of Human Prion Protein. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 22187.
132. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K.E. & Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, 11, 3696.
133. Huang, J. & Mackerell, A. D. J., CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput. Chem.* **2013**, 34, 2135.
134. Schmid, N., Eichenberger, A.P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A.E & van Gasteren, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **2011**, 40, 843.
135. Vila-Viçosa, D., Campos, S. R. R., Baptista, A. M. & Machuqueiro, M. Reversibility of prion misfolding: insights from constant-pH molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116, 8812.
136. Jackson, G. S., Hosszu, L. L., Power, A., Hill, A. F., Kenney, J., Saibil, H., Craven, C. J., Waltho, J. P., Clarke, A. R. & Collinge, J. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrilogenic conformations. *Science.* **1999**, 283, 1935.
137. Jenkins, D. C., Pearson, D. S., Harvey, A., Sylvester, I. D., Geeves, M. A. & Pinheiro, T. J. T. Rapid folding of the prion protein captured by pressure-jump. *Eur. Biophys. J.* **2009**, 38, 625.

138. Hornemann, S. & Glockshuber, R. Autonomous and reversible folding of a soluble amino-terminally truncated segment of the mouse prion protein. *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 614.
139. Horiuchi, M. & Caughey, B. Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure.* **1999**, 7, 231.
140. Bjorndahl, T. C., Zhou, G. P., Liu, X., Perez-Pineiro, R., Semenchenko, V., Saleem, F., Acharya, S., Bujold, A., Sobsey, C. A. & Wishart, D. S. Detailed biophysical characterization of the acid-induced PrP^C to PrP^B conversion process. *Biochemistry* **2011**, 50, 1162.
141. Gerber, R., Tahiri-Alaoui, A., Hore, P. J. & James, W. Conformational pH dependence of intermediate states during oligomerization of the human prion protein. *Protein Sci.* **2008**, 17, 537.

9. ANEXOS

Anexo A1: Função de energia do campo de força AMBER:

O potencial total, $V(r)$, para o campo de força AMBER99 é descrito pela soma dos potenciais ligado e não-ligado, apresentados, respectivamente, nas Equações (1) e (2) a seguir:^{21,22,23}

$$V_{\text{lig}} = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_r} K_{rn} (r_n - r_{0n})^2 + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\theta} K_{\theta n} (\theta_n - \theta_{0n})^2 + \sum_{i=1}^{N_\Phi} \sum_{n=1}^5 K_{ni} [\cos(\Phi_i - \pi)]^n \quad (1)$$

$$V_{\text{não-lig}} = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^N \left\{ 4\epsilon^{ij} \alpha_{LJ,ij} \left[\left(\frac{r_0^{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_0^{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right\} + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^N \alpha_{\text{Coul},ij} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2)$$

Sendo: N_Φ é o número total de diedros próprios, $K_{n,i}$ é a altura da barreira torcional do i -ésimo ângulo diedral; Φ_i é o i -ésimo diedro próprio; $\alpha_{\text{Coul},ij}$ e $\alpha_{LJ,ij}$ são nulos para interações 1-2 e 1-3, para interações 1-4 assumem, respectivamente, valores padrão de 0,5 e 0,8333 e, por fim, assumem valor unitário para as demais interações.

O primeiro e o segundo termo em (1) são potenciais harmônicos, enquanto o terceiro termo é um potencial de Rieckaert-Bellemans. O primeiro termo em (2) é um potencial de Lennard-Jones e o segundo termo é um potencial de Coulomb

Anexo A2: Função de energia do campo de força OPLS:

A expressão para a função potencial total para o campo de força OPLS-AA (do inglês, *Optimized Parameters for Liquid State Simulations All-Atom*) é a soma dos potenciais não-ligado ($V_{\text{não-ligado}}$), de estiramento de ligação (V_r), de ângulo de ligação (V_θ) e de torção ($V_{\text{torcional}}$). O potencial não-ligado representa a soma das contribuições dos potenciais de Coulomb e de Lennard-Jones tanto para as interações inter como intramoleculares, conforme a equação a seguir:²⁶

$$V_{\text{lig}} = \sum_{n=1}^{N_r} K_{r_n} (r_n - r_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\theta} K_{\theta_n} (\theta_n - \theta_{0n})^2 + V_{\text{diedral}} \quad (1)$$

$$V_{\text{diedral}} = \sum_i \left\{ \frac{V_1^i}{2} [1 + \cos(\phi_i)] + \frac{V_2^i}{2} [1 - \cos(2\phi_i)] + \frac{V_3^i}{2} [1 + \cos(3\phi_i)] \right\} \quad (2)$$

$$V_{\text{não-ligado}} = V_{\text{vdw}} + V_{\text{Coul}} = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^N \left\{ 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_0^{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_0^{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] f_{ij} \right\} + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^N \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \quad (3)$$

Sendo: o coeficiente f_{ij} igual a zero, para pares i-j conectados por uma ligação (interações 1-2) ou por um ângulo de ligação (interações 1-3). $f_{ij} = 0,5$ para interações 1-4 (átomos separados por 3 ligações) e $f_{ij} = 1,0$ para todos os outros casos.⁽⁶⁵⁾

O primeiro e o segundo termo em (1) são potenciais harmônicos. O potencial de diedros em (2) é um potencial trigonométrico cossenoidal com a altura da barreira torcional do i-ésimo ângulo diedral V (V_1^i , V_2^i e V_3^i). Na Equação (3), o primeiro termo é representado por um potencial de Lennard-Jones e o segundo, por um potencial de Coulomb.

Anexo A3: Função de energia do campo de força CHARMM:

$$U(R) = \sum_{\text{ligação}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{UB} K_{UB} (S - S_0)^2 + \sum_{\text{ângulo}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + V_{\text{diedral}} + V_{LJ} + V_{\text{Coulomb}} \quad (1)$$

$$V_{\text{diedral}} = \frac{1}{2} \sum_{\text{impróprio}} K_{\text{imp}} (\varphi - \varphi_0)^2 + \sum_{\text{diedral}} K_\chi [1 + \cos(n\chi - \delta)] \quad (2)$$

$$V_{LJ} + V_{\text{Coulomb}} = \sum_{\text{não-ligado}} \epsilon \left[\left(\frac{R_{\text{min}}^{\text{ij}}}{r_{\text{ij}}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\text{min}}^{\text{ij}}}{r_{\text{ij}}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_1 r_{\text{ij}}} \quad (3)$$

Onde: K_b , K_{UB} , K_θ , K_χ e K_{imp} são as constantes de força de ligação, Urey-Bradley, angular, diedral, diedral impróprio, respectivamente. b , S , θ , χ e φ são o comprimento de ligação, a distância-1,3 de Urey-Bradley, ângulo de ligação, ângulo diedra e ângulo torsional impróprio, respectivamente, com o subscrito zero representando os valores de equilíbrio. Os termos de Coulomb e de Lennard-Jones 6-12 contribuem para as interações não-ligadas. ϵ é a profundidade do potencial de Lennard-Jones, ϵ_1 é a constante dielétrica efetiva e r_{ij} é a distância entre os átomos i e j . Os parâmetros de Lennard-Jones entre pares de átomos diferentes são obtidos pelas regras de combinação de Lorentz-Berthelot, na qual os valores ϵ_{ij} são baseados na médias geométrica de ϵ_i e ϵ_j e os valores de $R_{\text{min}}^{\text{ij}}$ são baseados na média aritmética de R_{mini} e R_{minj} .^{24,25}

Anexo A4: Definição de estruturas secundárias:**Estruturas secundárias definidas com base em padrões de ligações de hidrogênio:¹¹⁵**

n-Voltas (ou do inglês, *n-Turns*): o padrão básico das ligações de hidrogênio (LH), envolvidas nas n-voltas, é do tipo (i, i + n). A ligação de hidrogênio se estabelece do resíduo CO (i) ao resíduo NH (i + n):

$$n\text{-voltas (i)} = \text{LH (i, i + n)} \quad , \text{ sendo } n = 3,4,5.$$

Hélices: uma hélice mínima é definida por 2 n-voltas consecutivas. Com base nos tipos de n-voltas são definidos três tipos de hélices mínimas: 3-hélice, 4-hélice e 5-hélice (conforme mostrado na Figura S1). Hélices maiores são definidas pela sobreposição de hélices mínimas. Assim, a sobreposição de 3-hélices gera uma 3_{10} -hélice; a sobreposição de 4-hélices gera uma α -hélice; e a sobreposição de 5-hélices gera uma π -hélice.

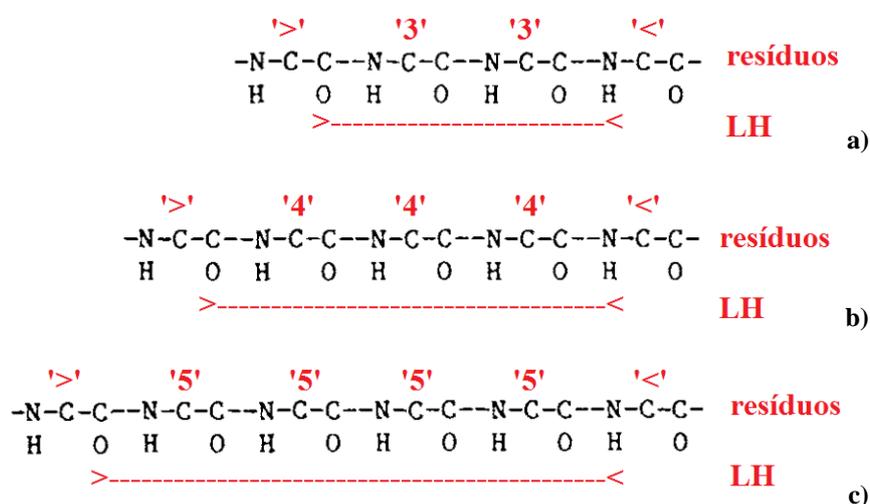


Figura S1: Representação esquemática da formação da ligação de hidrogênio (LH) estabelecida entre os grupamentos CO (i) e NH (i + n) na cadeia polipeptídica que define os diferentes tipos de n-voltas: **a)** 3-volta; **b)** 4-volta; **c)** 5-volta (imagens adaptadas do artigo de Kabsch e Sander)⁽⁸¹⁾.

Segmento β (ou do inglês, β -Bridge): um *segmento β* ocorre entre os resíduos i e j, se existirem duas ligações de hidrogênio características de estrutura β , em particular:

$$\text{Segmento } \beta \text{ paralelo (i,j)} = [\text{LH (i - 1, j)} \text{ and } \text{LH (j, i + 1)}]$$

$$\text{Segmento } \beta \text{ anti-paralelo (i,j)} = [\text{LH (i, j)} \text{ and } \text{LH (j, i)}]$$

Fitas- β pareadas e Folhas- β (ou do inglês, β -ladders e β -sheet, respectivamente):

- **Fitas- β pareadas:** conjunto de um ou mais *segmentos β* , de igual tamanho, consecutivos;
- **Folhas- β :** conjunto de uma ou mais *fitas- β pareadas* conectadas por resíduos compartilhados.

De maneira equivalente, pode-se dizer que duas fitas conectadas constituem uma estrutura que aqui denominamos de *fitas- β pareadas* (ou β -ladder). Assim, uma estrutura formada de três *fitas* pareadas

possui duas *fitas-β pareadas* (β -ladders) e uma *folha-β* (β -sheet). A Figura S2, a seguir, apresenta um esquema das ligações de hidrogênio nos *segmentos β paralelo* e *anti-paralelo*.

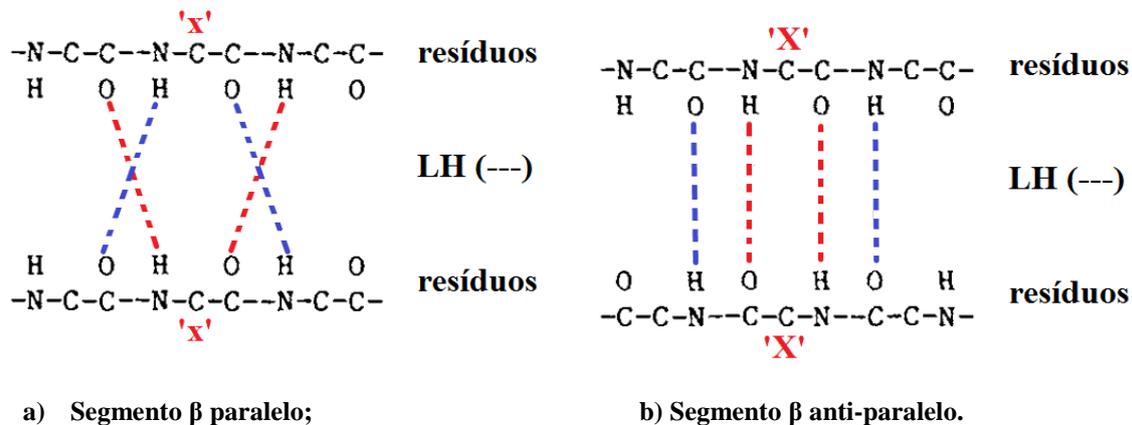


Figura S2: Representação esquemática das ligações de hidrogênio (LH) na estruturas: **a)** Segmento β paralelo; **b)** Segmento β anti-paralelo (imagens adaptadas do artigo de Kabsch e Sander)⁽⁸¹⁾.

Estrutura secundária geometricamente definida:

Dobras (ou do inglês, bends): são espécies com alta curvatura. Define-se a curvatura da cadeia, em um resíduo central i de 5 resíduos, como o ângulo entre a direção da cadeia principal dos três primeiros resíduos e, a dos três últimos. Para existir uma *dobra* no resíduo central i , é necessário uma curvatura de pelo menos 70° , conforme apresentado na Figura S3, a seguir.



Figura S3: Esquema da curvatura para as *dobras (bends)*, indicando um ângulo ($>70^\circ$) entre a direção dos 3 primeiros resíduos e a direção dos 3 últimos resíduos do fragmento da cadeia polipeptídica em questão (imagem adaptada do artigo de Kabsch e Sander)⁽⁸¹⁾.

Com base nessas definições de estrutura secundária é possível realizar análises estruturais das proteínas simuladas. Na análise de DSSP é produzido um gráfico que relaciona o tipo de estrutura secundária que cada resíduo da cadeia polipeptídica (eixo y) possui ao longo do tempo de simulação (eixo x). Na análise de SCOUNT, é produzido um gráfico que relaciona o número de resíduos (eixo y) envolvidos em cada tipo de estrutura secundária ao longo do tempo (eixo x) de simulação. Por fim, as imagens de estruturas de proteínas apresentadas neste trabalho foram produzidas utilizando o programa SPDBV⁽⁵⁷⁾.

10. APÊNDICES

Apêndice A1: Média e desvio padrão de RMSD de C α entre as cinco réplicas para cada um dos campos de força entre 90 e 100 ns de simulação

RMSD de C α (nm) entre 90 e 100 ns

Simulação	Réplica	N-terminal	C-terminal	Total
GROMOS96 53A6_neutro	Réplica 1	0,5653	0,3207	0,4149
	Réplica 2	0,9297	0,5228	0,6799
	Réplica 3	0,7093	0,4972	0,5735
	Réplica 4	0,8006	0,4431	0,5816
	Réplica 5	0,5940	0,4074	0,4753
	Média	0,7198	0,4382	0,5450
	Desvio Padrão	0,1503	0,0797	0,1026
GROMOS96 53A6_ácido	Réplica 1	1,2080	0,4707	0,7851
	Réplica 2	0,8522	0,4753	0,6209
	Réplica 3	0,8973	0,4496	0,6281
	Réplica 4	0,7399	0,4678	0,5695
	Réplica 5	0,8444	0,4653	0,6125
	Média	0,9084	0,4657	0,6432
	Desvio Padrão	0,1772	0,0098	0,0825
AMBER99SB_neutro	Réplica 1	0,9708	0,4768	0,6730
	Réplica 2	0,6021	0,3091	0,4241
	Réplica 3	0,8968	0,4700	0,6365
	Réplica 4	0,7353	0,3263	0,4934
	Réplica 5	0,9155	0,4273	0,6241
	Média	0,8241	0,4019	0,5702
	Desvio Padrão	0,1519	0,0794	0,1062
AMBER99SB_ácido	Réplica 1	1,1142	0,5060	0,7531
	Réplica 2	1,2801	0,5756	0,8627
	Réplica 3	1,2779	0,4948	0,8265
	Réplica 4	1,2675	0,4464	0,8023
	Réplica 5	0,9932	0,4820	0,6858
	Média	1,1866	0,5010	0,7861
	Desvio Padrão	0,1287	0,0474	0,0688
GROMOS96_43A1_neutro	Réplica 1	0,7531	0,5051	0,5956
	Réplica 2	0,8860	0,4148	0,6064
	Réplica 3	0,8153	0,4002	0,5667
	Réplica 4	0,5863	0,3293	0,4285
	Réplica 5	0,7545	0,4023	0,5403
	Média	0,7590	0,4103	0,5475

	Desvio Padrão	0,1109	0,0627	0,0714
GROMOS96_43A1_ácido	Réplica 1	0,7629	0,4449	0,5661
	Réplica 2	0,6750	0,5734	0,6077
	Réplica 3	1,1416	0,5869	0,8064
	Réplica 4	0,6994	0,5435	0,5977
	Réplica 5	0,9078	0,3806	0,6016
	Média	0,8373	0,5059	0,6359
	Desvio Padrão	0,1927	0,0894	0,0967
AMBER99SB_ILDN_neutro	Réplica 1	0,6658	0,3254	0,4609
	Réplica 2	1,1093	0,3917	0,7023
	Réplica 3	0,7771	0,4806	0,5905
	Réplica 4	0,7051	0,3894	0,5106
	Réplica 5	0,7701	0,3684	0,5292
	Média	0,8055	0,3911	0,5587
	Desvio Padrão	0,1760	0,0567	0,0927
AMBER99SB_ILDN_ácido	Réplica 1	0,7643	0,3724	0,5286
	Réplica 2	0,7206	0,2932	0,4719
	Réplica 3	0,9963	0,3498	0,6300
	Réplica 4	0,6878	0,4235	0,5216
	Réplica 5	0,9608	0,3059	0,5961
	Média	0,8260	0,3490	0,5496
	Desvio Padrão	0,1425	0,0526	0,0630
OPLS-AA_neutro	Réplica 1	0,6230	0,3376	0,4479
	Réplica 2	0,9002	0,5164	0,6620
	Réplica 3	0,9072	0,4688	0,6403
	Réplica 4	0,5636	0,3903	0,4523
	Réplica 5	0,5731	0,4381	0,4848
	Média	0,7134	0,4302	0,5375
	Desvio Padrão	0,1752	0,0692	0,1050
OPLS-AA_ácido	Réplica 1	0,9875	0,5371	0,7109
	Réplica 2	0,7292	0,5787	0,6301
	Réplica 3	1,2987	0,5484	0,8592
	Réplica 4	0,8490	0,4424	0,6012
	Réplica 5	1,1867	0,7390	0,9045
	Média	1,0102	0,5691	0,7412
	Desvio Padrão	0,2344	0,1078	0,1355
CHARMM27_neutro	Réplica 1	0,8636	0,3580	0,5683
	Réplica 2	0,6682	0,3906	0,4954
	Réplica 3	0,6451	0,3350	0,4563
	Réplica 4	0,8170	0,3345	0,5360
	Réplica 5	0,6853	0,3894	0,5023
	Média	0,7358	0,3615	0,5117
	Desvio Padrão	0,0978	0,0277	0,0425
CHARMM27_ácido	Réplica 1	0,9423	0,3797	0,6154
	Réplica 2	0,7943	0,3986	0,5548
	Réplica 3	1,3971	0,6550	0,9540

10. APÊNDICES

Réplica 4	0,7498	0,5797	0,6384
Réplica 5	0,7861	0,3827	0,5434
Média	0,9339	0,4791	0,6612
Desvio Padrão	0,2692	0,1291	0,1685

Apêndice A2: Gráfico de RMSD de C_{α} para o fragmento N-terminal (109-143) ao longo do tempo de simulação

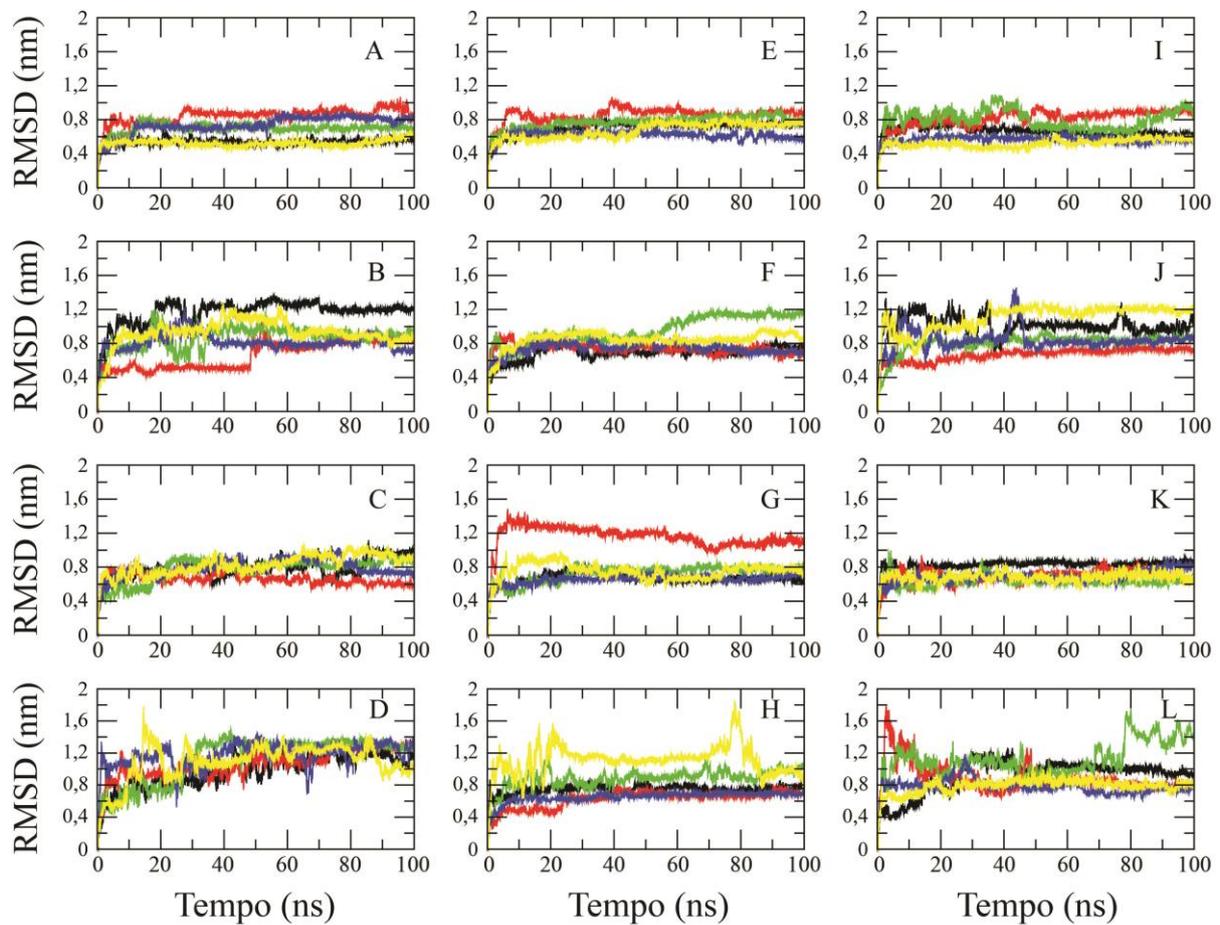


Gráfico de RMSD de C_{α} , para o fragmento proteico N-terminal (109-143), ao longo do tempo de simulação. Cada gráfico mostra cinco curvas relativas às réplicas para cada campo de força em uma das condições de pH: A) GROMOS96 53A6, pH neutro; B) GROMOS96 53A6, pH ácido; C) AMBER99SB, pH neutro; D) AMBER99SB, pH ácido; E) GROMOS96 43A1, pH neutro; F) GROMOS96 43A1, pH ácido; G) AMBER99SB-ILDN, pH neutro; H) AMBER99SB-ILDN, pH ácido; I) OPLS-AA, pH neutro; J) OPLS-AA, pH ácido; K) CHARMM27, pH neutro; L) CHARMM22, pH ácido. As cores das curvas correspondem às réplicas: preto = réplica 1; vermelho = réplica 2; verde = réplica 3; azul = réplica 4; amarelo = réplica 5.

Apêndice A3: Gráfico de RMSD de C_{α} para o fragmento C-terminal (144-219) ao longo do tempo de simulação

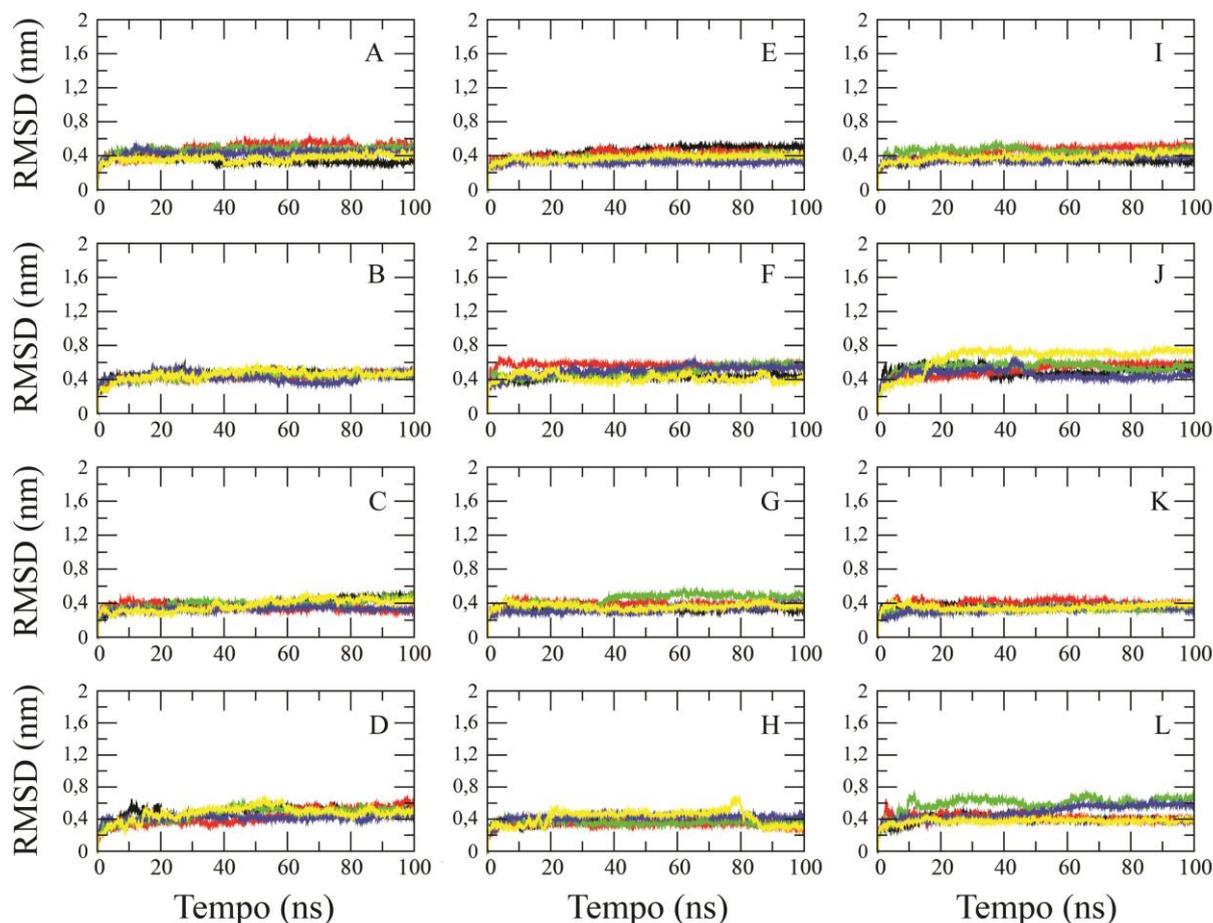
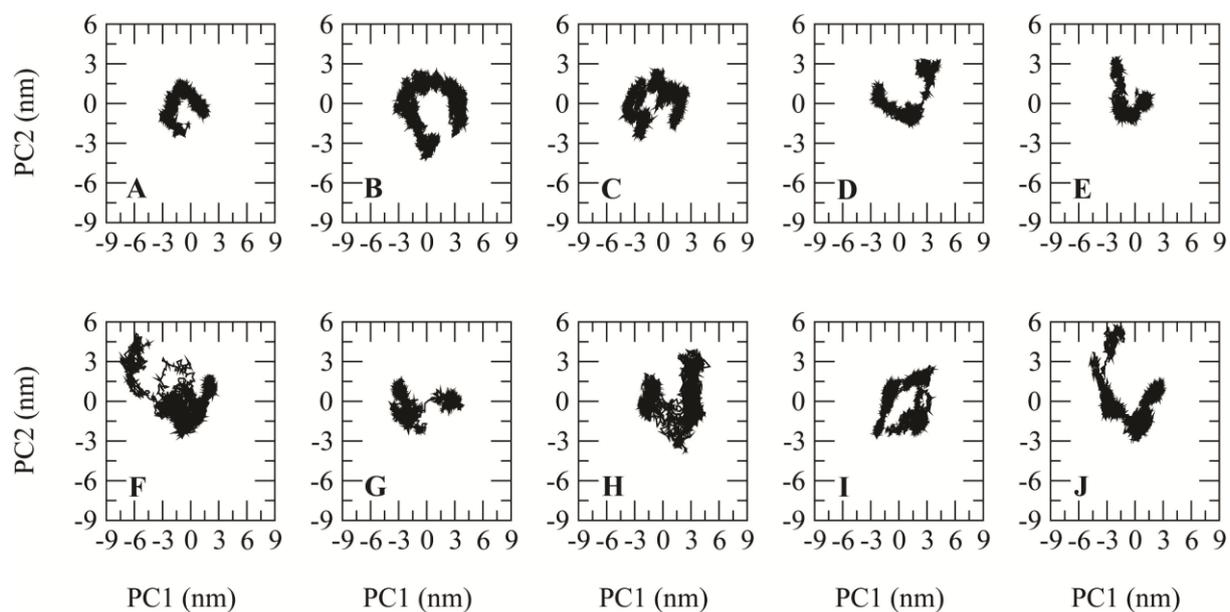


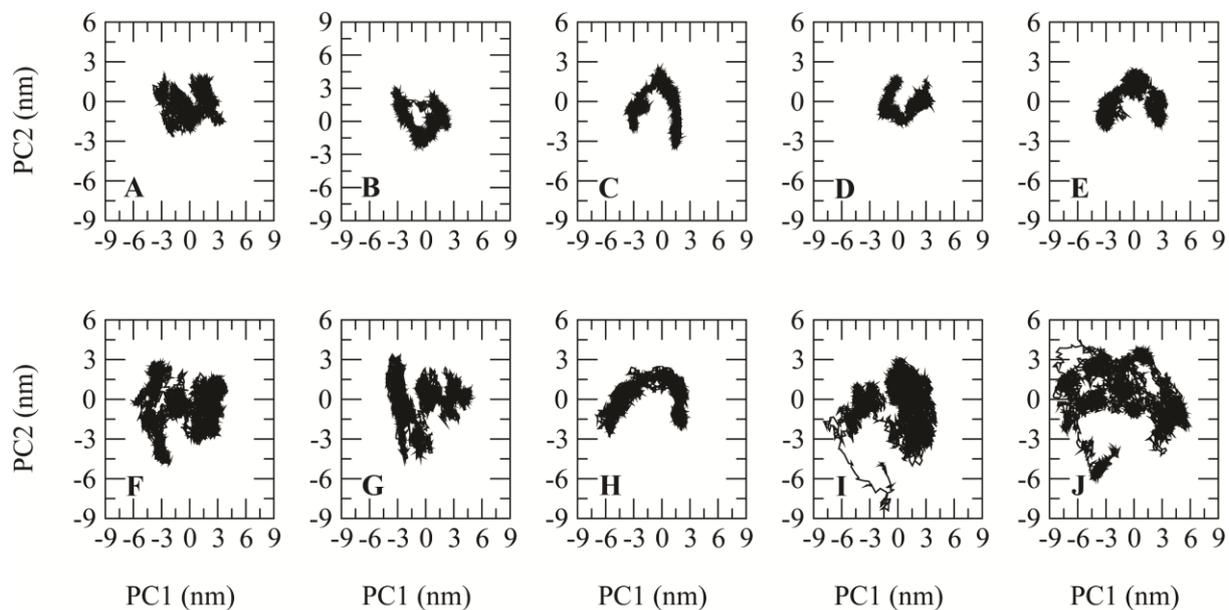
Gráfico de RMSD de C_{α} , para o fragmento proteico C-terminal (144-219), ao longo do tempo de simulação. Cada gráfico mostra cinco curvas relativas às réplicas para cada campo de força em uma das condições de pH: **A)** GROMOS96 53A6, pH neutro; **B)** GROMOS96 53A6, pH ácido; **C)** AMBER99SB, pH neutro; **D)** AMBER99SB, pH ácido; **E)** GROMOS96 43A1, pH neutro; **F)** GROMOS96 43A1, pH ácido; **G)** AMBER99SB-ILDN, pH neutro; **H)** AMBER99SB-ILDN, pH ácido; **I)** OPLS-AA, pH neutro; **J)** OPLS-AA, pH ácido; **K)** CHARMM227, pH neutro; **L)** CHARMM22, pH ácido. As cores das curvas correspondem às réplicas: preto = réplica 1; vermelho = réplica 2; verde = réplica 3; azul = réplica 4; amarelo = réplica 5.

Apêndice A4: Análise de componentes principais para o campo de força GROMOS96 53a6



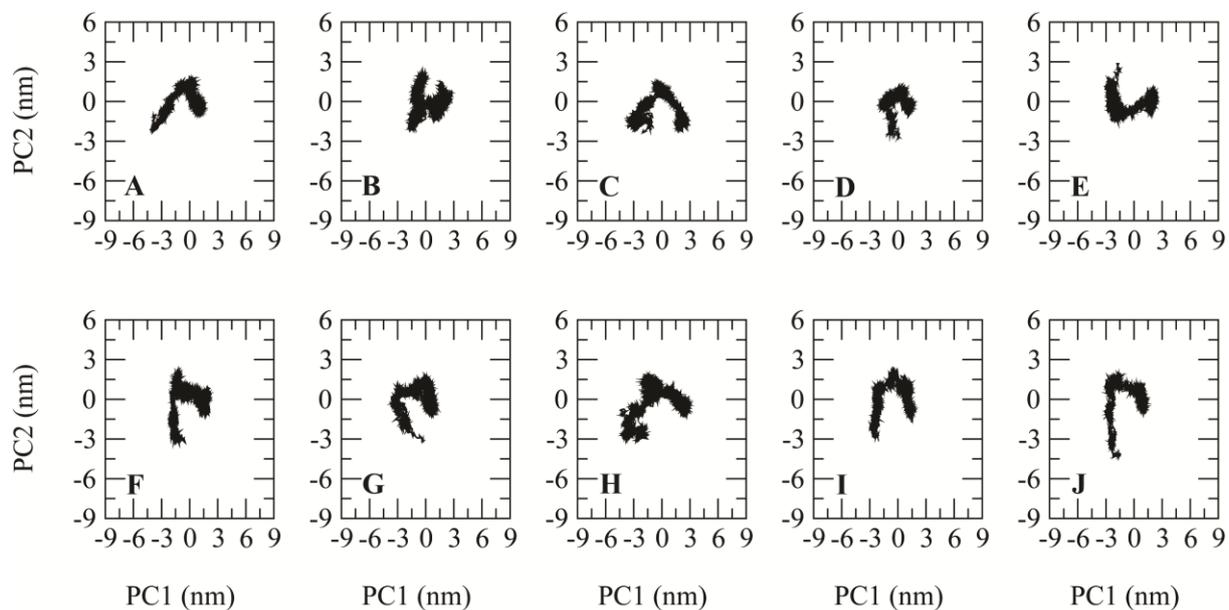
Análise de componentes principais para o campo de força GROMOS96 53a6. Projeção sobre os dois primeiros componentes: **A-E)** Réplicas neutras; **F-J)** Réplicas ácidas.

Apêndice A5: Análise de componentes principais para o campo de força AMBER99SB



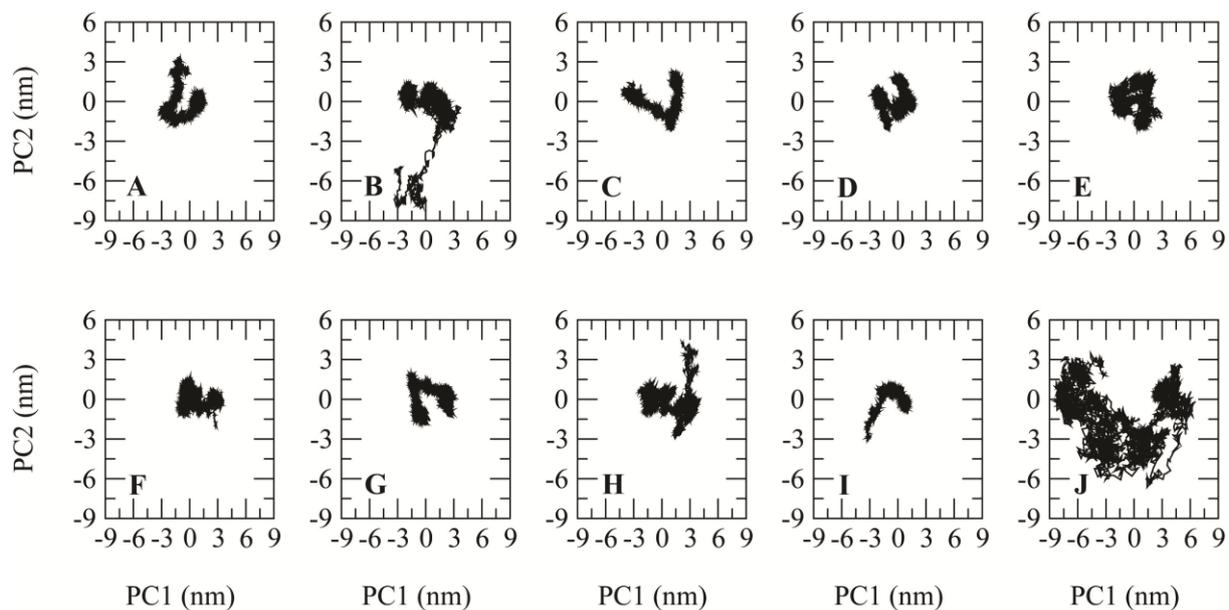
Análise de componentes principais para o campo de força AMBER99SB. Projeção sobre os dois primeiros componentes: **A-E)** Réplicas neutras; **F-J)** Réplicas ácidas.

Apêndice A6: Análise de componentes principais para o campo de força GROMOS96 43a1

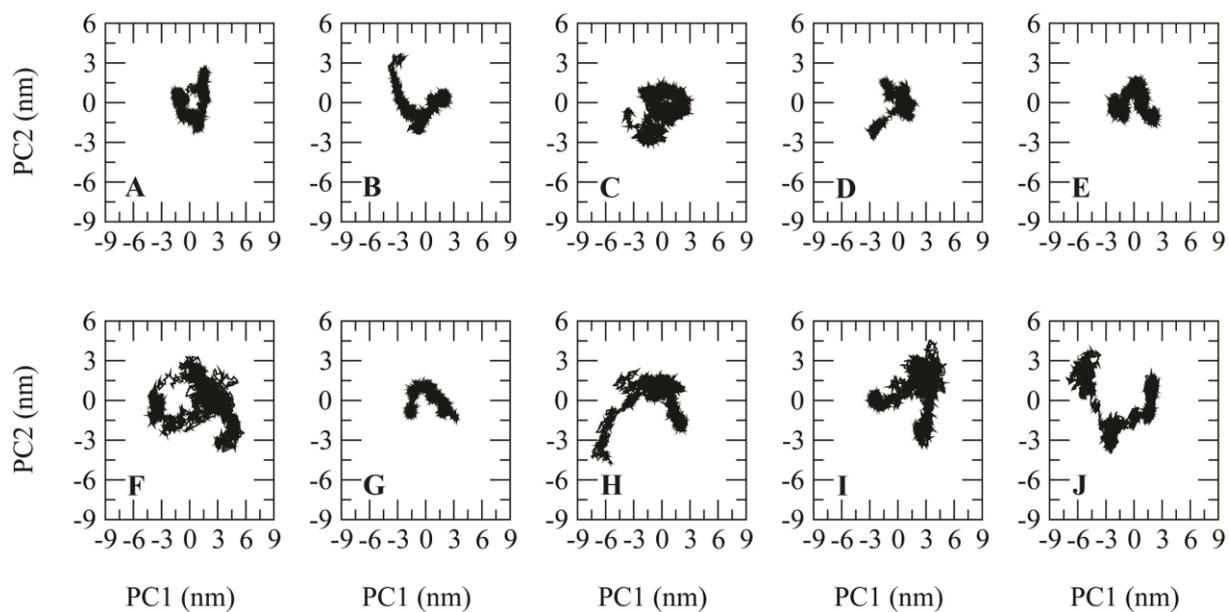


Análise de componentes principais para o campo de força GROMOS96 43a1. Projeção sobre os dois primeiros componentes: **A-E)** Réplicas neutras; **F-J)** Réplicas ácidas.

Apêndice A7: Análise de componentes principais para o campo de força AMBER99SB-ILDN

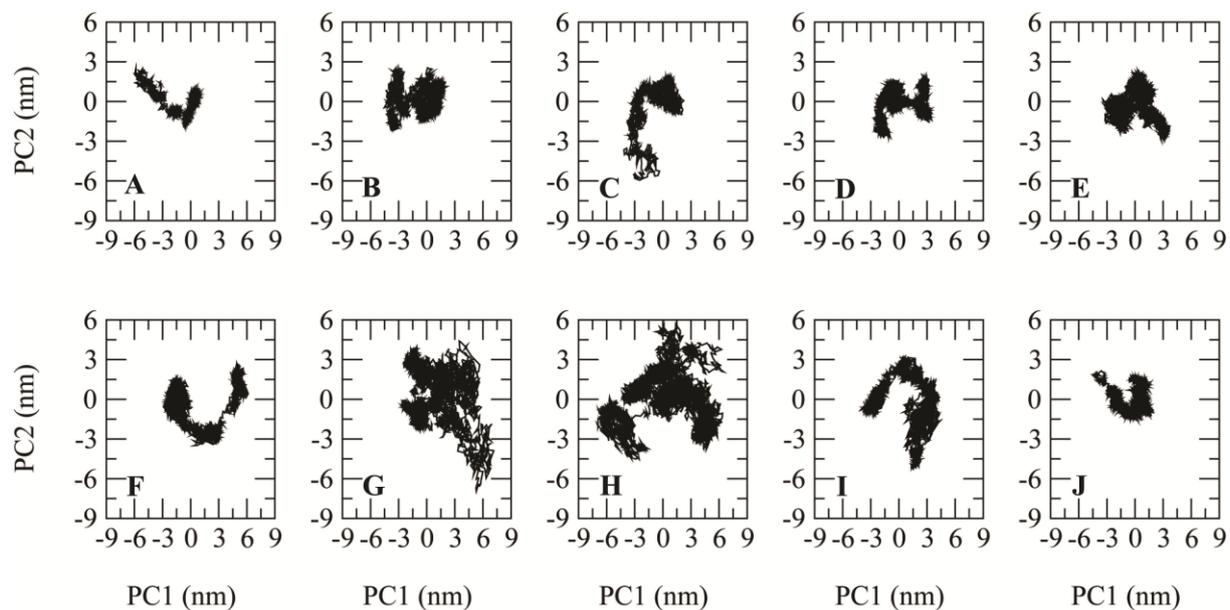


Análise de componentes principais para o campo de força AMBER99SB-ILDN. Projeção sobre os dois primeiros componentes: A-E) Réplicas neutras; F-J) Réplicas ácidas.

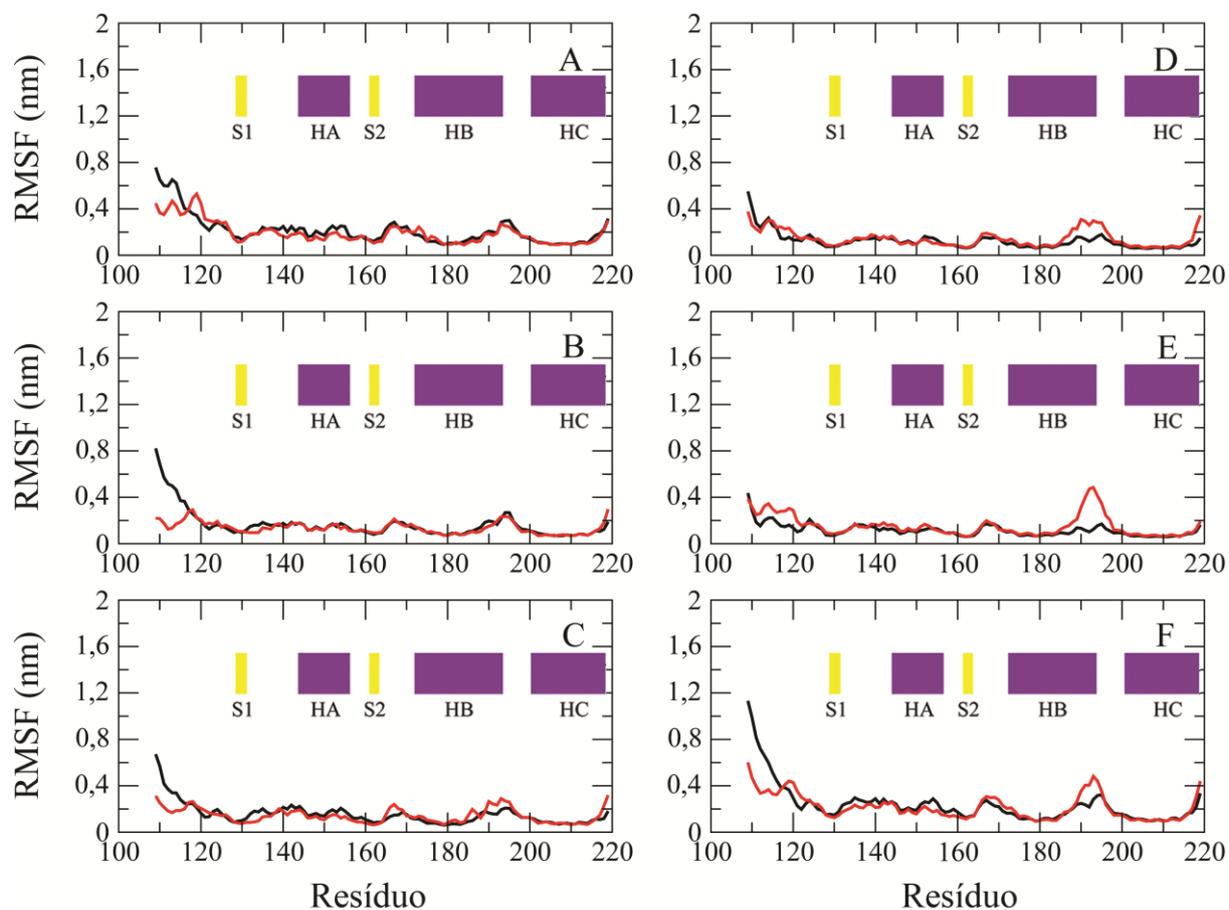
Apêndice A8: Análise de componentes principais para o campo de força OPLS-AA

Análise de componentes principais para o campo de força OPLS-AA. Projeção sobre os dois primeiros componentes: **A-E)** Réplicas neutras; **F-J)** Réplicas ácidas.

Apêndice A9: Análise de componentes principais para o campo de força CHARMM27

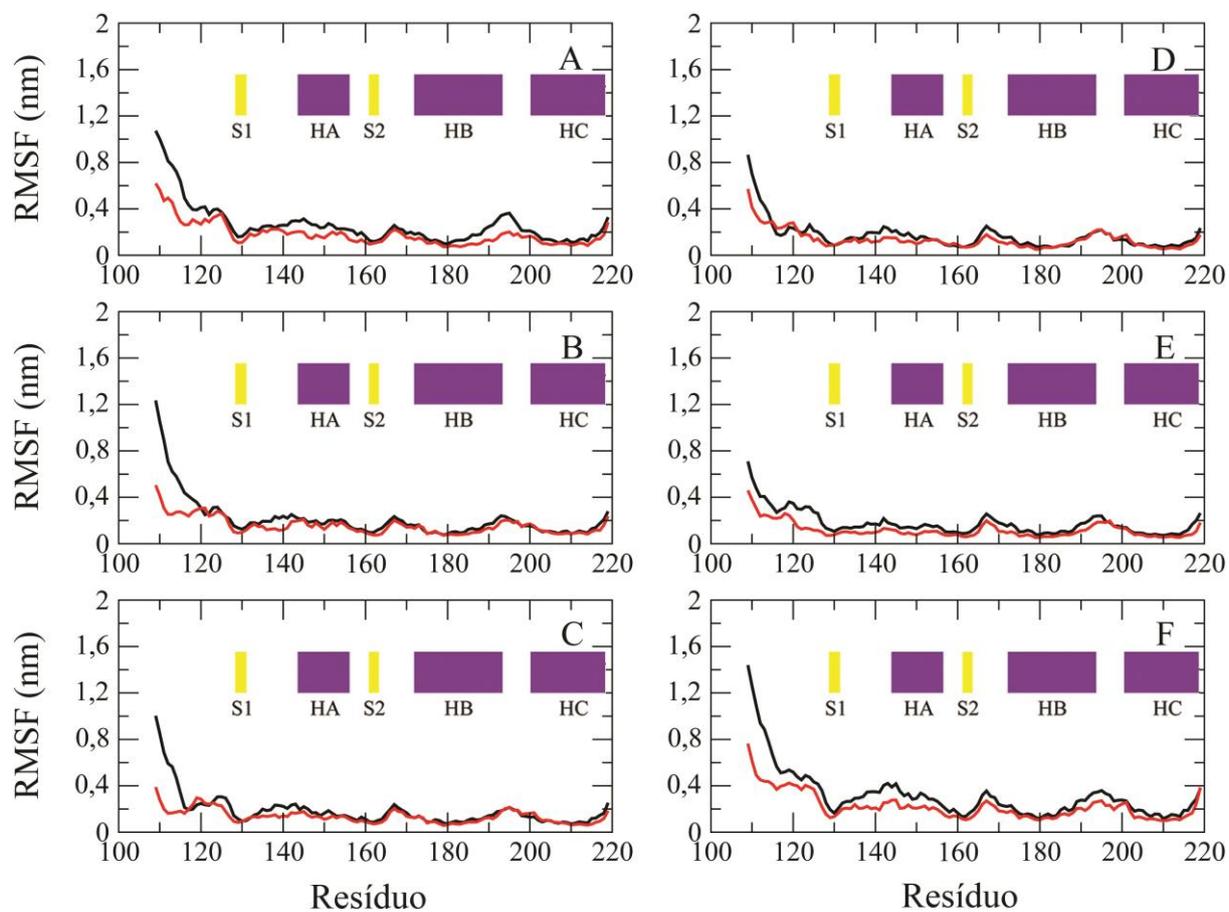


Análise de componentes principais para o campo de força CHARMM27. Projeção sobre os dois primeiros componentes: **A-E)** Réplicas neutras; **F-J)** Réplicas ácidas.

Apêndice A10: RMSF de $C\alpha$ do fragmento 109-219 para o campo de força GROMOS96 53a6

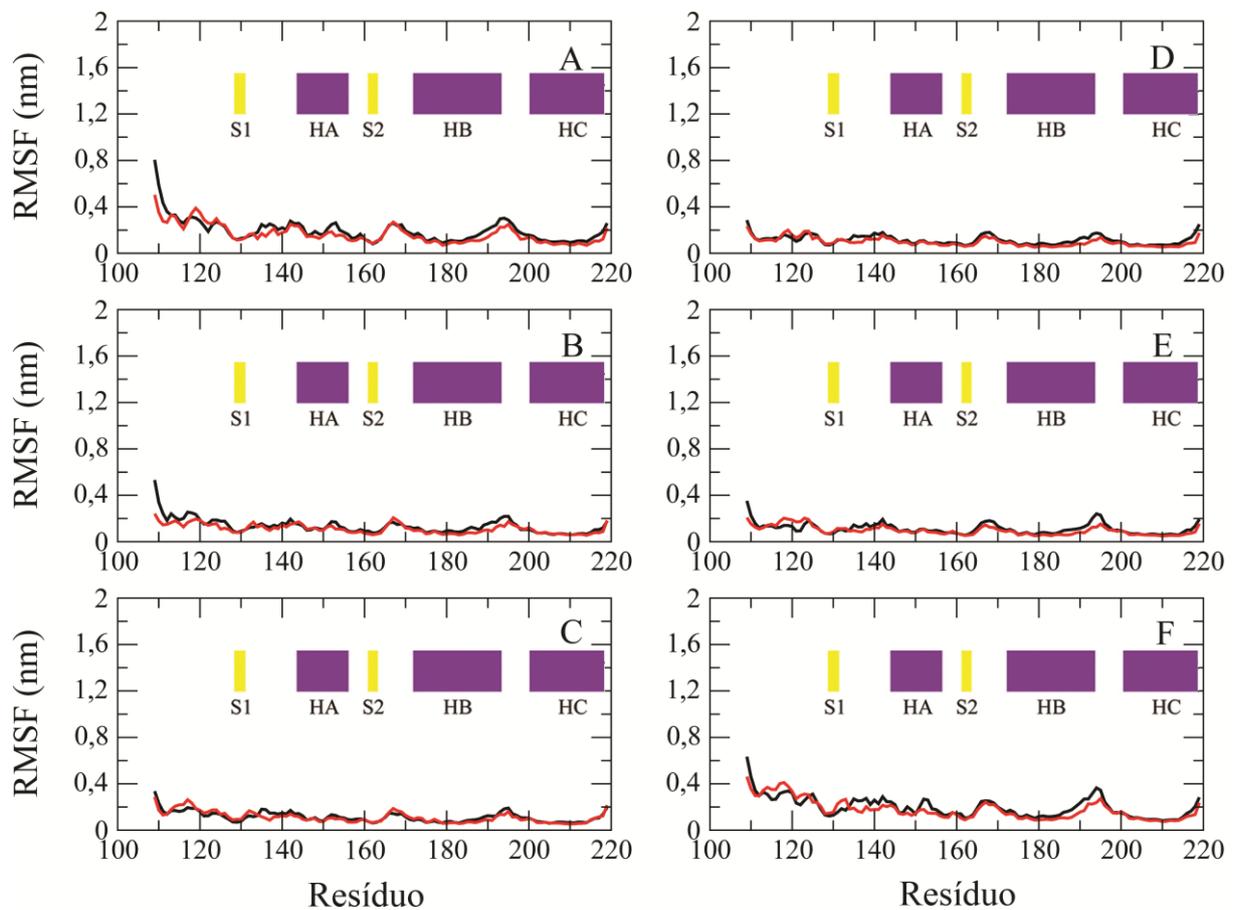
RMSF de $C\alpha$ do fragmento 109-219 para o campo de força GROMOS96 53a6 nos seguintes intervalos de tempo: a) 0-20 ns; b) 20-40 ns; c) 40-60 ns; d) 60-80 ns; e) 80-100 ns; f) 0-100 ns. Legenda: curvas pretas = média entre as réplicas ácidas; curvas vermelhas = média entre as réplicas neutras.

Apêndice A11: RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força AMBER99SB



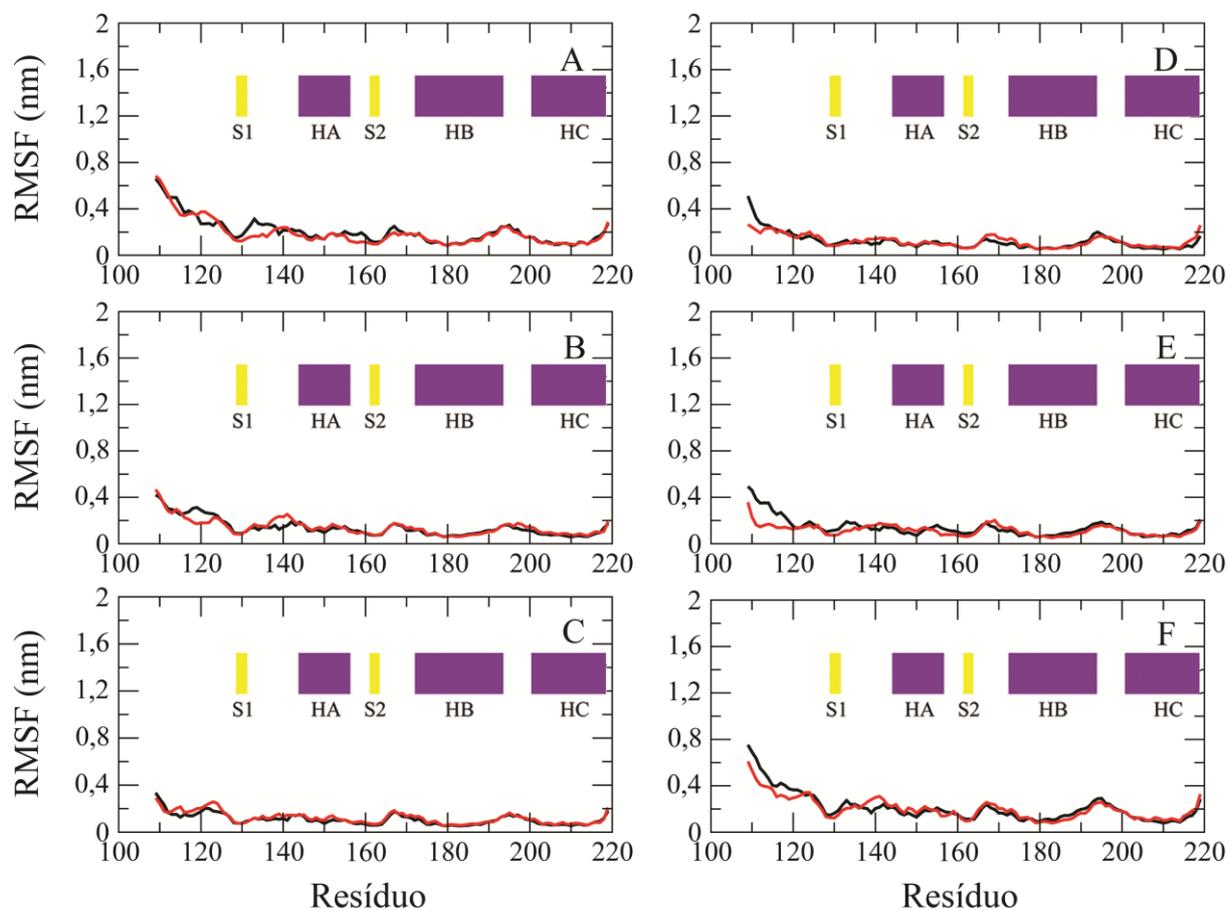
RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força AMBER99SB nos seguintes intervalos de tempo: a) 0-20 ns; b) 20-40 ns; c) 40-60 ns; d) 60-80 ns; e) 80-100 ns; f) 0-100 ns. Legenda: curvas pretas = média entre as réplicas ácidas; curvas vermelhas = média entre as réplicas neutras.

Apêndice A12: RMSF de $C\alpha$ do fragmento 109-219 para o campo de força GROMOS96 43a1

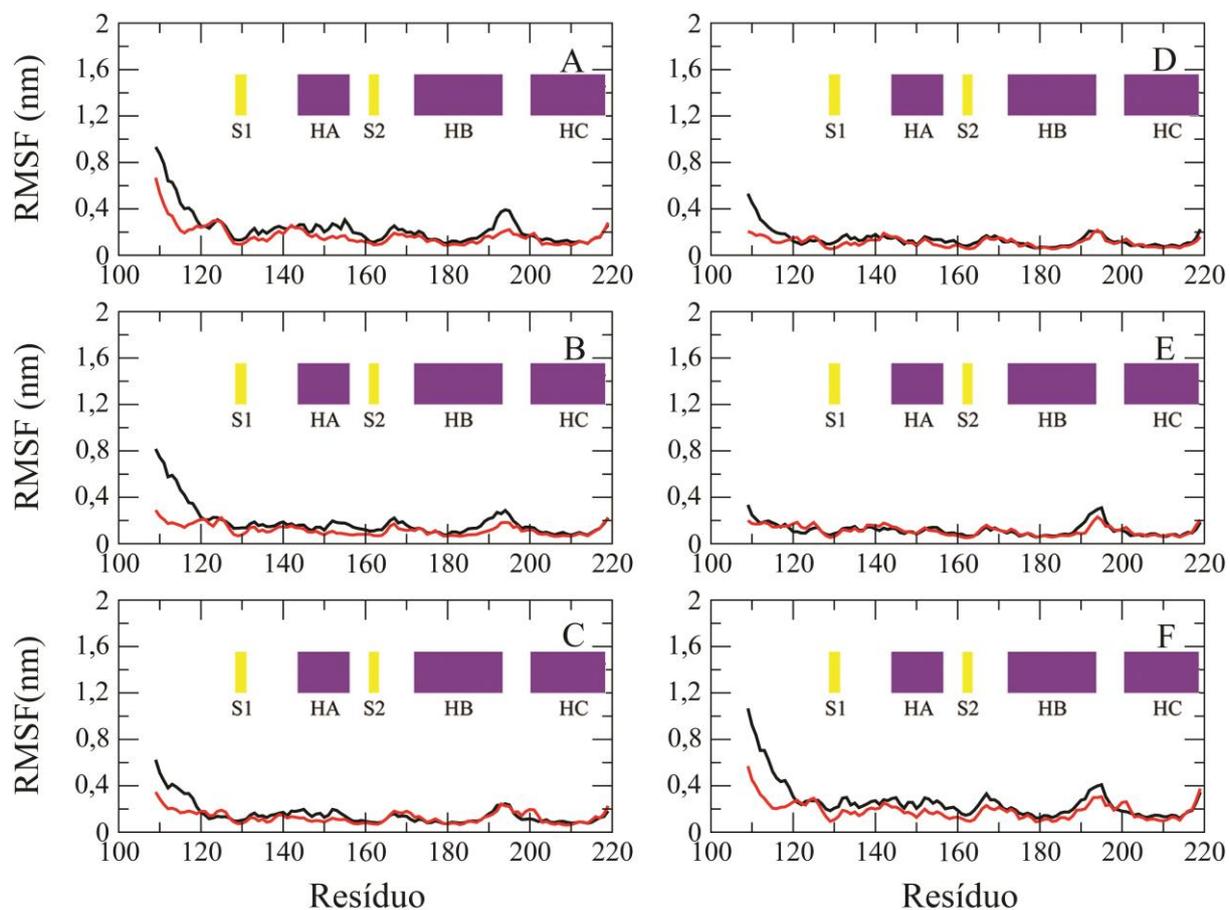


RMSF de $C\alpha$ do fragmento 109-219 para o campo de força GROMOS96 43a1 nos seguintes intervalos de tempo: a) 0-20 ns; b) 20-40 ns; c) 40-60 ns; d) 60-80 ns; e) 80-100 ns; f) 0-100 ns. Legenda: curvas pretas = média entre as réplicas ácidas; curvas vermelhas = média entre as réplicas neutras.

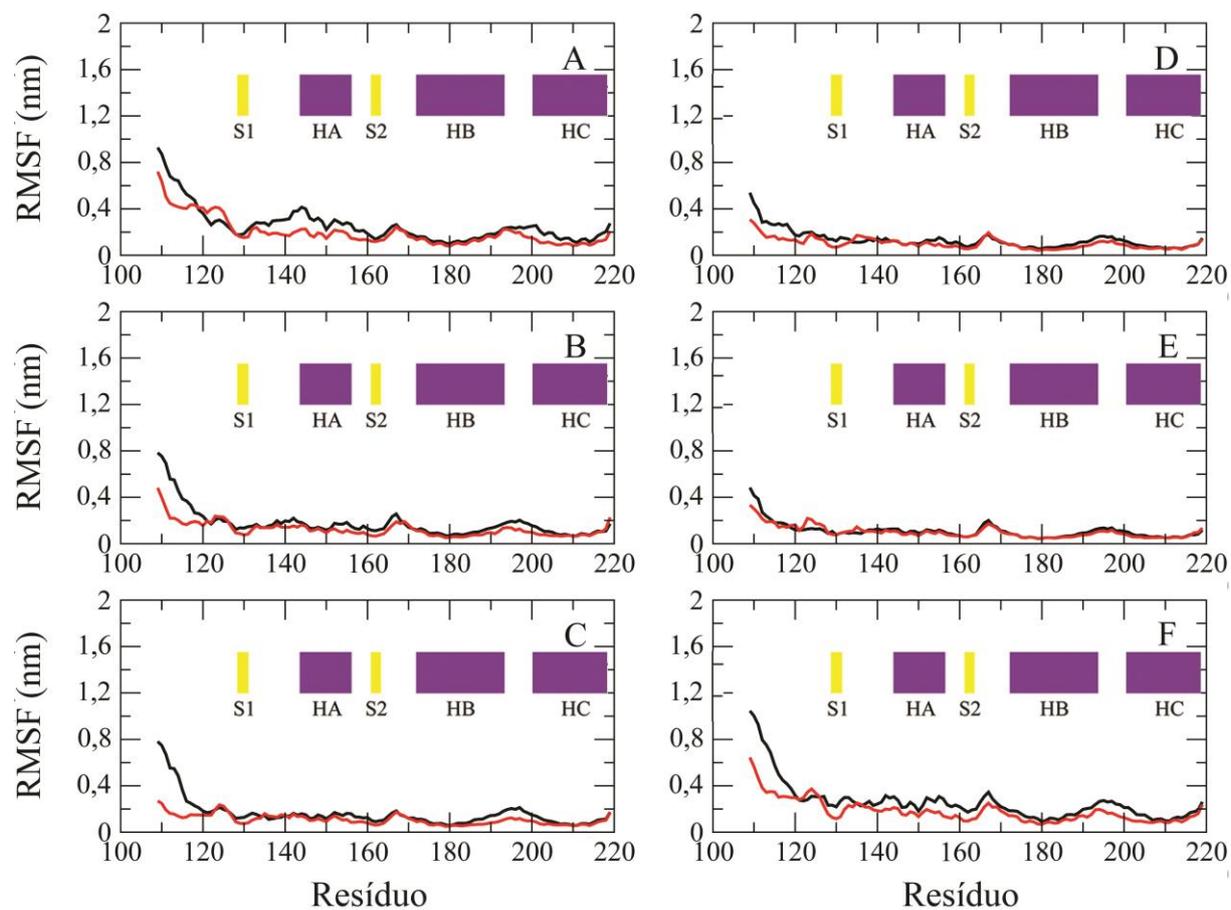
Apêndice A13: RMSF de $C\alpha$ do fragmento 109-219 para o campo de força AMBER99SB-ILDN



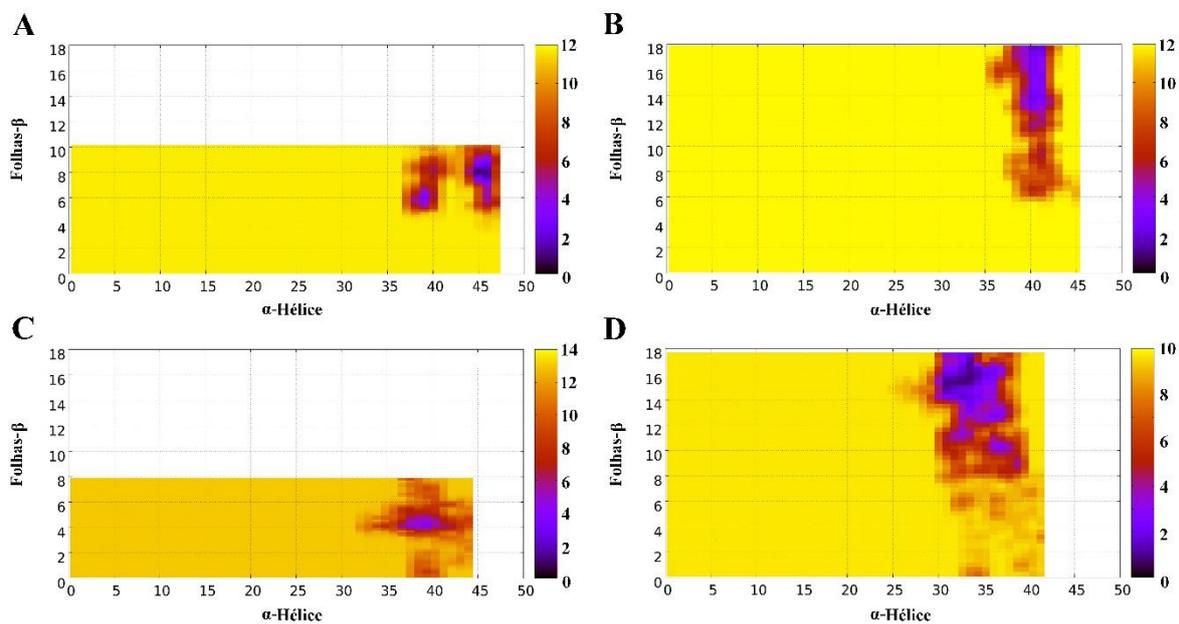
RMSF de $C\alpha$ do fragmento 109-219 para o campo de força AMBER99SB-ILDN nos seguintes intervalos de tempo: a) 0-20 ns; b) 20-40 ns; c) 40-60 ns; d) 60-80 ns; e) 80-100 ns; f) 0-100 ns. Legenda: curvas pretas = média entre as réplicas ácidas; curvas vermelhas = média entre as réplicas neutras.

Apêndice A14: RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força OPLS-**AA**

RMSF de C α do fragmento 109-219 para o campo de força OPLS-AA nos seguintes intervalos de tempo: a) 0-20 ns; b) 20-40 ns; c) 40-60 ns; d) 60-80 ns; e) 80-100 ns; f) 0-100 ns. Legenda: curvas pretas = média entre as réplicas ácidas; curvas vermelhas = média entre as réplicas neutras.

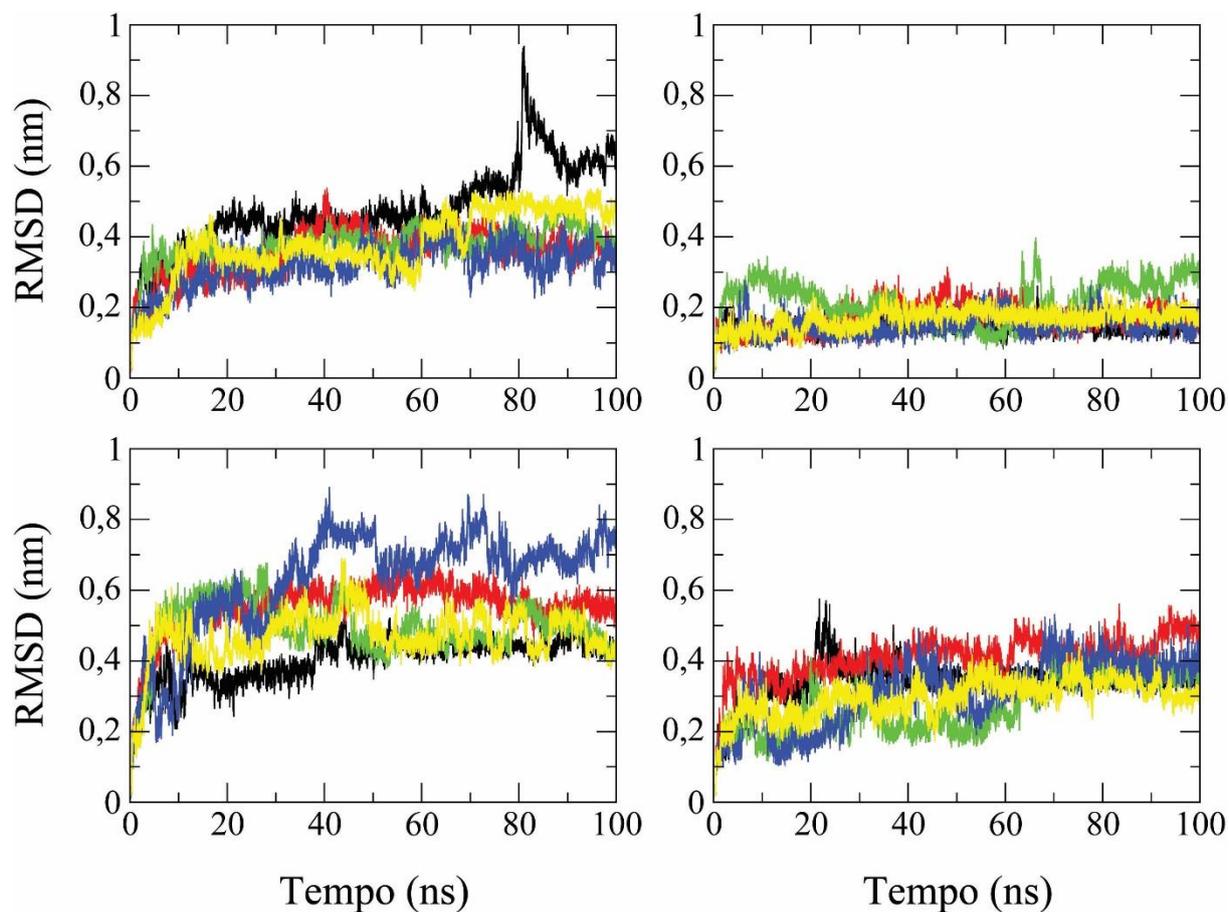
Apêndice A15: RMSF de $C\alpha$ do fragmento 109-219 para o campo de força CHARMM27

RMSF de $C\alpha$ do fragmento 109-219 para o campo de força CHARMM27 nos seguintes intervalos de tempo: a) 0-20 ns; b) 20-40 ns; c) 40-60 ns; d) 60-80 ns; e) 80-100 ns; f) 0-100 ns. Legenda: curvas pretas = média entre as réplicas ácidas; curvas vermelhas = média entre as réplicas neutras.

Apêndice A16: Projeção bidimensional da superfície de energia livre.

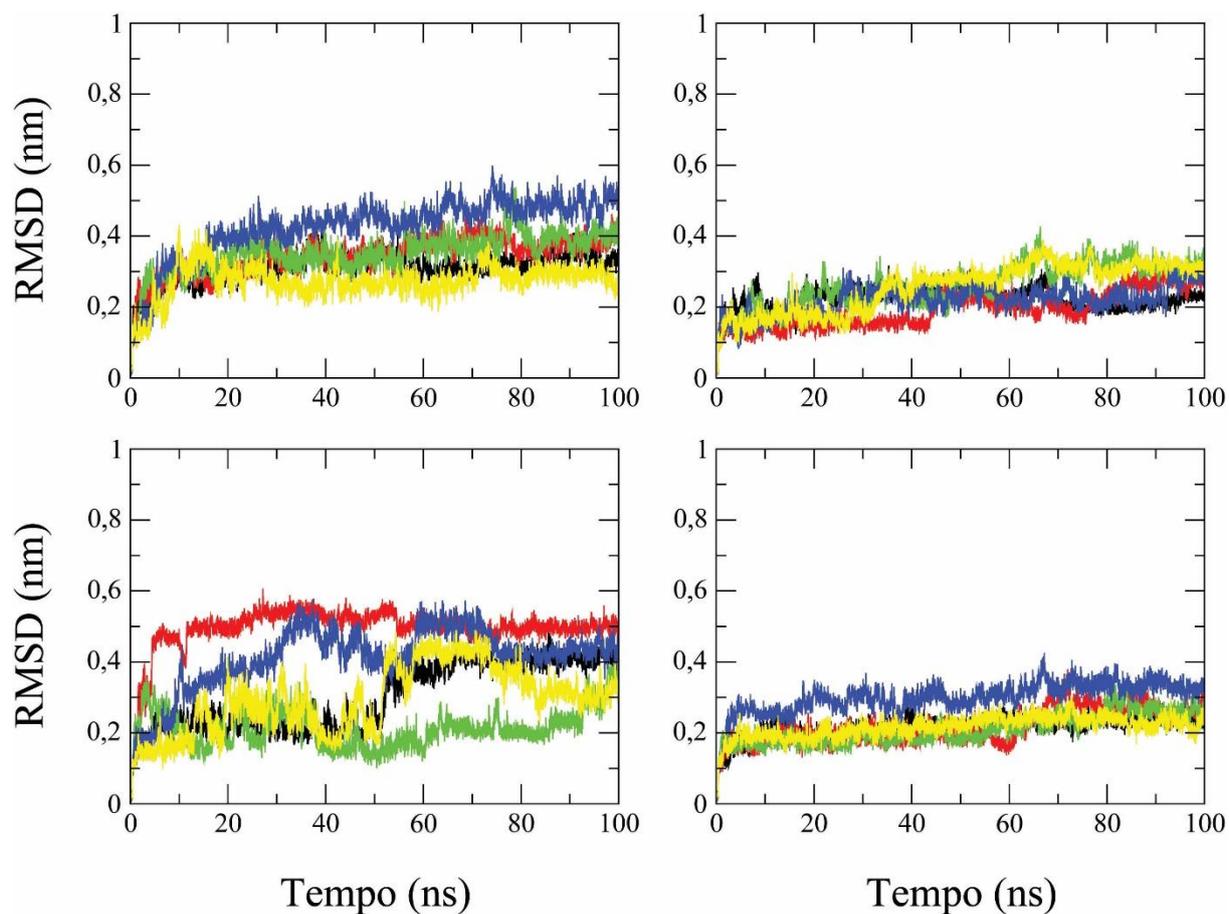
Projeção bidimensional da superfície de energia livre. A) GROMOS96 53a6, pH neutro; B) GROMOS96 53a6, pH ácido; C) AMBER99SB, pH neutro; D) AMBER99SB, pH ácido.

Apêndice A17: Gráfico de RMSD de C_{α} para o fragmento N-terminal (109-143) ao longo do tempo de simulação



RMSD de C_{α} , para o fragmento proteico N-terminal (109-143), ao longo do tempo de simulação:
A) GROMOS96 53A6, estrutura 1; B) GROMOS96 53A6, estrutura 2; C) AMBER99SB, estrutura 1;
D) AMBER99SB, estrutura 2. As cores das curvas correspondem às réplicas: preto = réplica 1;
vermelho = réplica 2; verde = réplica 3; azul = réplica 4; amarelo = réplica 5.

Apêndice A18: Gráfico de RMSD de C_α para o fragmento C-terminal (144-219) ao longo do tempo de simulação



RMSD de C_α, para o fragmento proteico C-terminal (144-219), ao longo do tempo de simulação:
A) GROMOS96 53A6, estrutura 1; **B)** GROMOS96 53A6, estrutura 2; **C)** AMBER99SB, estrutura 1;
D) AMBER99SB, estrutura 2. As cores das curvas correspondem às réplicas: preto = réplica 1;
vermelho = réplica 2; verde = réplica 3; azul = réplica 4; amarelo = réplica 5.