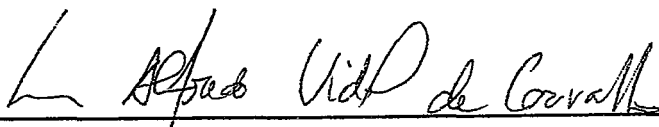


CORROBORAÇÃO COMPUTACIONAL POR "DOCKING" MOLECULAR DA HIPÓTESE
AUTO-IMUNE DA ESQUIZOFRENIA.

Guilherme de Souza Lima Brito.

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS
DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DE SISTEMAS E
COMPUTAÇÃO.

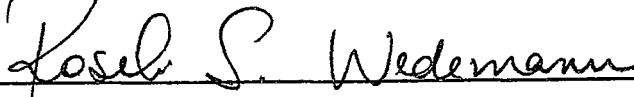
Aprovada por:



Prof. Luís Alfredo Vidal de Carvalho, D.Sc.



Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, D.Sc.



Profa. Dra. Roseli Suzi Wedemann, D.Sc.



Prof. Dr. Rubem Pinto Mondaini, D.Sc.



Prof. Dr. Felipe Maia Galvão França, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2007

BRITO, GUILHERME DE SOUZA LIMA

Corroboração computacional por “Docking”
Molecular da Hipótese Auto-imune da Esqui-
zofrenia. [Rio de Janeiro] 2007.

VI, 55 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,
Engenharia de Sistemas e Computação,2007)

Tese - Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. *Docking* Molecular in *silico*

2. Esquizofrenia, patofisiologia

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.).

CORROBORAÇÃO COMPUTACIONAL POR "DOCKING" MOLECULAR DA HIPÓTESE AUTO-IMUNE DA ESQUIZOFRENIA.

Guilherme de Souza Lima Brito.

Março/2007.

Orientador: Luís Alfredo Vidal de Carvalho.

Programa: Engenharia de Sistemas e Computação.

A esquizofrenia é um transtorno psicótico sério, com perda dos limites do Ego e amplo déficit no teste da realidade. Sua prevalência mundial está em torno de 0,5 e 2% da população mundial. Embora seus sintomas sejam bem controlados pelas substâncias antagonistas de dopamina (DA) e serotonina (5HT), sua etiologia permanece obscura. Este estudo pretende corroborar uma nova hipótese patofisiológica para a esquizofrenia, envolvendo a participação de um mediador imunológico, a interleucina-6 (IL-6), como fator responsável pelo desequilíbrio da concentração de DA e de 5HT, observado no transtorno esquizofrênico, através do acoplamento molecular da IL-6 sobre as enzimas Catecol-O-Metil-Transferase (COMT) e Monoaminoxidase A (MAO-A). O estudo foi baseado em técnicas biocomputacionais denominadas *molecular docking*, aplicadas sobre as estruturas *in silico* depositadas no Protein Data Bank, 1ALU, 1H1D e 2BXR, respectivamente homólogas à IL-6, COMT e MAO. A pesquisa sugere um novo fator para a patofisiologia da esquizofrenia envolvendo a IL-6.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.).

COMPUTATIONAL CORROBORATION BY MOLECULAR DOCKING FOR THE
AUTOIMMUNE HYPOTHESIS FOR SCHIZOPHRENIA.

Guilherme de Souza Lima Brito

March/2007

Advisor: Luis Alfredo Vidal de Carvalho.

Department: Engineering of Systems and Computation.

Schizophrenia is a serious psychotic disorder with loss of the limits of the Ego and ample damage in the test of reality. Its prevalence ranges from 0.5 to 2% of the world population. Although its symptoms are quite well controlled by the antagonistic drugs of dopamine (DA) and serotonin (5HT), the etiology of the disorder as a whole continues obscure. This study intends to corroborate a novel physiologic hypothesis involving an immunologic mediator, Interleukin-6 (IL-6), as responsible for the unbalance in the concentration of DE and 5HT, observed in the schizophrenic disorder, through the docking of the IL-6 upon the enzymes Cathecol-O-Metil-Transferase (COMT) and Monoaminoxidase A (MAO-A). The study was based on two biocomputational techniques of molecular docking performed over the related substances, taking as object the homologue *in silico* structures already deposited in the Protein Data Bank, 1ALU, 1H1D and 2BXR, respectively IL-6, COMT and MAO-A. The research suggests a novel hypothesis for the physiology of schizophrenia involving IL-6.

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 –Motivação.....	1
1.2 - Hipótese.....	1
1.3 –O Trabalho Realizado	1
1.4 – Estrutura da Dissertação	2
1.5 – Contribuições.....	2
Capítulo 2 – A Esquizofrenia	3
2.1 – Definição	3
2.2 - Sintomatologia	3
2.3 –Formas Clínicas.....	3
2.4 – As Duas Principais Hipóteses Neuroquímicas para a Esquizofrenia	4
2.5 – Terapêutica.....	6
2.6 - Uma Nova Hipótese Patofisiológica para a Esquizofrenia	7
Capítulo 3 – Metodologia da Pesquisa e Procedimentos Metodológicos	10
3.1 – <i>Docking</i> Molecular <i>in silico</i>	10
3.1.1 – <i>Docking</i> Molecular por Minimização Energética	11
3.1.2 – <i>Docking</i> Molecular por Complementariedade Topológica	13
3.2 – Recursos Biocomputacionais Utilizados	13
Capítulo 4 – Resultados e Verificações	15
4.1 – Resultados	15
4.1.1 – <i>Docking</i> Molecular por Minimização Energética entre IL-6 e COMT.....	15
4.1.1.1 – Descrição dos Procedimentos Experimentais <i>in silico</i> para o <i>Docking</i> Molecular por Minimização Energética entre IL-6 e COMT.....	15
4.1.2 – <i>Docking</i> Molecular por Minimização Energética entre IL-6 e MAO-A	16
4.1.2.1 – Descrição dos Procedimentos Experimentais <i>in silico</i> para o <i>Docking</i> Molecular por Minimização Energética entre IL-6 e MAO- A.....	16
4.1.3 – <i>Docking</i> Molecular por Complementariedade Topológica entre IL-6 e COMT	18
4.1.3.1 – Descrição dos Procedimentos Experimentais <i>in silico</i> para o <i>Docking</i> Molecular por Complementariedade Topológica entre IL-6 e COMT.....	18
4.1.4 – <i>Docking</i> Molecular por Complementariedade Topológica entre IL-6 e MAO-A	19

4.1.4.1 – Descrição dos Procedimentos Experimentais <i>in silico</i> para o <i>Docking</i> Molecular por Complementariedade Topológica entre IL-6 e MAO-A.....	19
4.2 – Verificações por Análise de Estrutura Secundária (métodos K-S e PDB)	21
4.2.1 – Verificação de Estrutura Secundária entre IL-6 e COMT (Métodos K-S e PDB)	22
4.2.2 – Verificação de Estrutura Secundária entre IL-6 e MAO-A (Métodos K-S e PDB)	22
4.2.3 - Visualização da Complexação Final entre o Ligante da IL-6, Ácido D-Tartárico, e COMT	24
4.2.4 – Visualização da Complexação Final entre o Ligante da IL-6, Ácido D-Tartárico, e MAO-A	25
4.3 – Discussão e Comparação entre os Experimentos.....	25
Capítulo 5 – Conclusões	27
5.1 – Sugestões para Trabalhos Futuros.....	27
Referências Bibliográficas	29
Anexo 1 – Relatórios de <i>Docking</i> Molecular por Minimização Energética.....	33
Anexo 2 – Relatórios de Verificação de Estrutura Secundária	42
Anexo 3 – Descrição Rudimentar das Proteínas.....	52

Capítulo 1 – Introdução:

1.1 – Motivação:

A esquizofrenia - transtorno psicótico grave, resistente a uma completa elucidação etiológica científica há aproximadamente um século [Bruce & Peebles, 1903], [Dameshek, 1930], [Kapur, 2003] – constitui-se como alvo de intensa pesquisa interdisciplinar entre as ciências da vida, as neurociências, a farmacologia, os saberes psicodinâmicos, dentre outros, e é alvo de hipóteses etiológicas ou patofisiológicas diversas, muitas vezes divergentes [Carlson & Lundquist, 1963], [Fessel, 1963], [Heath & Krupp, 1967], [Andreasen, 1996], [Andreasen, 1977a], [Andreasen, 1977b], [Knight, 1982]. O autor desta pesquisa vem refletindo sobre os progressos no controle dos sintomas da síndrome esquizofrênica bem como os esforços científicos para a tentativa da elucidação do mecanismo etiológico da síndrome há anos [Szasz, 1987], tanto na lida hospitalar e ambulatorial com os pacientes esquizofrênicos, bem como através de trabalhos publicados por vários pesquisadores em referência aos possíveis mecanismos etiológicos da esquizofrenia [Koh & Goldman-Racik, 2003] [Kabani & Goldman-Racik, 2002] [Ayrosa & Carvalho, 2001], [Rozenhal *et al.*, 2000], [Goldman-Racik *et al.*, 1998], [Goldman-Racik *et al.*, 1977]. Após esse período, o autor desta pesquisa se deparou com determinados estudos *in vivo* e *in vitro* suficientemente convincentes, conduzidos durante as últimas cinco décadas, [Fessel, 1963], [Heath & Krupp, 1967], [Knight, 1982], [Pandey *et al.*, 1981], [Qiu *et al.*, 1998], [Müller *et al.*, 2000], o que o motivou na condução desta pesquisa utilizando, porém, estudos e recursos *in silico*.

1.2 – Hipótese:

O autor desta pesquisa trabalhou sobre uma nova hipótese patofisiológica para a esquizofrenia, baseado em estudos imunohistoquímicos e epidemiológicos fortemente convincentes, conduzidos por Müller e colaboradores [Müller *et al.*, 2004a, 2004b, 2002, 1999]. Tais estudos demonstram que a esquizofrenia está relacionada com o aumento na concentração no organismo do indivíduo esquizofrênico de um mediador imunológico, a citoquina Interleucina-6, IL-6.

1.3 - O Trabalho Realizado:

O trabalho foi realizado baseando-se inicialmente nas recentes pesquisas e achados bibliográficos publicados e acima citados, bem como na bibliografia contemporânea sobre neurociência [Kandell *et al.*, 2000], diagnósticos e estatísticas de transtornos mentais [American Psychiatry Association, 2000], bases biológicas em psiquiatria [Kapczinski *et al.*, 2000] e psicofarmacologia [Stahl, 2000]. Posteriormente, de acordo com os dados publicados, foram realizadas várias pesquisas de estruturas computacionais *in silico*, homólogas computacionais às substâncias naturais *in-vivo* e

in vitro relevantes para a pesquisa, depositadas em banco de dados de bioinformática mundialmente padronizado e aceito, o Protein Data Bank [Berman *et al.* 2000]. Tais estruturas *in silico* foram submetidas à experimentos de acoplamento molecular também *in silico* – o *docking molecular* – através de softwares adequados [Thompson, 2004; Wolber *et al.*, 2005; CLCbio A/S, 2006] e os resultados obtidos foram, por sua vez, validados por softwares industrialmente acreditados e adequados [Accelrys Software Inc., 2006; Duhhovni *et al.*, 2002]. Os resultados obtidos através dos experimentos de *docking molecular in silico* concordaram com os achados *in-vitro* e *in-vivo* previamente publicados [Müller *et al.*, 2004a, 2004b, 2002, 1999].

1.4– Estrutura da Dissertação:

Esta tese constitui-se de mais quatro capítulos. O capítulo dois introduzirá a caracterização da esquizofrenia enquanto transtorno psicótico bem como a abordagem da nova hipótese patofisiológica para esse transtorno, objeto desta pesquisa. O capítulo três abordará as duas técnicas biocomputacionais utilizadas para o experimento, denominadas *docking molecular*. A técnica de *docking molecular* foi utilizada para confrontar os achados *in-vitro* e *in-vivo* com os resultados *in silico* aqui obtidos. O capítulo quatro apresentará os resultados obtidos ao longo dos experimentos *in silico* e suas respectivas validações. Finalmente o capítulo cinco tratará das sugestões para trabalhos de pesquisa futuros sobre o objeto desta tese.

1.5– Contribuições:

O autor espera que os resultados aqui apresentados - convergentes com os achados clínicos e epidemiológicos já citados - possam contribuir para a elucidação da patofisiologia da esquizofrenia e de outros transtornos psiquiátricos e/ou neurológicos muitas vezes afins ou mesmo diversos à síndrome esquizofrênica, bem como proporcionar ao leitor e ao pesquisador uma introdução aos métodos biocomputacionais nas áreas de biologia molecular, o estudo das proteínas de um organismo, biologia celular, farmacologia, *drug discovery* e *rational drug design*, as quais experimentam grande desenvolvimento científico e tecnológico mundo afora.

Capítulo 2 – A Esquizofrenia:

2.1 – Definição:

A esquizofrenia é um transtorno psicótico grave com perda dos limites do Ego (incapacidade na distinção pelo sujeito esquizofrênico entre si e o mundo) acompanhada de um amplo prejuízo no teste da realidade (percepções, comportamento e pensamento incompatíveis com os estímulos do meio ambiente), exibindo uma taxa de prevalência mundial entre 0,5 a 2% [American Psychiatry Association, 2000].

2.2 – Sintomatologia:

A esquizofrenia mostra dois grandes conjuntos de sintomas conhecidos como *sintomas positivos e sintomas negativos*.

- Sintomas positivos: delírios, alucinações, distorções da linguagem e da comunicação, discurso e comportamento desorganizados, catatonia e agitação.
- Sintomas negativos: Embotamento afetivo, retraimento emocional, passividade, dificuldade de pensamento abstrato, pensamento estereotipado, alogia, avolição, anedonia e déficit de atenção [Kapczinski *et al.*, 2000; American Psychiatry Association, 2000].

2.3 – Formas Clínicas:

A esquizofrenia se apresenta segundo as seguintes formas clínicas:

- esquizofrenia paranóide: a esquizofrenia paranóide caracteriza-se essencialmente pela presença de idéias delirantes relativamente estáveis, freqüentemente de perseguição, em geral acompanhadas de alucinações - particularmente auditivas - e de perturbações das percepções. As perturbações do afeto, da vontade, da linguagem e os sintomas catatônicos, estão ausentes, ou são relativamente discretos.
- esquizofrenia hebefrênica: forma de esquizofrenia caracterizada pela presença proeminente de uma perturbação dos afetos; as idéias delirantes e as alucinações são fugazes e fragmentárias, o comportamento é irresponsável e imprevisível; existem freqüentemente maneirismos. O afeto é superficial e inapropriado. O pensamento é desorganizado e o discurso incoerente. Há uma tendência ao isolamento social. Geralmente o prognóstico é desfavorável devido ao rápido desenvolvimento de sintomas *negativos*, particularmente um embotamento do afeto e perda da volição. É normalmente diagnosticada em adolescentes e em adultos jovens.
- esquizofrenia catatônica: a esquizofrenia catatônica é dominada por distúrbios psicomotores proeminentes que podem alternar entre extremos tais como

hipercinesia e estupor, ou entre a obediência automática e o negativismo. Atitudes e posturas a que os pacientes foram compelidos a tomar podem ser mantidas por longos períodos. Um padrão marcante dessa forma clínica pode ser constituído por episódios de excitação violenta. O fenômeno catatônico pode estar combinado com um estado oníróide com alucinações cênicas vívidas.

2.4 –As Duas Principais Hipóteses Neuroquímicas para a Esquizofrenia:

Apresentaremos aqui as duas principais hipóteses neuroquímicas para a esquizofrenia na medida em que a atual terapêutica de eleição para o *alívio dos sintomas* do transtorno esquizofrênico está nelas baseada e é um fato clínico e cientificamente bem experimentado [Kapczinski *et al.*, 2000]. As hipóteses neuroquímicas estudam a concentração ou possíveis erros na estrutura molecular, dentre outros achados, de substâncias encontradas no Sistema Nervoso, denominadas neurotransmissores e outras substâncias afins.

A hipótese dopaminérgica: a *dopamina* (DA) é a principal substância para o estabelecimento dos sintomas esquizofrênicos no nível neurofisiológico. Desde a introdução acidental da clorpromazina na década de 1950 [Wender & Klein, 1987] por Delay e Deniker¹, boa parte dos sintomas psicóticos presentes na síndrome esquizofrênica passaram a ser controláveis. A partir da introdução da clorpromazina, observou-se o alívio dos sintomas positivos, que representavam as manifestações clínico-fenomenológicas mais dramáticas e visíveis da síndrome esquizofrênica. Desde então uma ampla gama de psicofármacos foi desenvolvida, os então denominados *neurolépticos* ou *tranquilizantes maiores* cujo uso clínico foi consagrado, como o haloperidol, a acetofenazina, a carfenazina, o clorpromaxeno, a clorazina, a flufenazina, a loxapina, a mezoridazina, a perfenazina, a trifluoperazina, dentre outros. Durante a década de 1970 foi reconhecido que tais substâncias eram potentes bloqueadores dos receptores neuronais² dopaminérgicos do tipo 2 - D2 - nas vias nigroestriais³, mesolímbica⁴, mesocortical⁵ e tuberoinfundibular⁶, levantando-se daí a *hipótese etiológica dopaminérgica* para a esquizofrenia [Carlson & Lundquist, 1963]. Outra evidência a favor da hipótese dopaminérgica é a psicotomimética para os sintomas

¹ A clorpromazina foi inicialmente sintetizada como anti-histamínico para uso como coadjuvante de suporte em cirurgias, onde foi observado que os pacientes psicóticos operados demonstravam melhora na sintomatologia associada à psicose.

² Estruturas biológicas presentes nos neurônios, capazes de receberem substâncias neurotransmissoras seletivamente.

³ Esta via projeta-se desde os corpos celulares da substância negra do mesencéfalo até os gânglios da base ou *striatum*.

⁴ Esta via projeta-se desde os corpos celulares da área tegmental ventral do mesencéfalo até as áreas límbicas cerebrais, como o *nucleus accumbens*.

⁵ Esta via projeta-se desde as vizinhanças da origem da via mesolímbica até o córtex límbico, com importantes projeções no córtex pré-frontal dorsolateral.

⁶ Esta via projeta-se desde o hipotálamo até a região anterior da glândula pituitária.

positivos, apresentada por drogas de abuso como as anfetaminas (que aumentam a taxa de liberação de dopamina) e a cocaína (que dificulta a recaptação da dopamina).

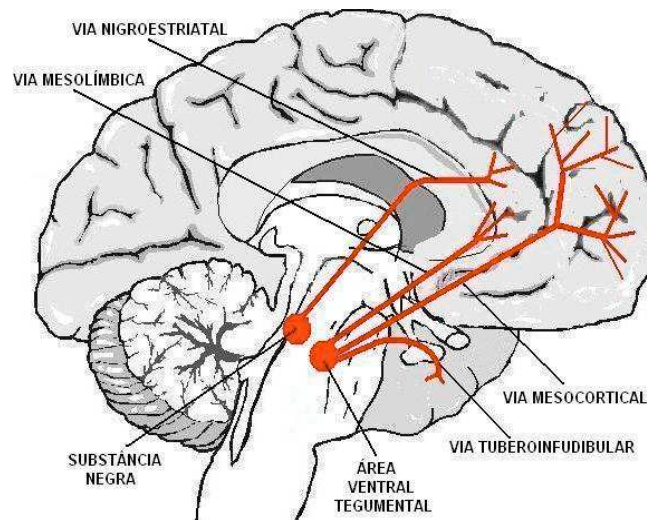


Figura 2.1- Esquemática das vias dopaminérgicas no cérebro humano.

A hipótese serotoninérgica: a *serotonina* (5-HT) é uma substância coadjuvante no estabelecimento dos sintomas esquizofrênicos no nível neurofisiológico. Achados clínicos não evidenciam uma *hipótese serotoninérgica isolada* (muitas vezes associada ao agonismo entre a serotonina, a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e outros alucinógenos indóis, na produção de alucinações e outros efeitos psicotomiméticos observados após a administração da dietilamida do ácido lisérgico, LSD), e sim uma sinergia entre o bloqueio dos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos em receptores neuronais, no alívio de um largo espectro dos sintomas da síndrome esquizofrênica. Com a recente introdução das *substâncias antipsicóticas atípicas*, ASD's (antagonistas serotoninérgico-dopaminérgicos), - a risperidona, a clozapina, a olanzapina, a loxapina, a zotepina, e a quietiapina - foi evidenciada a importância da *ação bloqueadora simultânea* dos receptores da serotonina e dos receptores da dopamina no alívio de um largo espectro sintomatológico (sintomas positivos e negativos) na síndrome esquizofrênica.

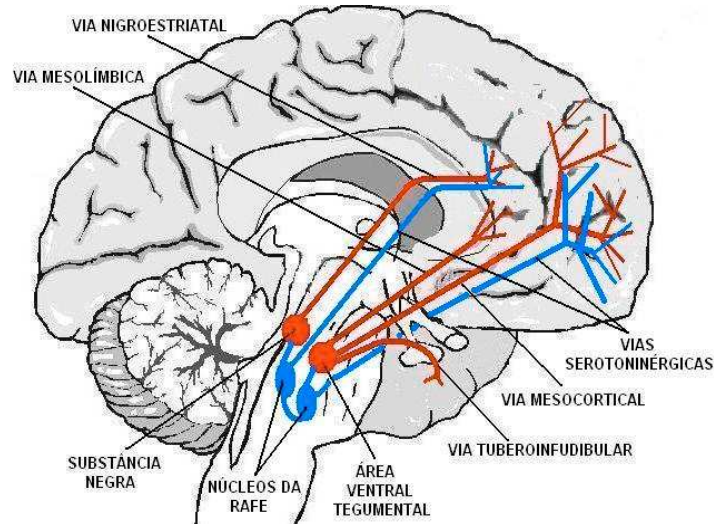


Figura 2.2- Esquemática das vias dopaminérgicas e serotoninérgicas no cérebro humano.

2.5 – Terapêutica:

A terapêutica contemporânea para o alívio da sintomatologia da esquizofrenia pode ser representada pelo perfil de bloqueio dos receptores de dopamina e serotonina promovidos pelos ASD's nos respectivos tratos dopaminérgicos e serotoninérgicos, em vez do bloqueio exclusivo de receptores dopaminérgicos demonstrados pelos neurolépticos convencionais. A experiência clínica comprova a superioridade dos antagonistas serotoninérgico-dopaminérgicos – ASD's – frente aos neurolépticos convencionais, cujos perfis de bloqueio específico de receptores neuronais podem ser observados na figura a seguir:

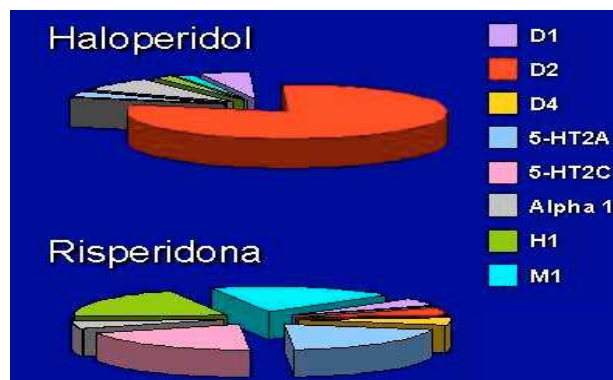


Figura 2.3- Exemplo do perfil de bloqueio de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos por uma substância antipsicótica convencional (Haloperidol) e um ASD (Risperidona).

Através do sucesso do uso de bloqueadores de receptores serotoninérgico-dopaminérgicos – ASD's - e da sua farmacodinâmica no nível biológico molecular,

aliviando os sintomas esquizofrênicos clinicamente observados, a lógica nos conduz a reconhecer que uma alta concentração e/ou um tempo maior de biodisponibilidade de dopamina e serotonina promove o surgimento da sintomatologia esquizofrênica. O autor desta pesquisa partiu da hipótese mais simples no que se refere ao desequilíbrio na concentração e/ou na biodisponibilidade das duas substâncias: tanto a dopamina quanto a serotonina podem não estar sendo devidamente metabolizadas nos quadros esquizofrênicos, o que promove uma concentração inadequada e um maior tempo de biodisponibilidade – *wash-out* - das duas substâncias. O metabolismo, logo a degradação, das duas substâncias pode ser conseguido através da ação de duas enzimas. A dopamina é metabolizada pela ação da enzima Catecol-O-Metil-Transferase, da classe das transferases, – COMT - ; a serotonina é metabolizada pela ação da enzima Monoaminoxidase, da classe das oxiredutases - MAO. Se tais enzimas sofrem quaisquer tipo de alteração em sua estrutura molecular, elas se tornam incapazes quimicamente de cumprirem seu papel na regulação das suas substâncias-alvo. *A inibição da enzima COMT promove o alívio dos sintomas do Mal de Parkinson, que é caracterizado por um déficit na concentração ou wash-out da dopamina; a inibição da MAO promove o alívio dos transtornos depressivos, caracterizados pelo déficit na concentração ou wash-out de serotonina.*

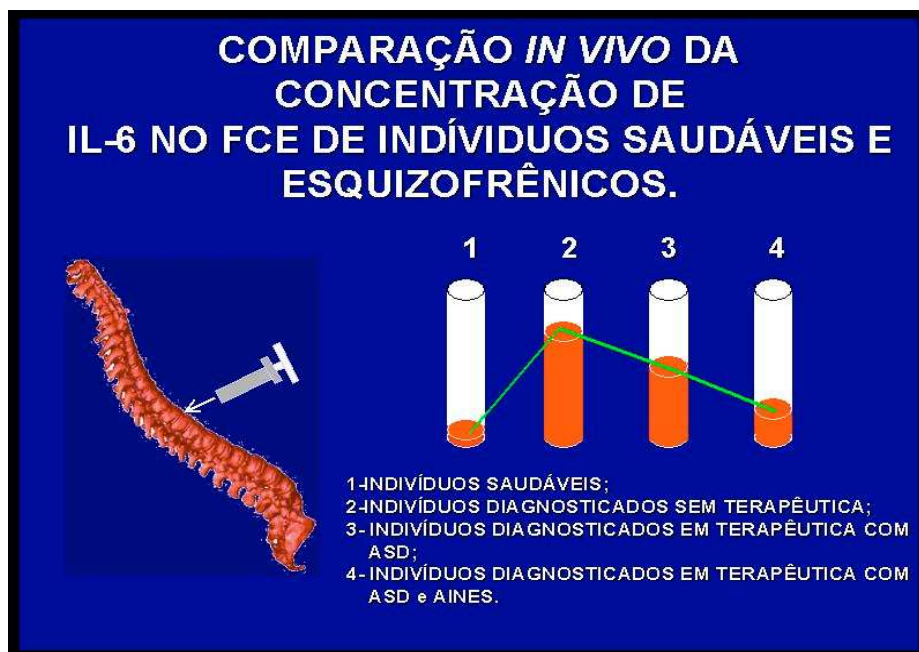
2.6 – Uma Nova Hipótese Patofisiológica para a Esquizofrenia:

Através de achados imunohistoquímicos e da posterior condução de testes clínicos - epidemiologicamente controlados e replicados em pacientes esquizofrênicos - Müller e colaboradores [Müller *et al.*, 2004a, 2004b, 2002, 1999] observaram que tanto o plasma sanguíneo quanto o fluído cérebro-espinhal – FCE - de pacientes esquizofrênicos apresentavam altas concentrações da citocina Interleucina-6 – IL-6 – em comparação com indivíduos saudáveis.

A IL-6 é uma proteína pleiotrópica, ou seja, possui várias funções como mediadora de estados inflamatórios e faz parte do sistema imunológico. Além do mais, testes clínicos realizados com pacientes esquizofrênicos medicados coadjuvadamente com o ASD risperidona e uma droga anti-inflamatória não esteróide – AINE –, mostraram uma melhora significativa nos sintomas positivos e negativos em relação aos pacientes medicados com risperidona e placebo. O estudo obedeceu rigorosamente às técnicas epidemiológicas e foi replicado mostrando resultados semelhantes. A dedução de Müller e colaboradores é que a citocina IL-6, está francamente envolvida no patomecanismo da esquizofrenia. Nas palavras de Müller e colaboradores: “...*this study was planned according to psychoneuroimmunological hypothesis that a lipophilic anti-inflammatory substance may lead to therapeutic benefits in schizophrenia. The results is one more indication that immune dysfunction in*

schizophrenia may be related to the to the pathomechanism (of the disorder) and is not just a epiphenomenon..." [Müller *et al.*, 2004a, 2004b, 2002, 1999]. A figura abaixo exemplifica os achados dos autores citados:

Figura 2.4 – Diferenças de Concentração de Interleucina-6 – IL-6 – no FCE de Vários Indivíduos sob Teste.



Pelo acima exposto, o autor desta pesquisa submeteu os homólogos *in silico* da IL-6, da COMT e da MAO-A ao processo de *docking* molecular: acoplamento molecular entre IL-6 e COMT e entre IL-6 e MAO *in silico*. Objetivamente, foram acopladas *in silico* a citocina Interleucina-6 - IL-6 - com a enzima Catecol-O-Metil-Transferase – COMT – e a mesma citocina, Interleucina-6, com a enzima Monoaminoxidase A – MAO- A . É necessário chamar à atenção que, no nível biomolecular, quaisquer alterações físico-químicas em uma dada substância – por menores que sejam - podem promover efeitos macroscópicos importantes em processos que envolvam tal substância. Assim, se a citocina IL-6 se acoplar com as enzimas COMT e MAO-A essas enzimas perdem a capacidade de metabolizar respectivamente a dopamina (DA) e a serotonina (5-HT). Tal fato tem como consequência um aumento da biodisponibilidade tanto da dopamina quanto da serotonina. O aumento da biodisponibilidade da dopamina e da serotonina provoca os sintomas esquizofrênicos.

A ação das drogas antagonistas serotoninérgicas-dopaminérgicas (ASD's) – que aliviam os sintomas esquizofrênicos - é BLOQUEAR os receptores neuronais de

dopamina e serotonina, para compensar uma alta biodisponibilidade de dopamina e serotonina presente no indivíduo esquizofrênico.

Capítulo 3 – Metodologia da Pesquisa e Procedimentos Metodológicos:

3.1 – Docking Molecular *in silico*:

A pesquisa contemporânea em biologia molecular, genômica, proteômica e em farmacologia está fortemente apoiada nos recursos biocomputacionais hoje disponíveis. Várias etapas da pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos foram abolidos pela indústria farmacêutica devido à capacidade de substituição de experimentos *in vitro* ou mesmo *in vivo* por experimentos *in silico*. Esta atividade é conhecida como *Computational Drug Discovery* ou *Rational Drug Design* e é possível graças, não somente à sofisticação das ferramentas biocomputacionais, como também ao crescimento exponencial de modelos de biomateriais e outras substâncias biologicamente importantes nos Bancos de Dados especializados, como o Protein Data Bank. Tais modelos são primariamente obtidos através de técnicas de difração por exposição a raios X, por Ressonância Magnética e outras técnicas biofísicas e biotecnológicas consagradas. São então validados por consensos internacionais e disponibilizados aos pesquisadores em forma de modelos computacionais. Isto possibilita o refinamento, o projeto e a descoberta e a re-engenharia de drogas mais seguras, eficientes e eficazes, sem a necessidade de várias etapas laboratoriais ou mesmo de condutas empíricas de longo termo.

O *docking* molecular é uma técnica utilizada para prever se uma molécula se ligará a outra, geralmente uma proteína à outra ou uma proteína à uma substância ligante. O docking proteína-ligante é feito modelando-se a interação entre a proteína e o ligante através de diversos critérios: se a geometria do par for complementar e envolver interações bioquímicas favoráveis *in silico*, a substância ligante ligará potencialmente a proteína *in vitro* ou *in vivo*.

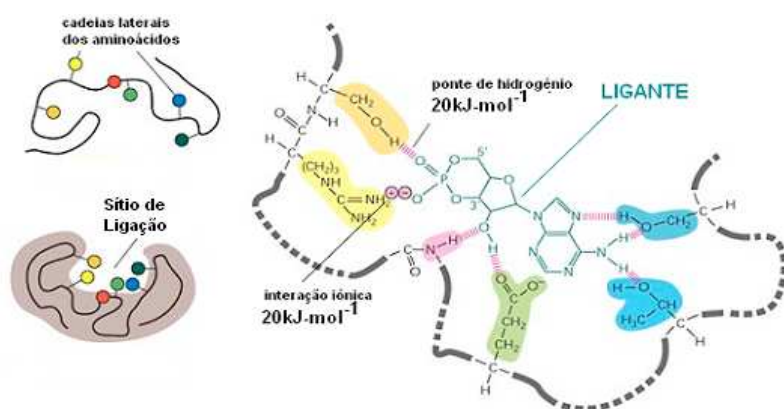


Figura 3.1- Esquema geral do mecanismo de *docking* molecular e algumas energias de ligação importantes.

A maioria dos processos bioquímicos e ações de drogas atuam na modificação energética, conformacional ou estrutural de proteínas ou outras substâncias presentes no organismo. Este trabalho está baseado em métodos e achados biocomputacionais que vieram a concordar com as observações macroscópicas de Müller e colaboradores, no que diz respeito da contribuição da citocina IL-6 como *fator* na patofisiologia da esquizofrenia.

As estruturas submetidas ao *docking* molecular foram testadas sob as condições menos prováveis, ou seja, *mais rigorosas*, para a operação de *docking* molecular:

- ligante flexível;
- presença de íons metálicos;
- presença de água;
- pesquisa de cavidades moleculares acessíveis a solventes e produtoras de forças de van der Waals.
- No método de minimização energética, foi considerado o limite energético máximo admissível $< -1\text{Kcal/mol}$ (forças de van der Waals);
- No método de sobreposição topológica, foi considerado o limite máximo admissível < 2 Angstroms de desvio RMS.

3.1.1 – Docking Molecular por Minimização Energética:

O *docking* molecular por minimização energética (estrutura final mais provável, exergonicamente esperada, conforme estabelece o ciclo de Gibbs) é a técnica na qual se busca a máxima minimização energética na complexação de duas estruturas moleculares [Thompson, 2004]. Tal técnica está baseada em algoritmo cujo critério é conhecido como *Xscore* [Wang *et al.*, 2002]. Através desse critério busca-se um escore de minimização energética obtido dentro do intervalo $\Delta G(bind)$ determinado por:

$$\Delta G(bind) = \Delta G(vdw) + \Delta G(hb) + \Delta G(def) + \Delta G(hyd) + \Delta G(0).$$

onde:

$\Delta G(bind)$: Variação no decaimento na energia livre total da proteína;

$\Delta G(vdw)$: Variação energética resultantes de interações de Van der Waals entre a proteína e o ligante;

$\Delta G(hb)$: Variação energética resultantes da presença de pontes de hidrogênio entre a proteína e o ligante;

$\Delta G(def)$: Variação energética resultante do efeito de deformações entre proteína e ligante;

$\Delta G(hyd)$: Variação energética resultante da hidrofobicidade entre proteína e ligante;

$\Delta G(0)$: constante de regressão relacionada a entropia proporcionada por torções e translações da proteína.

Onde os parâmetros desse critério são:

$$VDW =$$

$$\sum_i^{ligand} \sum_j^{protein} \left[\left(\frac{d_{ij,0}}{r_{ij}} \right)^8 - 2 \left(\frac{d_{ij,0}}{r_{ij}} \right)^4 \right] + \sum_i^{ligand} \sum_{j>i}^{ligand} \left[\left(\frac{d_{ij,0}}{r_{ij}} \right)^8 - 2 \left(\frac{d_{ij,0}}{r_{ij}} \right)^4 \right]$$

. $d_{ij,0}$ é a soma dos raios de van der Walls dos átomos i, j .

$$HB =$$

$$\sum_i^{ligand} \sum_j^{protein} HB_{ij}$$

$$HB_{ij} = f(r_{ij}) f(\theta_{1,ij}) f(\theta_{2,ij})$$

r_{ij} distância entre átomos doadores e aceptores;

$\theta_{1,ij}$ ângulo entre os átomos doador-raiz, doador eceptor;⁷

$\theta_{2,ij}$ ângulo entre os átomos doador,ceptor e doador-raiz.

Cada termo varia de 1 até 0, dependendo de quanto próximo se encontra do valor ideal.

O número máximo de pontes de hidrogênio por átomos doadores/aceptores é implícito:

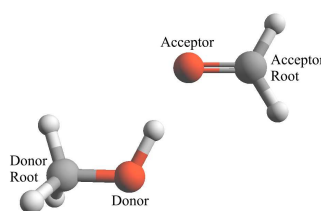


Fig. 3.2: Átomos doadores e aceptores em vermelho e seus respectivos ângulos em relação aos átomos-raiz

⁷ Átomo-raiz é aquele considerado mais centralizado na molécula e possui as ligações mais equilibradas.

DEF =

$$\sum_i^{ligand} RT_i$$

$RT_i = 0$ átomo i não envolvido em qualquer deformação;
= 0.5 átomo i envolvido em 1 deformação;
= 1.0 átomo i envolvido em 2 deformações;
= 0.5 átomo i envolvido em mais que 2 deformações.

HID =

$$\sum_i^{ligand} \sum_j^{protein} f(d_{ij})$$

Soma das distâncias entre pares de átomos constituintes da região hidrofóbica entre ligante e proteína.

$$f(d_{ij}) = \begin{cases} 1.0 & d < d_{ij,0} + 0.5 \text{ \AA} \\ 2/3 (d_0 + 2 - d) & d_{ij,0} + 0.5 \text{ \AA} < d \leq d_{ij,0} + 2.0 \text{ \AA} \\ 0 & d > d_{ij,0} + 2.0 \text{ \AA} \end{cases}$$

3.1.2 – Docking Molecular por Complementariedade Topológica:

É a técnica de *docking* molecular por sobreposição topológica, respeitadas as características físico-químicas de cada molécula [Wolber & Langer, 2005]. Os autores não forneceram o algoritmo que opera o critério esse tipo de *docking* molecular.

3.2 – Recursos Biocomputacionais Utilizados:

As estruturas utilizadas, devidamente depositadas no Protein Data Bank, foram:

- 1ALU, homólogo *in silico* da IL-6, ligante Ácido D-Tartárico (TAR) [Sommers *et al.*, 1998];
- 1H1D, homólogo *in silico* da COMT, sítio ativo S-adenosilmetionina (SAM) [Bonifácio *et al.*, 2003] e
- 2BXR, homólogo *in silico* da MAO, sítio ativo N-[3-(2,4-Diclorofenoxi)Propil]-N-Metil-N-Prop-2-Inilamina (MGL) [De Colibus *et al.*, 2006].

Tais estruturas foram verificadas antes dos procedimentos de *docking* molecular pelos seguintes softwares:

- HyperChem 7.02 Pro [Hypercube, Inc., 2003] e
- CLCbio Protein Workbench 2.0.2 [CLCbio A/S, 2006].

Os procedimentos de *docking* molecular foram realizados pelos seguintes softwares:

- Plannaria Software ArgusLab 4.0.1 [Thompson, 2004] e
- Inte:ligand LigandScout 1.02 [Wolber & Langer, 2005].

A validação por escores dos procedimentos de *docking* molecular entre as estruturas foram testadas pelos softwares:

- Accelrys Discovery Studio 1.5 nos testes “K-S” e “PDB” [Accelrys Software Inc.,2006] e
- PatchDock WebServer [Duhovny *et al.*, 2002].

Principais softwares de visualização científica utilizados:

- Accelrys Discovery Studio Visualizer 1.6 [Accelrys Software Inc.,2006] e
- CLCbio Protein Workbench 2.0.2 [CLCbio A/S, 2006].

A plataforma de hardware utilizada foi um PC equipado com processador Intel Pentium II, velocidade 300MHz, 200MB de RAM, equipado com sistema operacional Microsoft Windows 2000 Professional SP4.

Capítulo 4 – Resultados e Verificações:

4.1 – Resultados:

Os resultados dos experimentos de *docking* molecular obtidos foram os seguintes:

4.1.1 – Docking Molecular por Minimização Energética entre IL-6 e COMT:

4.1.1.1 – Descrição dos Procedimentos Experimentais *in silico* para o Docking Molecular por Minimização Energética entre IL-6 e COMT :

As estruturas homólogas à Interleucina-6 – IL-6 – e à Catecol-O-Metil-Transferase – COMT - *in silico*, devidamente depositadas no Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>), lá denominadas 1ALU e 1H1D respectivamente, foram descarregadas localmente daquele Banco de Dados. Essas estruturas foram obtidas através de difração por Raios X a uma resolução de 1.9 e 2.0 Angstroms respectivamente. Tais estruturas apresentam uma substância ligante e uma substância localizada no seus respectivos sítios ativos – *AS QUAIS SERÃO RESPONSÁVEIS PELO ACOPLAMENTO ENTRE O HOMÓLOGO DA IL-6 E DA CATECOL-O-METIL-TRANSFERASE – COMT - denominadas Ácido D-Tartárico (TAR), ligante da estrutura 1ALU e S-adenosilmetionina (SAM), localizada no sítio ativo da estrutura 1H1D.*

Após a descarga das respectivas estruturas, estas foram submetidas individualmente à minimização energética, à saber, a melhor conformação físico-química possível, o que significa a melhor probabilidade de homologia entre a estrutura *in silico* e a molécula *in vitro* ou *in vivo*. Em outras palavras, tal minimização energética individual elege a estrutura físico-quimicamente mais estável - denominada *best pose* - e diminui as expectativas de *docking* molecular, assegurando que o resultado do *docking* molecular se torne experimentalmente menos provável. Tal condição de menor probabilidade é a condição que assegura um *alto grau no rigor* do experimento.

Após a eleição das estruturas mais estáveis – *best pose* – relativas à 1ALU e 1H1D entre as 150 poses obtidas, tais estruturas foram submetidas ao *docking* molecular por minimização energética propriamente dito.

O resultado do *docking* molecular entre o ligante Ácido D-Tartárico da estrutura 1ALU e a substância S-adenosilmetionina, localizada no sítio ativo da estrutura 1H1D, resultou em uma minimização energética de **-7.58Kcal/mol** quando as duas estruturas foram acopladas, conforme figura 4.1 (o Ácido D-Tartárico está representado como esferas amarelas, dentro do sítio ativo da estrutura 1H1D).

Este resultado implica que o acoplamento entre a IL-6 e a COMT é energeticamente favorável (ligação exergônica: dissipa energia) e está situada entre o nível de energia

de ligações de *van der Waals* – muito fracas, porque aleatórias - ($< -1\text{Kcal/mol}$) e o nível de ligações químicas covalentes – extremamente fortes - ($< -100\text{Kcal/mol}$) [Campbell, 2001]. Daí, tal ligação pode ser considerada favorável exergonicamente, reversível (porque não-covalente) e sendo reversível, pode ser competitiva (relação entre as concentrações ou biodisponibilidade das moléculas envolvidas). Uma ligação entre moléculas com estas características – exergônica, reversível e competitiva – bem como o resultado de minimização energética obtido, autoriza a ação de outras substâncias (drogas, medicamentos, substâncias naturalmente encontradas no organismo etc) seja no favorecimento do *docking* molecular, seja no seu impedimento.

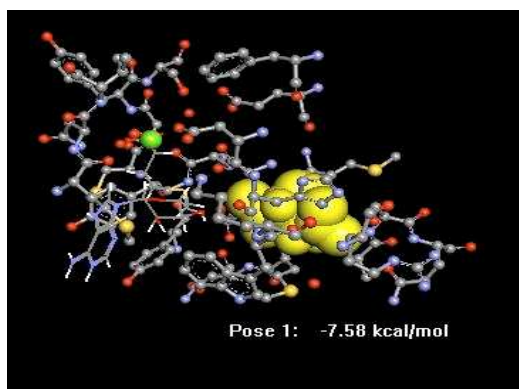


Figura 4.1 – Resultado de *docking* entre IL-6 e COMT
-7,58 Kcal/mol (150 poses válidas).

ENERGIA DE LIGAÇÃO EXERGÔNICA, REVERSÍVEL, COMPETITIVA E NÃO-COVALENTE.

4.1.2 – *Docking* Molecular por Minimização Energética entre IL-6 e MAO-A:

4.1.2.1 – Descrição dos Procedimentos Experimentais *in silico* para o *Docking* Molecular por Minimização Energética entre IL-6 e MAO-A :

As estruturas homólogas à Interleucina-6 – IL-6 – e à Monoaminoxidase-A – MAO-A - *in silico*, devidamente depositadas no Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>), lá denominadas 1ALU e 2BXR respectivamente, foram descarregadas localmente daquele Banco de Dados. Essas estruturas foram obtidas através de difração por Raios X a uma resolução de 1.9 e 3.0 Angstroms respectivamente. Tais estruturas apresentam uma substância ligante e uma substância localizada nos seus respectivos sítios ativos – AS QUAIS SERÃO RESPONSÁVEIS PELO ACOPLAMENTO ENTRE O HOMÓLOGO DA IL-6 E DA MONOAMINOXIDASE-A – MAO-A - denominadas Ácido D-Tartárico (TAR), ligante da estrutura 1ALU e N-[3-(2,4-Diclorofenoxi)Propil]-N-Metil-

N-Prop-2-Inilamina (MGL), localizada no sítio ativo Dinucleotideo Flavín-Adenina da estrutura 2BXR.

Após a descarga das respectivas estruturas, estas foram submetidas individualmente à minimização energética, à saber, a melhor conformação físico-química possível, o que significa a melhor probabilidade de homologia entre a estrutura *in silico* e a molécula *in vitro* ou *in vivo*. Em outras palavras, tal minimização energética individual elege a estrutura físico-quimicamente mais estável - denominada *best pose* - e diminui as expectativas de *docking* molecular, tornando, assim, o resultado do *docking* molecular experimentalmente menos provável. Tal condição de menor probabilidade é a condição que assegura um *alto grau no rigor* do experimento.

Após a eleição das estruturas mais estáveis – *best pose* – relativas à 1ALU e 2BXR entre as 150 poses obtidas, tais estruturas foram submetidas ao *docking* molecular por minimização energética propriamente dito.

O resultado do *docking* molecular entre o ligante Ácido D-Tartárico da estrutura 1ALU e a substância N-[3-(2,4-Diclorofenoxi)Propil]-N-Metil-N-Prop-2-Inilamina, localizada no sítio ativo da estrutura 2BXR, resultou em uma minimização energética de **-7.95Kcal/mol** quando as duas estruturas foram acopladas, conforme figura 4.2 (o Ácido D-Tartárico está representado em esferas amarelas, dentro do sítio ativo da estrutura 2BXR).

Este resultado implica que o acoplamento entre a IL-6 e a MAO-A é energeticamente favorável (ligação exergônica: dissipa energia) e está situada entre o nível de energia de ligações de *van der Waals* – muito fracas, porque aleatórias - (< -1Kcal/mol) e o nível de ligações químicas covalentes – extremamente fortes - (< -100Kcal/mol) [Campbell, 2001]. Daí, tal ligação pode ser considerada favorável exergonicamente, reversível (porque não-covalente) e sendo reversível, pode ser competitiva (relação entre as concentrações das moléculas envolvidas). Uma ligação entre moléculas com estas características – exergônica, reversível e competitiva – bem como o resultado de minimização energética obtido, autoriza a ação de outras substâncias (drogas, medicamentos, substâncias naturalmente encontradas no organismo etc) seja no favorecimento do *docking* molecular, seja no seu impedimento.

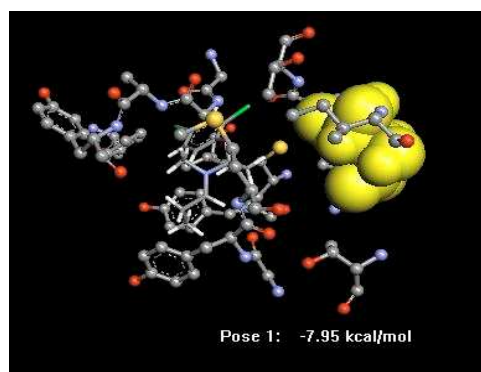


Figura 4.2 – Resultado de docking
-7,95 Kcal/mol (150 poses válidas).

ENERGIA DE LIGAÇÃO EXERGÔNICA, REVERSÍVEL, COMPETITIVA E NÃO
COVALENTE.

4.1.3 – *Docking* Molecular por Complementariedade Topológica entre IL-6 e COMT:

4.1.3.1 – Descrição dos Procedimentos Experimentais *in silico* para o *Docking* Molecular por Complementariedade Topológica entre IL-6 e COMT :

Esta modalidade de *docking* molecular leva em conta as propriedades topológicas das estruturas *in-silico* no que se refere às possibilidades de acoplamento por sobreposição geométrica, levando ainda em conta as características físico-químicas de cada estrutura durante a operação de *docking*. O próprio software utilizado [Wolber & Langer, 2005] faz a busca *on-line* no Protein Data Bank, importando as estruturas solicitadas; no caso 1ALU e 1H1D. Feito isso, o experimentador seleciona respectivamente ligante e sítio ativo das estruturas à serem testadas (TAR e SAM). O software mostra o *docking box* - local no interior da molécula onde será experimentado o *docking* molecular - de cada estrutura, rejeitando a possibilidade de sobreposição estrutural com um desvio RMS maior que 2 Angstroms entre as estruturas. O *docking box* (sítio ativo) da estrutura 1H1D (COMT) está mostrado na figura 4.3.

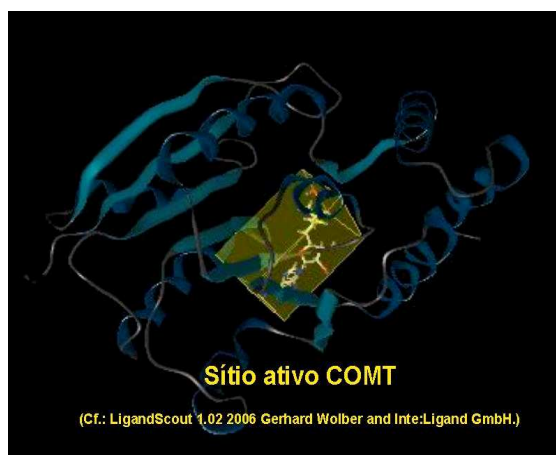


Figura 4.3 – *Docking* Box da COMT.

A sobreposição estrutural entre 1ALU e 1H1D (respectivamente, Ácido D-Tartárico e S-adenosilmetionina docking boxes) demonstrou **5** possibilidades de sobreposições estruturais, dentro do limite fixado em 2 Angstroms, obtendo-se o melhor valor de **desvio RMS = 0.06 Angstroms**, na complexação topológica entre o Ácido D-Tartárico e a S-adenosilmetionina, conforme figura 4.4.

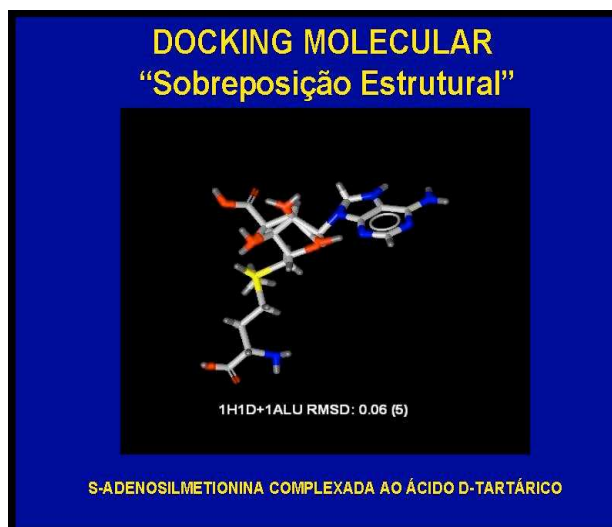


Figura 4.4 – Complexação Topológica entre SAM e TAR

4.1.4 – *Docking* Molecular por Complementariedade Topológica entre IL-6 e MAO-A:

4.1.4.1 – Descrição dos Procedimentos Experimentais *in silico* para o *Docking* Molecular por Complementariedade Topológica entre IL-6 e MAO - A :

Esta modalidade de *docking* molecular leva em conta as propriedades topológicas das estruturas *in-silico* no que se refere às possibilidades de acoplamento por

sobreposição geométrica, levando ainda em conta as características físico-químicas de cada estrutura durante a operação de *docking*. O próprio software utilizado [Wolber & Langer, 2005] faz a busca on-line no Protein Data Bank, importando as estruturas solicitadas; no caso 1ALU e 2BXR. Feito isso, o experimentador seleciona respectivamente ligante e sítio ativo das estruturas à serem testadas (TAR e MGL). O software mostra o *docking box* - local no interior da molécula onde será experimentado o *docking* molecular - de cada estrutura, rejeitando a possibilidade de sobreposição estrutural com um desvio RMS maior que 2 Angstroms. O *docking box* (sítio ativo) da estrutura 2BXR (MAO-A) está mostrado na figura 4.5.



Figura 4.5 – *Docking* Box da MAO-A.

A sobreposição estrutural entre 1ALU e 2BXR (respectivamente, Ácido D-Tartárico e N-[3-(2,4-Diclorofenoxi)Propil]-N-Metil-N-Prop-2-Inilamina *docking boxes*) demonstrou **5** possibilidades de sobreposições estruturais, dentro do limite fixado em 2 Angstroms, obtendo-se o melhor valor de **desvio RMS = 0.79 Angstroms**, na complexação topológica entre o Ácido D-Tartárico e N-[3-(2,4-Diclorofenoxi)Propil]-N-Metil-N-Prop-2-Inilamina, conforme figura 4.6.

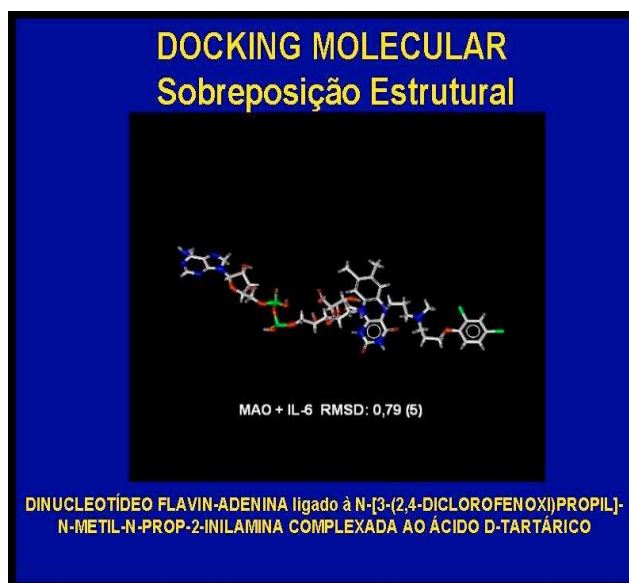


Figura 4.6 – Complexação Topológica entre MGL e TAR.

4.2 – Verificações por Análise de Estrutura Secundária (métodos K-S e PDB) :

A verificação dos resultados obtidos no *docking* molecular *in-silico* entre IL-6 e COMT (1ALU e 1HD1) e entre IL-6 e MAO-A (1ALU e 2BXR) respectivamente, foi realizada utilizando-se de software acreditado na indústria farmacêutica e biotecnológica [Accelrys Software Inc.,2006], utilizando-se de dois algoritmos distintos: método 'Kabsch-Sander' e método 'PDB'. Tais métodos comparam a estrutura secundária⁸ da proteína original com as estruturas secundárias das proteínas acopladas. A comparação é feita on-line, consultando o Protein Data Bank, e também com determinadas características esperadas, já previstas em cada método. A primeira saída diz respeito se a comparação foi bem sucedida, o que aconteceu nas quatro verificações. À seguir os dois métodos produzem um intervalo de escores, onde o resultado obtido em cada verificação deve estar próximo ou superar o valor de escore mais alto.

Os resultados dos experimentos verificação de docking molecular obtidos foram os seguintes:

- Método 'Kabsch-Sander' (K-S): Foi bem sucedido.
 Teste de *docking* entre IL-6 e COMT (1ALU e 1HD1): intervalo de escore: 43.49 a 96.65. **Escore obtido: 105.22, superando em 8.57 pontos.**
- Método 'PDB': Foi bem sucedido.

⁸ Estruturas que resultam da combinação de segmentos com arranjo secundário em "motivos", longos padrões que se repetem ao longo de uma proteína.

Teste de *docking* entre IL-6 e COMT (1ALU e 1HD1): intervalo de escore: 43.49 a 96.65. **Escore obtido: 97.89, superando em 1.24 pontos.**

4.2.1 – Verificação de Estrutura Secundária entre IL-6 e COMT (métodos K-S e PDB):

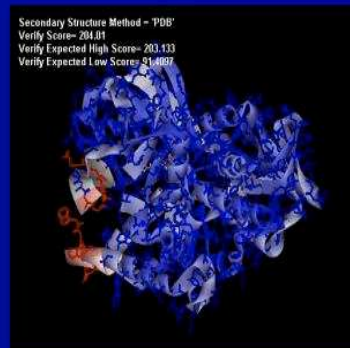
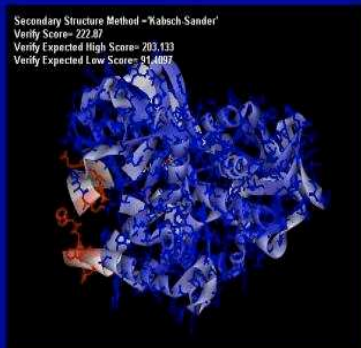


Figura 4.7 – Resultado da Validação de *docking* entre IL-6 e COMT.

4.2.2 – Verificação de Estrutura Secundária entre IL-6 e MAO-A (métodos K-S e PDB):

- Método 'Kabsch-Sander' (K-S): Foi bem sucedido.
Teste de *docking* entre IL-6 e MAO-A (1ALU e 2BXR): intervalo de escore: 91.40 a 203.13. **Escore obtido: 222.87, superando em 19.73 pontos.**
- Método 'PDB': Foi bem sucedido.
Teste de *docking* entre IL-6 e MAO-A (1ALU e 2BXR): intervalo de escore: 91.40 a 203.13. **Escore obtido: 204.01, superando em 0.88 pontos.**

VERIFICAÇÃO FINAL: MAO-A e Ácido D-Tartárico



ESCORE: 222.87 **ESCORE: 204.01**
MÁXIMO ESPERADO: 203.133 **MÁXIMO ESPERADO: 203.133**
(SUPEROU EM 19.73 Pontos) **(SUPEROU EM 0.88 Pontos)**

(Cf.: Accelrys Discovery Studio 1.5 2005 Accelrys Software Inc.)

Figura 4.8 – Resultado da Validação de *docking* entre IL-6 e MAO-A

4.2.3 – Visualização da Complexação Final entre o ligante da IL-6, Ácido D-Tartárico, e COMT:

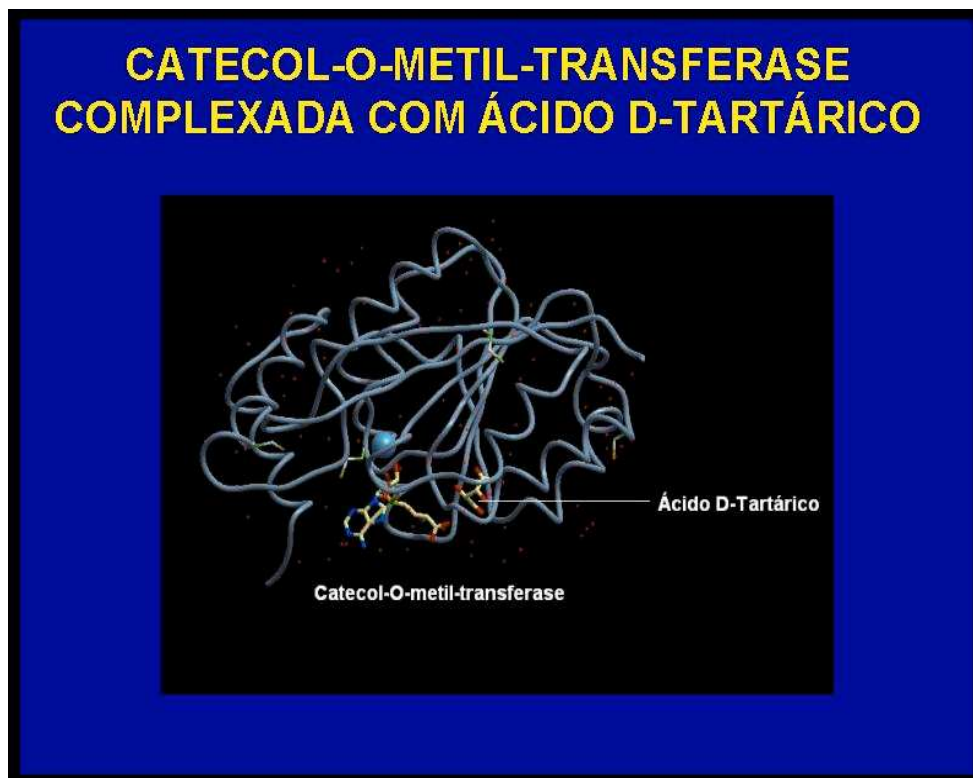


Figura 4.9 – Visualização Final de *docking* entre IL-6 e COMT.

4.2.4 – Visualização da Complexação Final entre o ligante da IL-6, Ácido D-Tartárico, e MAO-A:

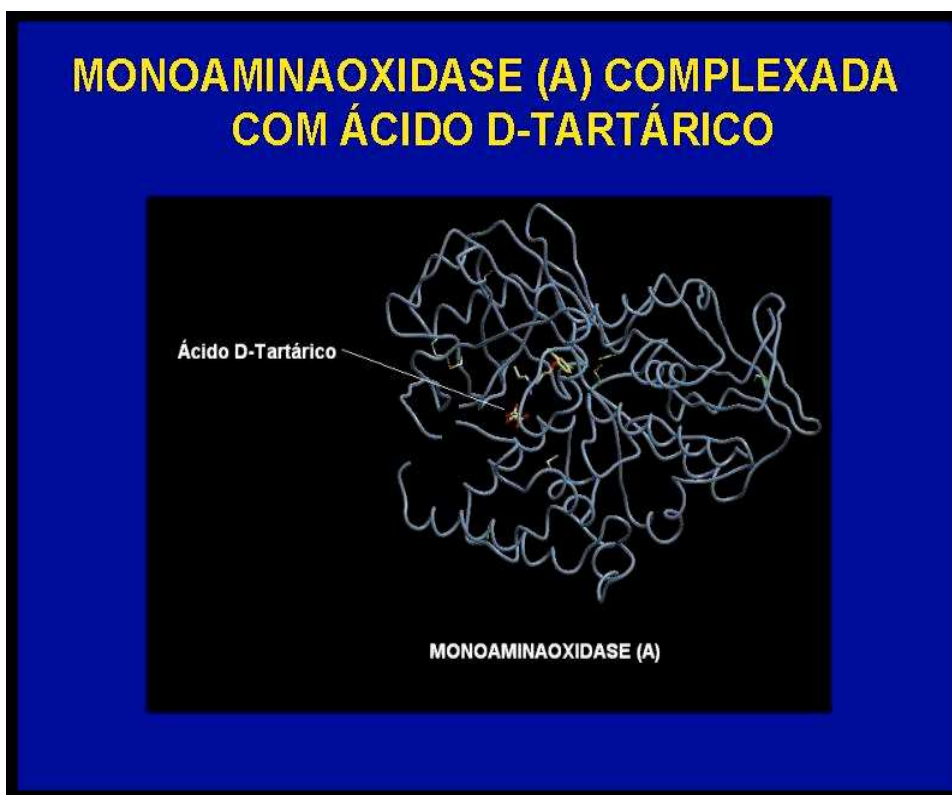


Figura 4.10 – Visualização Final de *docking* entre IL-6 e MAO-A

4.3 – Discussão e Comparação entre os Experimentos

A motivação para conduzir os experimentos específicos realizados foi apresentar predições quantitativas da energia livre final da associação de proteína-ligante e proteína-proteína suficientemente confiáveis para vir à ser um complemento útil às experiências e compreensão de processos biológicos ou para contribuir no projeto de novas drogas no âmbito da psicofarmacologia.

O método de minimização energética abordou a *variação energética exergônica* (dissipação energética) favorecida, nos levando à identificação das conformações e dos mecanismos para a associação de proteína-ligante e proteína-proteína, ou ainda para processos mais complexos, tais como reações químicas ou dobras moleculares físico-químicas relevantes e teoricamente mais estáveis. Um dos problemas principais ao predizer "complexos-candidatos" proteína-proteína - *best poses* - por transições estruturais entre as conformações livres e acopladas é que os algoritmos do *docking* entre proteína-proteína necessitam contar com algumas simplificações, desde que o *docking inteiramente flexível* ainda não é computacionalmente praticável.

Para melhorar os procedimentos de *docking* molecular, o conhecimento detalhado sobre propriedades dinâmicas das superfícies acopláveis é necessário. Nesse caso complementou-se e confrontou-se os resultados experimentais de minimização energética onde as propriedades estáticas como a complementariedade conformacional e as diferenças entre estruturas livres e acopladas das mesmas estruturas moleculares – anteriormente submetidas ao método de minimização energética - foram estudadas. Tais experimentos de confrontação exibiram baixo desvio de complementariedade conformacional, *o que reafirma as características moleculares físico-químicas teoricamente mais estáveis*, após o procedimento de *docking* por minimização energética.

A validação final das estruturas acopladas foi realizada através de software industrialmente reconhecido pela indústria biotecnológica e farmacêutica [Accelrys Software Inc., 2006].

Capítulo 5 – Conclusões:

Os achados biocomputacionais aqui demonstrados sugerem que a hipótese levantada por Müller e colaboradores convergem com os experimentos *in silico*, ou seja, a *patofisiologia da esquizofrenia está relacionada com a presença da citocina IL-6 porque tal citocina acopla-se às enzimas Catecol-O-Metil-Transferase e Monoaminoxidase-A*. Desde que a citocina IL-6 foi encontrada em concentrações superiores em indivíduos esquizofrênicos do que em relação à indivíduos saudáveis, sua ação provavelmente está em relação à sua concentração no organismo, sugerindo o mecanismo de competitividade.

5.1 – Sugestões para Trabalhos Futuros:

O autor desta pesquisa sugere que sejam conduzidos experimentos laboratoriais, através da utilização de técnicas denominadas *marcadores moleculares*. Atualmente se dispõe de um grande arsenal de métodos para a análise de marcadores moleculares. A maioria dos métodos de detecção de polimorfismos moleculares emprega a técnica de eletroforese, onde diferentes propriedades das macromoléculas (proteínas, enzimas etc) são levadas em consideração e como estas propriedades influem na sua migração sob um campo elétrico em um meio gelatinoso ou poroso. Diferenças de *tamanho, carga elétrica ou forma* das macromoléculas em estudo podem ser responsáveis por diferenças na migração.

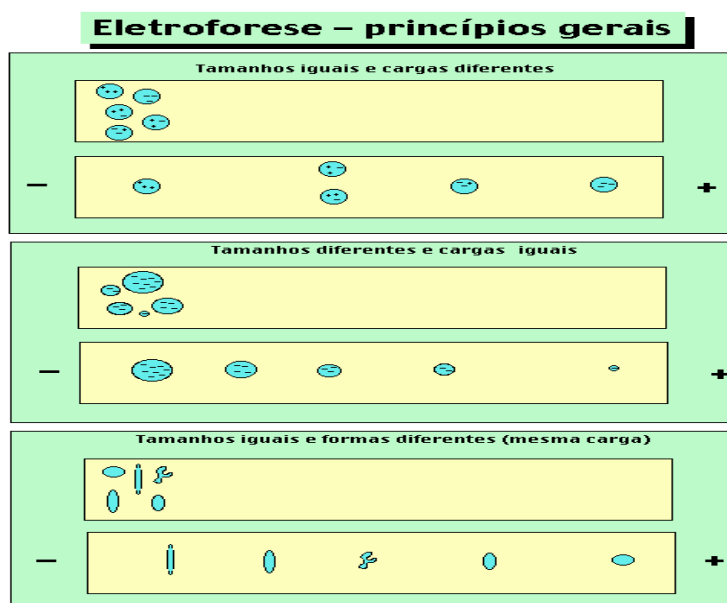


Fig.5.1 – Princípios da técnica de eletroforese

As análises podem ser qualitativas ou quantitativas – estas últimas por densitometria ou eluição. A utilização de eletroforese no uso da rotina laboratorial tem sido importante em biologia molecular e *enzimopatias*. Uma *enzimopatia* afetando tanto a enzima COMT quanto a enzima MAO-A pode ser o mecanismo bioquímico que está por trás do resultado dos experimentos aqui realizados *in silico*, na exata medida em *que as duas enzimas podem estar com seu tamanho, carga elétrica ou forma alterados em consequência do acoplamento – docking - à citocina interleucina-6: a citocina Interleucina-6 mostra-se como fator importante na patofisiologia da esquizofrenia.*

Referências Bibliográficas:

- [Accelrys Software Inc., 2006] 2006; Discovery Studio 1.5; Accelrys Software Inc.; EUA, Reino Unido, Japão.
- [American Psychiatry Association, 2000] 2000 AMERICAN PSYQUIATRY ASSOCIATION, 2000 *DSM-IV-R*, Ed. ARTMED-Sul : Porto Alegre.
- [Andreasen, 1996] 1996 ANDREASEN, N.C. ; 1996 “Schizophrenia and cognitive dysmetria, a PET study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebelar circuitry”, *Proc. Acad. Sci. USA*, v.93; p.9985-9990.
- [Andreasen, 1977a] 1977a ANDREASEN, N.C.; “Linking mind and brain: the study of mental illness: a project to for a scientific psychopathology”. *Science*; vol.275; p. 1592-1596.
- [Andreasen, 1977b] 1977b ANDREASEN, N.C.; “The role of thalamus in schizophrenia.” *Can. J. Psychiatry*, v.42 p.27-33.
- [Ayrosa & Carvalho, 2001] 2001 AYROSA,P.P. & CARVALHO, L. A V. “Um modelo conexionista para o efeito de priming nos esquizofrênicos com distúrbios de pensamento.” *CBComp*:2001.
- [Berman *et al*, 2000] BERMAN, H.M. ; WESTBROOK, J. FENG, G. ; GILLILAND, T.N. BHAT, ; WEISSIG, H. ; SHINDYALOV, I.N. ; BOURNE, P.E., 2000; “The protein data bank”; *Nucleic Acid Research*, v.28; p. 235 – 242.
- [Bonifácio *et al*, 2003] 2003; BONIFÁCIO, M. ; ARCHER, M. ; RODRIGUES, M. ; MATIAS, P. ; LEARMONTH, D. ; CARRONDO, M. ; SOARES-DA-SILVA, P. “Kinetics and Crystal Structure of Catechol-O-Methyltransferase Complex with Co-Substrate and a Novel Inhibitor with Potential Therapeutic Application”; *Mol.Pharmacol*; v.62; p.795 , (1H1D Protein Data Bank ascension date: 17/JUL/2003).
- [Bruce & Peebles, 1903] 1903 BRUCE, L.C. & PEEBLES , A M S. “Clinical and experimentation on catatonia.” *J Mental Sci* : v.49: p.614-628.
- [Campbell, 2001] CAMPBELL,M., 2001, *Bioquímica* Ed. ARTMED-Sul:Porto Alegre.
- [Carlson & Lundquist, 1963] 1963 CARLSON, M.& LUNDQUIST, M. “Effect of chlorpromazine and haloperidole on the formation of 3-methoxytyramine and normatanophrine in mouse brain.” *Acta Pharmacologica*.v.20, p.140-144.
- [CLCbio A/S, 2006] 2006; CLCbio A/S “CLC Protein Workbench 2.0.2”; CLCbio A/S, Dinamarca.

- [Dameshek, 1930] 1930 DAMESHEK, W. "White blood cells in demetia praecox and dementia paralytica". *Arch Neuro Psyquiatry*. v.24, p.855-1930
- [De Colibus *et al*, 2005] 2005; DE COLIBUS, L. ; LI, M. ; BINDA, C. ; LUSTIG, A. ; EDMONDSON, D.E. ; MATTEVI, A ; "Three-Dimensional Structure of Human Monoamine Oxidase a (Mao A): Relation to the Structures of Rat Mao and Human Mao B"; a ser publicado (2BXR Protein Data Bank ascension date: 09/AUG/2005).
- [Duhovny *et al*, 2002] 2002; DUHOVNY D. ; NUSSINOV, R. ; WOLFSON H.J. ; 2002; "Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules". In Gusfield *et al.*, Ed. Proceedings of the 2'nd Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI); Springer Verlag: Rome, Lecture Notes in Computer Science (2452 supl) p. 185-200.
- [Fessel , 1963] 1963 FESSEL, W.J. "The 'antibrain' factors in psychiatric patient's sera." *Arch. Gen. Psyquiatry*. v.8, p.614-621.
- [Goldman-Racik *et al*, 1977] 1977 GOLDMAN-RACIK *et al.* "Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia." *Schizophrenia Bulletin*, v.123 p.437-458.
- [Goldman-Racik *et al*, 1998] 1978 GOLDMAN-RACIK *et al.* "Cortical dysfunction in schizophrenia during auditory word and ressonance imaging." *Arc. Gen. of Psyquiatry*, v.55 p.1097-1103.
- [Heath & Krupp, 1967] 1967 HEATH, R. G. & KRUPP, I.M. "Schizophrenia as an immunologic disorder: demonstration of antibrain globulins by fluorescent antibody technics." *Arch. Gen. Psyquiatry*: v.39, p.82-87.
- [Hypercube Inc. , 2003] 2003 HYPERCUBE INC. "*HyperChem 7.52 Pro*"; Hypercube, Inc.; EUA.
- [Kabani & Goldman-Racik, 2002] 2002 KABANI, N. GOLDMAN-RACIK,P. "Interaction with neuronal calciun sensor – 1 mediates desensitization of D2 dopamine receptors." *Journal of Neuroscience*: v.22(19) p.8476-8486.
- [Kandell *et al*, 2000] 2000 KANDELL, E.R. ; SCHAWARTZ, J. H. ; JESSEL, T.M., 2000 *Fundamentos da neurociência e do comportamento*. Ed. Guanabara-Koogan : Rio de Janeiro.
- [Kapczinski *et al*, 2000] 2000 KAPCZINSKI, F ; QUEVEDO, J. ; IZQUIERDO, I. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátrico*, 2000, Ed. ARTMED-Sul: Porto Alegre.
- [Kapur, 2003] 2003 KAPUR, S. "Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology and pharmacology in schizophrenia." *Am J Psyquiatry*, v.160, p.13-23.

- [Knight, 1982] 1982 KNIGHT, J. G. "Dopamine-receptor-stimulating autoantibodies: a possible cause of schizophrenia." *Lancet*, v.1, p.1073-1076.
- [Koh & Goldman-Racik, 2003] 2003 KOH, P.; GOLDMAN-RACIK, P. "Up-regulation of neuronal calcium sensor 1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients." *Proc Natl. Acad. Sci*, v.100: p.313-317.
- [Müller *et al*, 2004a] 2004; MÜLLER, N. ; ULMSCHNEIDER, M. ; SCHEPPACH, C. ; SCHWARZ, M.J. ; ACKENHEIL, M. ; MÖLLER, H.J. ; GRUBER, R. ; RIEDEL, M.; 2004, "COX-2 inhibition as a treatment approach in schizophrenia: immunological considerations and clinical effects of celecoxib add-on therapy", *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, v. 254 (1), p.14 - 22.
- [Müller *et al*, 2004b] 2004; MÜLLER, N. ; STRASSNIG, M. ; SCHWARZ, M.J. ; ULMSCHNEIDER, M. ; RIEDEL, M.; 2004, "COX-2 inhibitors as adjunctive therapy in schizophrenia", *Expert Opin Investig Drugs*, v.13 (8), p. 1033 – 1034.
- [Müller *et al*, 2002] 2002; MÜLLER, N; RIEDEL, M.; SCHEPPACH, C. ; BRANDSTÄTTER, B. ; SOKULLU, S. ; KRAMPE, K. ; ULMSCHNEIDER, M. ; ENGEL, R. R. ; MÖLLER, H.J. ; SCHWARZ, M.J.; 2002, "Beneficial Antipsychotic Effects of Celecoxib Add-On Therapy Compared to Risperidone Alone in Schizophrenia", *Am J Psychiatry*, v.159, p.1209.
- [Müller *et al*, 2000] 2000; MÜLLER, N; GRUBER, R. ; ACKENHEIL, M. ; SCHWARZ, M.J.; 2000, "The Immune System and Schizophrenia: an Integrative view", *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.917, p.456 – 467.
- [Müller *et al*, 1999] 1999; MÜLLER, N; RIEDEL, M.; ACKENHEIL, M. ; SCHWARZ, M.J.; 1999 "The role of immune function in schizophrenia: an overview." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, v.249, (4 suppl), p.62-68.
- [Pandey *et al*, 1981] 1981 PANDEY, R.S., GUPTA, A & CHATURVEDI, J.C. "Autoimmune model of schizophrenia with special reference to antibrain antibodies." *Biological Psychiatry*, v.16, p.1123-1136.
- [Qiu *et al*, 1998] 1998 QIU,Z.; SWEENEY, D.; NETZEBAND, G. GRUOL, D. "Chronic interleukin-6 alters NMDA receptor-mediate membrane responses and enhances neurotoxicity in CNS neurons." *J. Neurosci.* v18(24): p. 10445-10456.
- [Rozenhal *et al*, 2000] 2000 ROZENTHAL, M. et al. "Searching and analysing neuropsychological patterns in schizophrenia with neural networks." *J. Bras. Psiquiatria* v.1(2) p.5-12.
- [Sommers *et al*, 1998] 1997; SOMMERS, W. ; STAHL, M. ; SEEHRA, J.S;1997, "1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling." *EMBO J.* v.16 p.989-997, (1ALU Protein Data Bank ascension date: 03/JUN/1998).

- [Stahl, 2000] STAHL, S.M., 2000 *Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications*, Cambridge University Press: Cambridge.
- [Szasz, 1987] 1987 SZASZ, T. "Esquizofrenia: o símbolo sagrado da psiquiatria." Zahar Editores: Rio de Janeiro.
- [Thompson, 2004] 2004; THOMPSON, M. A.; 2004 "Molecular docking using ArgusLab: An efficient shape-based search algorithm and the AScore scoring function." Fall 2004 ACS meeting; Philadelphia.
- [Wang *et al*, 2002] 2002; WANG, R.; LAI, L.; WANG, S. ; 2002 "Further Development and Validation of Empirical Scoring Functions for Structure-Based Binding Affinity Prediction."; J. Comput.-Aided Mol. Des. V.16; p.11-26.
- [Wender & Klein, 1987] 1987 WENDER, P. H.; KLEIN, D. F.; "Psiquiatria: mente, ânimo e medicina". Ed. Summus: São Paulo.
- [Wolber & Langer, 2005] 2005; WOLBER, G. ; LANGER, T.; 2005 "LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters" J. Chem. Inf. Model; v. 45(1); p.160-169.

ANEXO 1: Relatórios de Docking Molecular por Minimização Energética

Calculation start time: Sat Jun 24
14:10:13 2006

*
*
* ArgusLab (tm) *
* *
* Version 4.0 *
* *
* Copyright (c) 1996-2004 *
* *
* Planaria Software LLC *
*ALL RIGHTS RESERVED
*
*

*info@planaria-software.com
* http://www.planaria-software.com
*
* *

WARNING -- ArgusLab may not be used in any manner that competes with the business of Planaria Software LLC or will provide assistance to any competitor of Planaria Software LLC. The licensee of this program is prohibited from giving any competitor of Planaria Software LLC.

access to this program. By using this program, the user acknowledges that Planaria Software LLC. is engaged in the business of creating and licensing software in the field of computational chemistry and represents and warrants to Planaria Software LLC that it is not a competitor of Planaria Software LLC. and that it will not use this program in any manner prohibited above.

Grid min (x,y,z) : -31.2637, 52.2543,
33.935

Grid max (x,y,z) : -5.66369, 71.0543,
53.135

Grid dimensions: 65 x 48 x 49

Total number of grid points : 152880

Total memory required for grids =
15899520 bytes

AScore reading parameters from file:
F:\ArgusLab\params\AScore\ascore.prm

constant term = 2.783

vdW coefficient = -0.00096

h-bond coefficient neutral-neutral = 0.38

rotors coefficient = -0.1

hydrophobic coefficient = 0.0373

vdW radius C = 1.9 angstrom

vdW radius N = 1.8 angstrom
vdW radius O = 1.7 angstrom
vdW radius F = 1.5 angstrom
vdW radius P = 2.1 angstrom
vdW radius S = 2 angstrom
vdW radius Cl = 1.8 angstrom
vdW radius Br = 2 angstrom
vdW radius I = 2.2 angstrom
vdW radius metals = 1.2 angstrom
vdW radius H = 1.2 angstrom
vdW radius O water = 1.7 angstrom
vdW radius all other atoms = 1.9
angstrom
IgnoreTargetHydrogens = true
IgnoreLigandHydrogens = false
ScaleHBondTargetWaters = 0.25
AScore 29 sec. to prepare the grids.
Calculated 13575828 of
271209120 total possible
interactions.
Bump grid rank (x,y,z) = 69, 51, 53
Total memory required for bump grid =
746028 bytes
Bump grid : 26880 points were inside the
free volume and 159627 points
were outside
Grid min (x,y,z) : -31.2637, 52.2543,
33.935
Grid max (x,y,z) : -5.76369, 71.0043,
53.435
Total memory required for fine grid =
746028 bytes
Total memory required for first coarse
grid = 23936 bytes
fine grid : 40046 points were inside the
free volume and 146461 points
were outside

fine grid : 21.471580 percent of grid is
free volume
docking grid : 2740 points were inside
the free volume and 3244 points
were outside
docking grid : 45.788770 percent of grid
is free volume

Ligand atom type information

1. (1826) O1 : H-bond acceptor
2. (1827) O11 : H-bond acceptor
3. (1828) C1 : Polar
4. (1829) C2 : Polar
5. (1830) O2 : H-bond
donor/acceptor
6. (1831) C3 : Polar
7. (1832) O3 : H-bond
donor/acceptor
8. (1833) C4 : Polar
9. (1834) O4 : H-bond acceptor
10. (1835) O41 : H-bond acceptor
11. (1836) H : atom type none
12. (1837) H : atom type none
13. (1838) H : atom type none
14. (1839) H : atom type none

ArgusDock Search Engine

Settings for the docking run

Number of Ligand torsions = 5
Number of Target torsions = 0

Precision = High Precision
Augment root node with inner torsions =
true
Maximum number of poses = 150
Start the docking
Ligand extended root node radii:
primary = 1.31671, secondary =
1.23298, tertiary = 0.0293301
650 search points from a total of 2740
grid points
Root node configuration 0
Root node configuration 1
Root node configuration 2
Root node configuration 3
Root node configuration 4
Root node configuration 5

Number of candidate poses found = 150
5400 sec. to complete the initial search.

pose 0 fitness = -6.96166
pose 1 fitness = -6.95513
pose 2 fitness = -6.93351
pose 3 fitness = -6.91951
pose 4 fitness = -6.91567
pose 5 fitness = -6.90911
pose 6 fitness = -6.89335
pose 7 fitness = -6.86754
pose 8 fitness = -6.85632
pose 9 fitness = -6.84733
pose 10 fitness = -6.79692
pose 11 fitness = -6.79547
pose 12 fitness = -6.7693
pose 13 fitness = -6.76776
pose 14 fitness = -6.76069
pose 15 fitness = -6.75246

pose 16 fitness = -6.75118
pose 17 fitness = -6.74973
pose 18 fitness = -6.73836
pose 19 fitness = -6.73218
pose 20 fitness = -6.73081
pose 21 fitness = -6.72895
pose 22 fitness = -6.71451
pose 23 fitness = -6.71057
pose 24 fitness = -6.69702
pose 25 fitness = -6.65002
pose 26 fitness = -6.63517
pose 27 fitness = -6.61793
pose 28 fitness = -6.6139
pose 29 fitness = -6.61246
pose 30 fitness = -6.5973
pose 31 fitness = -6.59644
pose 32 fitness = -6.59638
pose 33 fitness = -6.59149
pose 34 fitness = -6.59136
pose 35 fitness = -6.59104
pose 36 fitness = -6.58961
pose 37 fitness = -6.58467
pose 38 fitness = -6.5805
pose 39 fitness = -6.57993
pose 40 fitness = -6.57651
pose 41 fitness = -6.57489
pose 42 fitness = -6.5679
pose 43 fitness = -6.56176
pose 44 fitness = -6.55346
pose 45 fitness = -6.54978
pose 46 fitness = -6.54723
pose 47 fitness = -6.54712
pose 48 fitness = -6.54132
pose 49 fitness = -6.53947
pose 50 fitness = -6.52985
pose 51 fitness = -6.52933
pose 52 fitness = -6.52701

pose 53 fitness = -6.51845
pose 54 fitness = -6.50787
pose 55 fitness = -6.50676
pose 56 fitness = -6.50676
pose 57 fitness = -6.49766
pose 58 fitness = -6.47212
pose 59 fitness = -6.46646
pose 60 fitness = -6.46643
pose 61 fitness = -6.46519
pose 62 fitness = -6.46402
pose 63 fitness = -6.46295
pose 64 fitness = -6.45751
pose 65 fitness = -6.45675
pose 66 fitness = -6.4521
pose 67 fitness = -6.44891
pose 68 fitness = -6.4451
pose 69 fitness = -6.44502
pose 70 fitness = -6.44289
pose 71 fitness = -6.44235
pose 72 fitness = -6.43735
pose 73 fitness = -6.43608
pose 74 fitness = -6.43079
pose 75 fitness = -6.42711
pose 76 fitness = -6.42581
pose 77 fitness = -6.4258
pose 78 fitness = -6.41962
pose 79 fitness = -6.41722
pose 80 fitness = -6.41453
pose 81 fitness = -6.41295
pose 82 fitness = -6.41289
pose 83 fitness = -6.41206
pose 84 fitness = -6.41009
pose 85 fitness = -6.40318
pose 86 fitness = -6.4021
pose 87 fitness = -6.3991
pose 88 fitness = -6.39725
pose 89 fitness = -6.39664

pose 90 fitness = -6.38916
pose 91 fitness = -6.38385
pose 92 fitness = -6.38255
pose 93 fitness = -6.38037
pose 94 fitness = -6.38032
pose 95 fitness = -6.37914
pose 96 fitness = -6.37113
pose 97 fitness = -6.36987
pose 98 fitness = -6.36496
pose 99 fitness = -6.36397
pose 100 fitness = -6.36372
pose 101 fitness = -6.3632
pose 102 fitness = -6.36279
pose 103 fitness = -6.36111
pose 104 fitness = -6.36096
pose 105 fitness = -6.35975
pose 106 fitness = -6.35967
pose 107 fitness = -6.35831
pose 108 fitness = -6.35526
pose 109 fitness = -6.35038
pose 110 fitness = -6.34734
pose 111 fitness = -6.34454
pose 112 fitness = -6.337
pose 113 fitness = -6.33371
pose 114 fitness = -6.32766
pose 115 fitness = -6.32762
pose 116 fitness = -6.32423
pose 117 fitness = -6.31315
pose 118 fitness = -6.31253
pose 119 fitness = -6.30665
pose 120 fitness = -6.30588
pose 121 fitness = -6.30425
pose 122 fitness = -6.29832
pose 123 fitness = -6.29642
pose 124 fitness = -6.29641
pose 125 fitness = -6.29623
pose 126 fitness = -6.29482

pose 127 fitness = -6.29165
pose 128 fitness = -6.27977
pose 129 fitness = -6.27765
pose 130 fitness = -6.27439
pose 131 fitness = -6.25309
pose 132 fitness = -6.2518
pose 133 fitness = -6.25132
pose 134 fitness = -6.25045
pose 135 fitness = -6.24844
pose 136 fitness = -6.2461
pose 137 fitness = -6.24323
pose 138 fitness = -6.23938
pose 139 fitness = -6.23872
pose 140 fitness = -6.23621
pose 141 fitness = -6.23538
pose 142 fitness = -6.22698
pose 143 fitness = -6.21029
pose 144 fitness = -6.20381
pose 145 fitness = -6.20086
pose 146 fitness = -6.19345
pose 147 fitness = -6.18518
pose 148 fitness = -6.17616
pose 149 fitness = -6.14213
Refining candidate poses
Clustering the final poses : 55 final
unique configurations
Number of local searches that
succeeded in locating new minima
= 3
Re-clustering the final poses : 54 final
unique configurations

Best Ligand Pose : energy = -7.57605
kcal/mol
Docking run: elapsed time = 5404
seconds
Calculation start time: Thu Jun 29

22:11:31 2006

*
* ArgusLab (tm) *
*
* Version 4.0 *
*
* Copyright (c) 1996-2004 *
*
* Planaria Software LLC *
*ALL RIGHTS RESERVED
*
*
* info@planaria-software.com
*
* http://www.planaria-software.com
*
*

WARNING -- ArgusLab may not be
used in any manner that competes
with
the business of Planaria Software
LLC or will provide assistance to
any competitor of Planaria
Software LLC. The licensee of this
program
is prohibited from giving any
competitor of Planaria Software
LLC.
access to this program. By using
this program, the user
acknowledges
that Planaria Software LLC. is

engaged in the business of creating and licensing software in the field of computational chemistry and represents and warrants to Planaria Software LLC that it is not a competitor of Planaria Software LLC. and that it will not use this program in any manner prohibited above.

Grid min (x,y,z) : 11.9838, -5.79279, -4.02194

Grid max (x,y,z) : 31.1838, 10.2072, 13.9781

Grid dimensions: 49 x 41 x 46

Total number of grid points : 92414

Total memory required for grids = 9611056 bytes

AScore reading parameters from file:
F:\ArgusLab\params\AScore\ascor
e.prm

constant term = 2.783

vdW coefficient = -0.00096

h-bond coefficient neutral-neutral = 0.38

rotors coefficient = -0.1

hydrophobic coefficient = 0.0373

vdW radius C = 1.9 angstrom

vdW radius N = 1.8 angstrom

vdW radius O = 1.7 angstrom

vdW radius F = 1.5 angstrom

vdW radius P = 2.1 angstrom

vdW radius S = 2 angstrom

vdW radius Cl = 1.8 angstrom

vdW radius Br = 2 angstrom

vdW radius I = 2.2 angstrom

vdW radius metals = 1.2 angstrom

vdW radius H = 1.2 angstrom

vdW radius O water = 1.7 angstrom

vdW radius all other atoms = 1.9
angstrom

IgnoreTargetHydrogens = true

IgnoreLigandHydrogens = false

ScaleHBondTargetWaters = 0.25

AScore 18 sec. to prepare the grids.

Calculated 8413852 of 325574522
total possible interactions.

Bump grid rank (x,y,z) = 52, 44, 49

Total memory required for bump grid =
448448 bytes

Bump grid : 17329 points were inside the
free volume and 94783 points
were outside

Grid min (x,y,z) : 11.9838, -5.79279, -
4.02194

Grid max (x,y,z) : 31.1088, 10.3322,
13.9781

Total memory required for fine grid =
448448 bytes

Total memory required for first coarse
grid = 15232 bytes

fine grid : 26262 points were inside the
free volume and 85850 points
were outside

fine grid : 23.424789 percent of grid is
free volume

docking grid : 1625 points were inside
the free volume and 2183 points
were outside

docking grid : 42.673319 percent of grid
is free volume

Ligand atom type information

1. (3559) O1 : H-bond acceptor
2. (3560) O11 : H-bond acceptor
3. (3561) C1 : Polar
4. (3562) C2 : Polar
5. (3563) O2 : H-bond

donor/acceptor

6. (3564) C3 : Polar
7. (3565) O3 : H-bond

donor/acceptor

8. (3566) C4 : Polar
9. (3567) O4 : H-bond acceptor
10. (3568) O41 : H-bond acceptor
11. (3569) H : atom type none
12. (3570) H : atom type none
13. (3571) H : atom type none
14. (3572) H : atom type none

ArgusDock Search Engine

Settings for the docking run

Number of Ligand torsions = 5
Number of Target torsions = 0
Precision = High Precision
Augment root node with inner torsions =
true
Maximum number of poses = 150
Start the docking
Ligand extended root node radii:
primary = 1.31671, secondary =
1.23298, tertiary = 0.0293301

534 search points from a total of 1625
grid points

Root node configuration 0
Root node configuration 1
Root node configuration 2
Root node configuration 3
Root node configuration 4
Root node configuration 5

Number of candidate poses found = 150
3927 sec. to complete the initial search.

pose 0 fitness = -7.05598
pose 1 fitness = -7.03473
pose 2 fitness = -7.00278
pose 3 fitness = -6.98199
pose 4 fitness = -6.91428
pose 5 fitness = -6.86125
pose 6 fitness = -6.84073
pose 7 fitness = -6.81339
pose 8 fitness = -6.80672
pose 9 fitness = -6.8064
pose 10 fitness = -6.77265
pose 11 fitness = -6.7641
pose 12 fitness = -6.75598
pose 13 fitness = -6.74361
pose 14 fitness = -6.73936
pose 15 fitness = -6.7235
pose 16 fitness = -6.7215
pose 17 fitness = -6.70148
pose 18 fitness = -6.69904
pose 19 fitness = -6.68684
pose 20 fitness = -6.67511
pose 21 fitness = -6.6676
pose 22 fitness = -6.6676
pose 23 fitness = -6.64933

pose 24 fitness = -6.64915
pose 25 fitness = -6.58948
pose 26 fitness = -6.58936
pose 27 fitness = -6.56885
pose 28 fitness = -6.53528
pose 29 fitness = -6.53459
pose 30 fitness = -6.53131
pose 31 fitness = -6.53069
pose 32 fitness = -6.5272
pose 33 fitness = -6.5242
pose 34 fitness = -6.52287
pose 35 fitness = -6.50372
pose 36 fitness = -6.49805
pose 37 fitness = -6.49568
pose 38 fitness = -6.49481
pose 39 fitness = -6.46835
pose 40 fitness = -6.4604
pose 41 fitness = -6.4578
pose 42 fitness = -6.45609
pose 43 fitness = -6.4558
pose 44 fitness = -6.45377
pose 45 fitness = -6.44595
pose 46 fitness = -6.43489
pose 47 fitness = -6.43444
pose 48 fitness = -6.42677
pose 49 fitness = -6.4115
pose 50 fitness = -6.40622
pose 51 fitness = -6.4061
pose 52 fitness = -6.4014
pose 53 fitness = -6.39975
pose 54 fitness = -6.39165
pose 55 fitness = -6.38554
pose 56 fitness = -6.3741
pose 57 fitness = -6.37302
pose 58 fitness = -6.3661
pose 59 fitness = -6.36609
pose 60 fitness = -6.3646

pose 61 fitness = -6.36355
pose 62 fitness = -6.36279
pose 63 fitness = -6.35976
pose 64 fitness = -6.35198
pose 65 fitness = -6.34596
pose 66 fitness = -6.34593
pose 67 fitness = -6.34564
pose 68 fitness = -6.34255
pose 69 fitness = -6.34025
pose 70 fitness = -6.33848
pose 71 fitness = -6.33719
pose 72 fitness = -6.33497
pose 73 fitness = -6.33237
pose 74 fitness = -6.33028
pose 75 fitness = -6.32072
pose 76 fitness = -6.31812
pose 77 fitness = -6.31793
pose 78 fitness = -6.31505
pose 79 fitness = -6.29596
pose 80 fitness = -6.29571
pose 81 fitness = -6.2815
pose 82 fitness = -6.27934
pose 83 fitness = -6.27594
pose 84 fitness = -6.27525
pose 85 fitness = -6.27118
pose 86 fitness = -6.26909
pose 87 fitness = -6.26634
pose 88 fitness = -6.26317
pose 89 fitness = -6.25501
pose 90 fitness = -6.25365
pose 91 fitness = -6.25295
pose 92 fitness = -6.24472
pose 93 fitness = -6.24171
pose 94 fitness = -6.24067
pose 95 fitness = -6.24003
pose 96 fitness = -6.23953
pose 97 fitness = -6.23862

pose 98 fitness = -6.23755
pose 99 fitness = -6.23412
pose 100 fitness = -6.23348
pose 101 fitness = -6.20964
pose 102 fitness = -6.20462
pose 103 fitness = -6.20462
pose 104 fitness = -6.17318
pose 105 fitness = -6.17109
pose 106 fitness = -6.17109
pose 107 fitness = -6.17027
pose 108 fitness = -6.03777
pose 109 fitness = -6.02357
pose 110 fitness = -5.9464
pose 111 fitness = -5.93255
pose 112 fitness = -5.91588
pose 113 fitness = -5.90163
pose 114 fitness = -5.8247
pose 115 fitness = -5.81078
pose 116 fitness = -5.79266
pose 117 fitness = -5.76508
pose 118 fitness = -5.61932
pose 119 fitness = -5.58421
pose 120 fitness = -5.57815
pose 121 fitness = -5.57396
pose 122 fitness = -5.52746
pose 123 fitness = -5.52132
pose 124 fitness = -5.52095
pose 125 fitness = -5.48393
pose 126 fitness = -5.48362
pose 127 fitness = -5.4445
pose 128 fitness = -5.44052
pose 129 fitness = -5.38823
pose 130 fitness = -5.38804
pose 131 fitness = -4.80782
pose 132 fitness = -4.78355
pose 133 fitness = -4.7632
pose 134 fitness = -4.71859

pose 135 fitness = -4.71665
pose 136 fitness = -4.69844
pose 137 fitness = -4.68896
pose 138 fitness = -4.68886
pose 139 fitness = -4.67658
pose 140 fitness = -4.67452
pose 141 fitness = -4.66461
pose 142 fitness = -4.65243
pose 143 fitness = -4.59027
pose 144 fitness = -4.56608
pose 145 fitness = -4.30761
pose 146 fitness = -4.2972
pose 147 fitness = -3.60815
pose 148 fitness = -3.48208
pose 149 fitness = -2.85814

Refining candidate poses

Clustering the final poses : 47 final
unique configurations

Number of local searches that
succeeded in locating new minima
= 2

Re-clustering the final poses : 47 final
unique configurations

Best Ligand Pose : energy = -7.94787
kcal/mol

Docking run: elapsed time = 3931
seconds

Anexo 2: Relatórios de Verificação de Estrutura Secundária:

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 11:51:43
Finish Time: 2006-07-30 11:52:58
Execution Time: 00:01:15
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 68.9
Verify Expected High Score= 71.0722
Verify Expected Low Score= 31.9825

Input Files

[1^LU_TAR_HOH_ion.msv](#)
[1^LU_TAR_HOH_ion.pdb](#)
[Protocol.pr.xml](#)

Parameters

Protein Structure = '1ALU_TAR_HOH_ion'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'Kabsch-Sander'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 11:57:27
Finish Time: 2006-07-30 11:58:37
Execution Time: 00:01:10
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[1ALU_TAR_HOH_ion.msv](#)
[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 59.74
Verify Expected High Score= 71.0722
Verify Expected Low Score= 31.9825

Input Files

[1ALU_TAR_HOH_ion.msv](#)
[1ALU_TAR_HOH_ion.pdb](#)
[Protocol.pr_xml](#)

Parameters

Protein Structure = '1ALU_TAR_HOH_ion'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'PDB'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 04:44:37
Finish Time: 2006-07-30 04:45:58
Execution Time: 00:01:21
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[1H1D_SAM_HOH_ion.msv](#)
[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 105.22
Verify Expected High Score= 96.6583
Verify Expected Low Score= 43.4963

Input Files

[1H1D_SAM_HOH_ion.msv](#)
[1H1D_SAM_HOH_ion.pdb](#)
[Protocol.pr.xml](#)

Parameters

Protein Structure = '1H1D_SAM_HOH_ion'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'Kabsch-Sander'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 12:08:07
Finish Time: 2006-07-30 12:09:38
Execution Time: 00:01:31
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[1H1D.msv](#)
[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 97.89
Verify Expected High Score= 96.6583
Verify Expected Low Score= 43.4963

Input Files

[1H1D.msv](#)
[1H1D.pdb](#)
[Protocol.pr_xml](#)

Parameters

Protein Structure = '1H1D'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'PDB'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 07:41:07
Finish Time: 2006-07-30 07:43:57
Execution Time: 00:02:50
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[2BXR\(A\).msv](#)
[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 222.87
Verify Expected High Score= 203.133
Verify Expected Low Score= 91.4097

Input Files

[2BXR\(A\).msv](#)
[2BXR\(A\).pdb](#)
[Protocol.pr_xml](#)

Parameters

Protein Structure = '2BXR(A)'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'Kabsch-Sander'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 11:29:05
Finish Time: 2006-07-30 11:34:41
Execution Time: 00:05:36
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[2BXR.msv](#)

[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 407.57
Verify Expected High Score= 408.524
Verify Expected Low Score= 183.836

Input Files

[2BXR.msv](#)

[2BXR.pdb](#)

[Protocol.pr.xml](#)

Parameters

Protein Structure = '2BXR'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'PDB'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 04:29:30
Finish Time: 2006-07-30 04:31:03
Execution Time: 00:01:33
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[1H1D_SAM +TAR_HOH_ion.msv](#)
[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 105.22
Verify Expected High Score= 96.6583
Verify Expected Low Score= 43.4963

Input Files

[1H1D_SAM +TAR_HOH_ion.msv](#)
[1H1D_SAM +TAR_HOH_ion.pdb](#)
[Protocol.pr.xml](#)

Parameters

Protein Structure = '1H1D_SAM +TAR_HOH_ion'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'Kabsch-Sander'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 09:44:45
Finish Time: 2006-07-30 09:46:23
Execution Time: 00:01:38
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[1H1D_SAM +TAR_HOH_ion.msv](#)
[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 97.89
Verify Expected High Score= 96.6583
Verify Expected Low Score= 43.4963

Input Files

[1H1D_SAM +TAR_HOH_ion.msv](#)
[1H1D_SAM +TAR_HOH_ion.pdb](#)
[Protocol.pr_xml](#)

Parameters

Protein Structure = '1H1D_SAM +TAR_HOH_ion'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'PDB'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 07:49:45
Finish Time: 2006-07-30 07:52:14
Execution Time: 00:02:29
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[2BXR\(A\)+TAR.msv](#)
[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 222.87
Verify Expected High Score= 203.133
Verify Expected Low Score= 91.4097

Input Files

[2BXR\(A\)+TAR.msv](#)
[2BXR\(A\)+TAR.pdb](#)
[Protocol.pr_xml](#)

Parameters

Protein Structure = '2BXR(A)+TAR'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'Kabsch-Sander'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

Verify Protein

Information

Name: Verify Protein
Status: Success
Start Time: 2006-07-30 09:37:19
Finish Time: 2006-07-30 09:39:50
Execution Time: 00:02:31
User: Guilherme de Souza L
System: localhost (Windows32)

Output Files

[2BXR\(A\)+TAR.msv](#)
[Output.log](#)

Summary

Verify Score= 204.01
Verify Expected High Score= 203.133
Verify Expected Low Score= 91.4097

Input Files

[2BXR\(A\)+TAR.msv](#)
[2BXR\(A\)+TAR.pdb](#)
[Protocol.pr_xml](#)

Parameters

Protein Structure = '2BXR(A)+TAR'
Smooth Window Size = '10'
Secondary Structure Method = 'PDB'
Selected Residues Only = 'False'
Save Intermediate Files = 'False'

ANEXO 3: DESCRIÇÃO RUDIMENTAR DAS PROTEÍNAS

As Proteínas:

- São as macromoléculas mais importantes → Possuem as estruturas mais complexas e desempenham inúmeras funções.
- Pertencem à classe dos PEPTÍDEOS, pois são formadas por aminoácidos ligados entre si por LIGAÇÕES PEPTÍDICAS .
- Entre os peptídeos, formam a sub-classe dos POLIPEPTÍDEOS, pois são macromoléculas formadas por seqüências de 200 ou mais resíduos de aminoácidos .

Funções das Proteínas

- As proteínas exercem na célula uma grande variedade de funções, que podem ser divididas em 2 grupos:
 - Dinâmicas → Transporte, defesa, catálise de reações, controle do metabolismo e contração.
 - Estruturais → Proteínas como o colágeno e elastina, por exemplo, que promovem a sustentação estrutural da célula e dos tecidos.

A Ligação Peptídica

- Ocorre entre os grupamentos amina e carboxila ligados ao carbono alfa dos aminoácidos, com a saída de uma molécula de água .
- As ligações peptídicas possuem propriedades especiais, tais como um caráter de dupla ligação parcial, rígida e planar, e configuração quase sempre "TRANS".
- Apesar disso, o peptídeo tem grande mobilidade rotacional, pois as ligações entre o carbono alfa do resíduos do aminoácido e seus radicais carboxila e amina possuem giro livre sobre seus eixos:
 - Ligação ψ (psi) → Entre o carbono alfa e o carbono da carbonila.
 - Ligação ϕ (phi) → Entre o carbono alfa e o nitrogênio do grupamento amina .

Classificação das Proteínas:

- Quanto a Composição:
 - Proteínas Simples → Por hidrólise liberam apenas aminoácidos.
 - Proteínas Conjugadas → Por hidrólise liberam aminoácidos mais um radical não peptídico, denominado GRUPO PROSTÉTICO. Ex: Metaloproteínas, Hemoproteínas, Lipoproteínas, Glicoproteínas, etc.
- Quanto ao Número de Cadeias Polipeptídicas:
 - Proteínas Monoméricas → Formadas por apenas uma cadeia polipeptídica .
 - Proteínas Oligoméricas → Formadas por mais de uma cadeia polipeptídica. São as proteínas de estrutura e função mais complexas
- Quanto à Forma:
 - Proteínas Fibrosas → De estrutura espacial mais simples .
 - Proteínas Globulares → De estrutura espacial mais complexa.

Proteínas Homólogas:

- São proteínas que desempenham a mesma função em tecidos ou em espécies diferentes .
- Estas proteínas possuem pequenas diferenças estruturais, reconhecíveis imunologicamente.
- Os segmentos com seqüências diferentes de aminoácidos em proteínas homólogas são chamados "SEGMENTOS VARIÁVEIS", e geralmente não participam diretamente da atividade da proteína.
- Os segmentos idênticos das proteínas homólogas são chamados "SEGMENTOS FIXOS", e são fundamentais para o funcionamento bioquímico da proteína .

Organização Estrutural das Proteínas:

- As proteínas possuem complexas estruturas espaciais, que podem ser organizadas em 4 níveis, crescentes em complexidade:

1. Estrutura Primária:

- Dada pela SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E LIGAÇÕES PEPTÍDICAS da molécula → Esqueleto Covalente da molécula.
- É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula .
- Pode variar em 3 aspectos, definidos pela informação genética da célula:
 1. Número de aminoácidos
 2. Seqüência de aminoácidos
 3. Natureza dos aminoácidos
- A estrutura primária da proteína resulta em uma longa cadeia de aminoácidos semelhante a um "colar de contas", com uma extremidade "AMINO- TERMINAL" e uma extremidade "CARBOXI-TERMINAL"
- A estrutura primária de uma proteína é destruída por HIDRÓLISE química ou enzimática das ligações peptídicas, com liberação de peptídeos menores e aminoácidos livres .

2. Estrutura Secundária:

- É dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na seqüência primária da proteína.
- É o último nível de organização das proteínas fibrosas, mais simples estruturalmente .
- Ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos α dos aminoácidos e seus grupamentos amina e carboxila.
- O arranjo secundário de um polipeptídeo pode ocorrer de forma regular; isso acontece quando os ângulos das ligações entre carbonos α e seus ligantes são iguais e se repetem ao longo de um segmento da molécula.
- São 2 os tipos principais de arranjo secundário regular:
 - a. α - Hélice:
 - É a forma mais comum de estrutura secundária regular.
 - Caracteriza-se por uma hélice em espiral formada por 3,6 resíduos de aminoácidos por volta.
 - As cadeias laterais dos aminoácidos se distribuem para fora da hélice, evitando assim o impedimento estérico .
 - A principal força de estabilização da α - Hélice é a ponte de hidrogênio.
 - Folha - β :

- Ou folha pregueada, ou ainda estrutura - β .
 - Ao contrário da α - Hélice, a folha - β envolve 2 ou mais segmentos polipeptídicos da mesma molécula ou de moléculas diferentes, arranjados em paralelo ou no sentido anti-paralelo.
 - Os segmentos em folha - β da proteína adquirem um aspecto de uma folha de papel dobrada em pregas .
 - As pontes de hidrogênio mais uma vez são a força de estabilização principal desta estrutura .
 - **Estrutura Secundária Não Repetitiva:**
 - Em média cerca de 50% da estrutura de uma proteína globular está em α - hélice ou em folha - β .
 - O restante da molécula assume uma estrutura secundária não repetitiva, menos regular que as acima citadas.
 - **Estruturas Supersecundárias:**
 - Estruturas que resultam da combinação de segmentos com arranjo secundário em "MOTIVOS", longos padrões que se repetem ao longo de uma proteína .
 - São exemplos mais comuns de motivos supersecundários a "chave grega", os segmentos hélice-volta-hélice, as unidades β - α - β , etc.
3. **Estrutura Terciária:**
- Dada pelo arranjo espacial de aminoácidos distantes entre si na seqüência polipeptídica .
 - É a forma tridimensional como a proteína se "enrola".
 - Ocorre nas proteínas globulares, mais complexas estrutural e funcionalmente.
 - A estrutura terciária de uma proteína é determinada e estabilizada por fatores primários como:
 - Resíduos de prolina → Interrompem estruturas secundárias regulares, causando dobras na molécula .
 - Impedimento estérico → cadeias laterais muito grandes que precisam se "acomodar" no espaço .
 - Pontes dissulfeto → Ligações covalentes entre radicais sulfidríla de resíduos de cisteína, formando um resíduo de CISTINA .
 - Pontes de hidrogênio .
 - Interações hidrofóbicas → Tendência dos aminoácidos com radical "R" apolar de se acomodar no interior de uma estrutura dobrada, "fugindo" do contato com a água.
 - Interações iônicas → Forças de atração entre aminoácidos com radicais "R" carregados com cargas opostas .
 - Cadeias polipeptídicas muito longas podem se organizar em DOMÍNIOS, regiões com estruturas terciárias semi-independentes ligadas entre si por segmentos lineares da cadeia polipeptídica.
 - Os domínios são considerados as unidades funcionais e de estrutura tridimensional de uma proteína .
4. **Estrutura Quaternária:**
- Surge apenas nas proteínas oligoméricas.
 - Dada pela distribuição espacial de mais de uma cadeia polipeptídica no espaço, as subunidades da molécula.

- Estas subunidades se mantêm unidas por forças covalentes, como pontes dissulfeto, e ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc.
- As subunidades podem atuar de forma independente ou cooperativamente no desempenho da função bioquímica da proteína.

• **Processo de Enovelamento das Proteínas**

- O enovelamento das proteínas é um processo que depende da participação de outras proteínas muito especializadas, a saber:
 - Cis-Trans-Protil Isomerasas → Enzimas que catalisam a conversão entre ligações cis e trans de resíduos de prolina, buscando uma configuração adequada destas ligações.
 - Proteína-Dissulfeto Isomerasas → Facilitam o arranjo ideal das ligações dissulfeto, estabilizando-as.
 - Chaperonas → proteínas que participam do processo de enovelamento das cadeias polipeptídicas logo após a sua biossíntese no ribossomo.
- O resultado da atuação destas proteínas e das forças de estabilização de estrutura terciária já citados acima, garantem a formação de estruturas espaciais estáveis mas dinâmicas, essenciais para o desempenho funcional das proteínas.