

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO ENTRE NOVAS
BASES DE TRÖGER FLUORESCENTES E O OLIGONUCLEOTÍDEO
(B-DNA) VIA DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR**

TIAGO ESPINOSA DE OLIVEIRA

Porto Alegre, julho de 2012.

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

TIAGO ESPINOSA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO ENTRE NOVAS
BASES DE TRÖGER FLUORESCENTES E O OLIGONUCLEOTÍDEO
(B-DNA) VIA DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Valter Stefani

Orientador

Prof. Dr. Paulo A. Netz

Colaborador

Porto Alegre, julho de 2012.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre março/2010 e julho/2012, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Valter. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Hermes Luís Neubauer de Amorim

Prof. Dr. Paolo Roberto Livotto

Prof. Dr. Eduardo Rolim de Oliveira

Prof. Dr. Valter Stefani

Aos meus pais, minha esposa e minhas filhas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo apoio, durante toda minha vida, tornando possível que minha insaciável curiosidade e vontade pela busca de novos experimentos fossem possível. A minha esposa e minhas filhas pela paciência e apoio em todos os momentos difíceis ou cotidianos. Buscaram estar comigo, mesmo quando minha ausência muitas vezes era necessária.

Ao meu orientador, Professor Doutor Valter Stefani, o qual seu apoio e confiança, em meu potencial e trabalho, tornaram possível todo meu caminhar nessa etapa acadêmica. Apostou em minha capacidade de andar com minhas próprias pernas, deixando-me livre para as escolhas.

A colaboração e co-orientação, do Professor Doutor Paulo A. Netz, que sempre se mostrou disponível para dar contribuições compartilhando seu conhecimento e opiniões.

Aos colegas de laboratório (LNMO), Daniela, Fabiano e Ricardo, sempre dispostos a ajudar e contribuir no que fosse preciso. E também aos demais colegas do laboratório pelo bom ambiente de pesquisa.

Todos os colegas do grupo de Química Teórica (GQT) em especial ao bom amigo que fiz Rodrigo e ao grande amigo que reencontrei Fábio, pelos bons momentos de convivência, discussões e descontração que tivemos.

Ao meu irmão Tobias e a meu primo, quase irmão, Ariel pelas discussões e bons momentos de descontração que tivemos durante todo esse tempo.

RESUMO

Nesse trabalho, o docking e a dinâmica molecular foram utilizados como métodos de investigação das formas de interação entre um oligonucleotídeo de B-DNA e duas novas Bases de Tröger fluorescentes, com o propósito de verificar sua potencialidade como sondas biológicas. Para o docking molecular foi utilizado o protocolo descrito por *Ricci et. al.* (2009), que demonstrou ser um método promissor para reconhecer os modos de ligação e descrever a interação entre as Bases de Tröger e os oligonucleotídeos. Os complexos obtidos a partir dos docking foram utilizados como ponto de partida para as simulações de dinâmica molecular usando o programa GROMACS e o campo de força AMBER03, como descrito por *Ricci et. al.* (2010). A análise dos resultados das simulações mostraram a possibilidade, de que as Bases de Tröger podem interagir de maneiras diferentes com o oligonucleotídeo com preferência pela interação com sulco menor desse receptor. Durante todas as simulações os ligantes mantiveram-se com uma forte interação com o oligonucleotídeo, sem causar a desnaturação do mesmo. Globalmente, os resultados sugerem que as Bases de Tröger podem interagir com o sulco menor do oligonucleotídeo mas também são capazes de interagir como intercaladores. Devido as fortes interações, e também as propriedades fotofísicas (das Bases de Tröger propostas nesse trabalho), essas moléculas podem atuar como possíveis sondas biológicas.

Palavras chave: *Docking molecular, dinâmica molecular, Bases de Tröger.*

ABSTRACT

In this work, docking and molecular dynamics simulations were used to investigate the interaction between a B-DNA oligonucleotide and two fluorescent Tröger's bases, in order to verify their potential use as biological probes. For dockings was used protocol described by Ricci et. al. (2009), which proved to be a promising method to recognize the binding modes and describe the interaction between this class of compounds and the oligonucleotide. The complexes obtained from dockings were used as starting point for molecular dynamics simulations using GROMACS and the AMBER03 Force Field, as described by Ricci et. al. (2010). The analyzes of the simulation results showed the possibility that the Tröger Bases can interact in different ways with the oligonucleotide, with some preference for this receptor's minor groove. During all simulations the ligands have maintained a strong interaction with the oligonucleotide, without causing denaturation of the same. Overall, the results suggest that Tröger's Bases may interact with the minor groove of olinucleotide but are also able to interact as an intercalator, depending upon the substituents present. Due to the strong interactions, and also the peculiar photophysical properties, this class of molecules may act as a potential DNA probe.

Key words: *molecular docking, molecular dynamics, Tröger's bases.*

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Base nitrogenada Adenina
ACPYPE	AnteChamber Python Parser Interface
ADT	AutoDockTools
BT	Bases de Tröger
C	Base nitrogenada Citosina
DM	Dinâmica Molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G	Base nitrogenada Guanina
GAFF	Generalized Amber Force Field
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
LT	Ligante – Base de Tröger com substituinte nitro
PDB	Protein Data Bank
PT	Ligante – Base de Tröger com anel de piridina
RHF	Hartree-Fock Restrito
T	Base nitrogenada Timina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GERAL.....	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3	BASES DE TRÖGER	4
3.1	HISTÓRICO	4
3.2	SÍNTESE DAS BASES DE TRÖGER.....	5
3.3	APLICAÇÕES DAS BASES DE TRÖGER	9
3.4	INTERAÇÕES COM O DNA	11
4	DNA	14
4.1	HISTÓRICO	14
4.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	14
4.3	ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE DNA.....	15
4.4	FORMAS DE INTERAÇÃO LIGANTE – DNA.....	22
5	DOCKING MOLECULAR.....	25
6	DINÂMICA MOLECULAR	27
7	METODOLOGIA	30
7.1	CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES	30
7.2	OLIGONUCLEOTÍDEO.....	30
7.3	DOCKING MOLECULAR	32
7.4	DINÂMICA MOLECULAR	32
8	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
8.1	DOCKING MOLECULAR	34
8.2	DINÂMICA MOLECULAR	37
8.2.1	Análise visual da trajetória.....	37

8.2.2	Desvio quadrático médio (RMSD)	41
8.2.3	Número de Pares de Bases	43
8.2.4	Análise das distorções do oligonucleotídeo	45
9	CONCLUSÕES	54
	REFERENCIAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do composto sintetizado por J. Tröger.....	1
Figura 2: Formas enantioméricas de análogos das BT, simétricas, com substituintes de proflavina.....	2
Figura 3: Reação de síntese original de TRÖGER.....	4
Figura 4: Formas enantioméricas da Base de Tröger.....	4
Figura 5: Fórmula estrutural genérica das Bases de Tröger (BT).....	5
Figura 6: Etapas propostas por Wagner para a formação das BT.....	5
Figura 7: Síntese proposta por Webb e seus colaboradores. As diaminas foram preparadas pela reação de derivados do anidrido isatóico, com toluidina em etanol, seguida pela redução das 2-aminobenzamidas.....	6
Figura 8: Reação de Bag <i>et al</i> , utilizando dimetóxi-metano em presença de ácido metano-sulfônico.....	6
Figura 9: Aproveitando as posições fixas dos bromos no precursor, Jesen <i>et. al.</i> , introduziram grupos regioseletivamente nas posições 2- e 8- via dupla troca de bromo-lítio.....	7
Figura 10: Reação proposta por Abonia e seus colaboradores.....	7
Figura 11: Síntese realizada pelo grupo de Carrée em 2003 utilizando das propriedades de análogos da aminocridina para obtenção de novas BT.....	8
Figura 12: Síntese de Abella <i>et. al.</i> ; X = S, O e NH.....	8
Figura 13: Reação catalisada por líquidos iônicos.....	9
Figura 14: Síntese utilizando superácidos para adição de grupos ao anel aromático das BT. ...	9
Figura 15: Composto macrocíclico derivado de análogos das BT solúvel em água capaz de interagir com terpenos.....	10
Figura 16: Receptor sintético análogo das BT contendo grupos carboxílicos capazes de formar quatro ligações de hidrogênio simultaneamente.....	10
Figura 17: BT complexada com metais (M = Rh, Ir) utilizada em catálise assimétrica.....	11
Figura 18: BT com atividade biológica capaz de inibir alguns problemas circulatórios e infarto.....	11

Figura 19: BT que interagem com o DNA. (a) Base de Tröger simétrica com dois substituintes de fenantrolina; (b) Base de Tröger simétrica com dois substituintes de proflavina; (c) Base de Tröger assimétrica com um substituinte de proflavina e outro de fenantrolina.	12
Figura 20: Síntese de novas BT fluorescentes, a partir de análogos da 4-amino-1,8-naftalimidaz.	13
Figura 21: Imagem celular (24h após os compostos localizarem-se no núcleo); (A) Imagem normal; (B) Imagem fluorescente células marcadas com os compostos 1, 2 e 3 (10µM); (C) Células marcadas com iodeto de propídio.....	13
Figura 22: Imagem de difração de raios X da dupla hélice do DNA.....	14
Figura 23: Bases Nitrogenadas formadoras dos ácidos nucleicos - (C) Citosina; (T) Timina; (A) Adenina e (G) Guanina.	15
Figura 24: Estrutura do nucleotídeo: Base nitrogenada, açúcar e fosfato.....	15
Figura 25: A cadeia de nucleotídeo mostrando os terminais 5' e 3'.....	16
Figura 26: Um fragmento de dinucleotídeo com Citosina e Guanina. No esqueleto (cadeia) estão marcados os seguintes ângulos: $\alpha = O3'-P-O5'-C5'$; $\beta = P-O5'-C5'-C4'$; $\gamma = O5'-C5'-C4'-C3'$; $\delta = C5'-C4'-C3'-O3'$; $\epsilon = C4'-C3'-O3'-P$; $\zeta = C3'-O3'-P-O5'$; $\chi = O4'-C1'-N9-C4$ (citosina); $\chi = O4'-C1'-N1-C2$ (guanina).	17
Figura 27: Interações entre os pares de bases. AT formação de duas ligações de hidrogênio entre as bases Adenina e Timina; GC formação de três ligações de hidrogênio entre as bases Guanina e Citosina.	18
Figura 28: Parâmetros Rotacionais envolvendo dois pares de bases, Tip e Inclination são movimentos coordenados nos eixos y e x, respectivamente. Opening(eixo z), Propelle Twist (eixo y), Buckle(eixo x), Twist (eixo z), Roll(eixo y) e Tilt (eixo x)são movimentos opostos.	19
Figura 29: Parâmetros Translacionais envolvendo dois pares de bases, y displacente x displacentsão movimentos coordenados nos eixos y e x, respectivamente. Stagger (eixo z), Stretch (eixo y), Shear (eixo x), Rise (eixo z), Slide (eixo y) e Shift (eixo x) são movimentos opostos.....	20

Figura 30: Algumas estruturas de diferentes estruturas de ácidos nucléicos bem caracterizadas. a) dodecâmero B-DNA (pdb:1BNA); b) octâmero A-DNA (pdb:2ANA); c) hexâmero Z-DNA (pdb:1DCG); d) tetraplex guanina DNA (pdb:1JPQ).....	21
Figura 31: Regiões (sulco maior e sulco menor) em uma estrutura do oligômero de B-DNA.	22
Figura 32: Formas de interação; A) intercalação; B) interação mista; C) interação na forma de sulco.	22
Figura 33: Típicos intercaladores de DNA. a) 9-aminoacridina conhecida pelas suas propriedades, anti-séptica, sua atividade mutagênica, altamente fluorescente e indicador de pH intracelular ; b) elipticina conhecida por ser um agente antineoplásico.	23
Figura 34: Ligante capaz de interagir com o sulco menor, Mitomicina possui atividade antibacteriana e é utilizado como medicamento quimioterápico.....	23
Figura 35: a) fórmula estrutural da daunomicina molécula de ação anticancerígena; b) estrutura cristalográfica (pdb: 1D11) da interação entre daunomicina e um oligômero de B-DNA interagindo de forma mista.....	24
Figura 36: Esquema de funcionamento do algoritmo genético no programa AutoDock 4.0..	26
Figura 37: a) estiramento de ligação; b) deformação angular; c) torções; d) interações diedrais impróprias.....	28
Figura 38: Fórmula estrutural generalizada dos ligantes: LT e PT.....	30
Figura 39: Ligantes LT e PT otimizados.....	30
Figura 40: a direita estrutura do oligômero de B-DNA construído no programa X3DNA modificado com um <i>gap</i> entre os pares AT e AT; à esquerda esquema genérico das fitas A e B destacado em amarelo a posição do <i>gap</i> artificial.	31
Figura 41: Perfis dos clusters dos dockings realizados. Cada cluster é representado por uma barra em que a altura corresponde ao número de conformações com posições e energias de ligações semelhantes. As cores representam os diferentes ligantes analisados: <i>verde (LT)</i> e <i>vermelho (PT)</i> . As letras <i>a, b, c, d</i> , representam os complexos analisado e selecionados para a DM.	34
Figura 42: Complexos a (-10,88kcal/mol) e b (-10,70kcal/mol) com as conformações com energia de interação mais negativas interagindo com o sulco menor do oligômero de B-DNA com <i>gap</i>	35

Figura 43: Complexos c (-10,57kcal/mol) e d (-10,55kcal/mol) com as conformações com energia de interação mais negativas interagindo com o sulco menor do oligômero de B-DNA com gap.	36
Figura 44: Frames de simulação de DM do complexo a, partindo da estrutura <i>docada</i> interagindo com o sulco menor para uma forma intercalada.	38
Figura 45: Frames de simulação de DM do complexo b, partindo da estrutura <i>docada</i> interagindo com o sulco menor, onde continua interagindo.	39
Figura 46: Frames de simulação de DM do complexo c, partindo da estrutura <i>docada</i> interagindo com o sulco menor, onde continua interagindo.	40
Figura 47: Frames de simulação de DM do complexo d, partindo da estrutura <i>docada</i> interagindo com o sulco menor, onde continua interagindo.	41
Figura 48: Gráficos de RMSD (desvio médio quadrático). As linhas <i>pretas</i> representam os dados do DNA isolado e sua respectiva média; as linhas <i>vermelhas</i> representam os dados referentes os complexos a, b, c e d; e as linhas <i>verdes</i> representam o momento onde as estruturas atingem a estabilidade.	42
Figura 49: Número de pares de bases ao longo da simulação para os oligonucleotídeos presentes nos complexos a, b, c e d. Os pares de bases canônicos são mostrados em <i>preto</i> , e os pares de bases não canônicos (não Watson-Crick ³⁹) são mostrados em <i>vermelho</i>	44
Figura 50: Parâmetros de distorções de pares de bases, propostos por convenção por Dickerson <i>et. al.</i>	45
Figura 51: Descrição dos passos da dupla hélice – <i>GATC</i> , <i>AATT</i> , <i>ATAT</i> e <i>TTAA</i> – os quais os parâmetros de distorções do oligonucleotídeo foram analisados durante a simulação.	46
Figura 52: valores de Twist para o oligômero nas simulações dos complexos a, b, c e d, representados nos gráficos a, b, c, e d, respectivamente. Os passos da dupla hélice analisados estão representados pelas seguintes cores: <i>GATC</i> , <i>AATT</i> , <i>ATAT</i> , <i>TTAA</i>	47
Figura 53: valores de Rise para o oligômero nas simulações dos complexos a, b, c e d, representados nos gráficos a, b, c, e d, respectivamente. Os passos da dupla hélice analisados estão representados pelas seguintes cores <i>GATC</i> , <i>AATT</i> , <i>ATAT</i> , <i>TTAA</i>	49

Figura 54: modelo das alterações estruturais do oligonucleotídeo na forma B (a) se transformando na forma A (d), após a aplicação uniforme de $-1,5\text{\AA}$ de Slide (b) e aplicação uniforme de $+12^\circ$ de Roll (c). 50

Figura 55: valores de Slide para o oligômero nas simulações dos complexos a, b, c e d, representados nos gráficos a, b, c, e d, respectivamente. Os passos da dupla hélice analisados estão representados pelas seguintes cores: *GATC*, *AATT*, *ATAT*, *TTAA*..... 51

Figura 56: As imagens são baseadas em uma estrutura cristalográfica de B-DNA; em vermelho uma curvatura para dentro do sulco maior – Roll positivo; em azul curvatura para dentro do sulco menor – Roll negativo. 52

Figura 57: valores de Roll para o oligômero nas simulações dos complexos a, b, c e d, representados nos gráficos a, b, c, e d, respectivamente. Os passos da dupla hélice analisados estão representados pelas seguintes cores: *GATC*, *AATT*, *ATAT*, *TTAA*..... 53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Droga, aplicação e modo de interação de alguns ligantes de DNA	24
Tabela 2: Resultados para os dockings dos ligantes LT e PT com o oligonucleotídeo de B-DNA com gap.....	34
Tabela 3: Resultados estatísticos das análises dos gráficos de RMSD das simulações.....	43
Tabela 4: Valores médios de Twist dos passos de dupla hélice <i>GATC</i> , <i>AATT</i> , <i>ATAT</i> , <i>TTAA</i> ..	47
Tabela 5: Valores médios de Rise (medidos em Å) dos passos de dupla hélice <i>GATC</i> , <i>AATT</i> , <i>ATAT</i> , <i>TTAA</i>	48
Tabela 6: Valores médios de Slide (Å) dos passos de dupla hélice <i>GATC</i> , <i>AATT</i> , <i>ATAT</i> , <i>TTAA</i>	50
Tabela 7: Valores médios de <i>Roll</i> dos passos de dupla hélice <i>GATC</i> , <i>AATT</i> , <i>ATAT</i> , <i>TTAA</i>	52

1 INTRODUÇÃO

No final no século XIX, o alemão Julius Tröger sintetizou um composto com características próprias (Figura 1) que deu origem a um grupo de compostos, chamados atualmente de Bases de Tröger, os quais suas aplicações são alvo de diversas pesquisas atualmente.

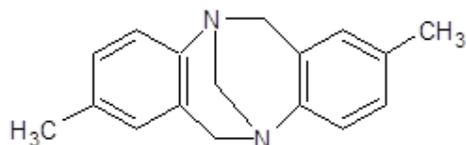


Figura 1: Estrutura do composto sintetizado por J. Tröger.

A estrutura do composto sintetizado por Tröger foi determinada por Spielman em 1935³. O composto apresentava uma estrutura na forma de “V” e rígida, com os anéis aromáticos planos e praticamente perpendiculares entre si.

As Bases de Tröger são moléculas quirais, por possuírem dois nitrogênios estereogênicos. Prelog, em 1944, determinou suas formas enantioméricas: (5S,11S)-(+) e (5R,11R)-(-).

Com o desenvolvimento das diversas áreas da biologia, bioquímica e biofísica, e a evolução do conhecimento do genoma de diferentes organismos e seus processos celulares, ocorreu um grande crescimento no interesse pelas moléculas capazes de interagir com o DNA, buscando as formas de síntese e a elucidação dos mecanismos de interação desses compostos.

As principais substâncias conhecidas, com capacidade de interagir com o DNA, não apresentam seletividade e são muito tóxicas, já os análogos das Bases de Tröger (BT) em alguns experimentos tem se mostrado capazes de interagir com o DNA, talvez pela sua geometria e características particulares, dando um caráter seletivo a esse tipo de ligante.

A partir de 1985, diversos pesquisadores têm trabalhado nesse campo de aplicação dos análogos das BT. O precursor nesses estudos foi Wilcox, que sintetizou e verificou a capacidade de análogos das Bases de Tröger interagir com derivados da biotina e adenina.

Em 1991, Yashima *et. et. al.* sintetizaram análogos das BT e verificaram, pela primeira vez, a capacidade desses compostos interagir de forma não covalente ao DNA. Esse foi o pontapé inicial para muitas investigações sobre a interação das BT com o DNA. Esse mesmo grupo sugeriu que o isômero levorrotatório (-)-(R,R) seria capaz de interagir com o oligonucleotídeos de B-DNA porque ambos possuem uma orientação de mão direita. Essa hipótese foi confirmada por *Tatibouët e seus colaboradores*. Essa seletividade foi confirmada experimentalmente pelos grupos de *Bailly(2000) e Baldeyrou (2002)*.

Posteriormente, outros grupos de pesquisa, utilizaram compostos conhecidos pela sua capacidade de interagir com o DNA (como a fenantrolina e proflavina) para sintetizar análogos das Bases de Tröger capazes de interagir com o DNA.

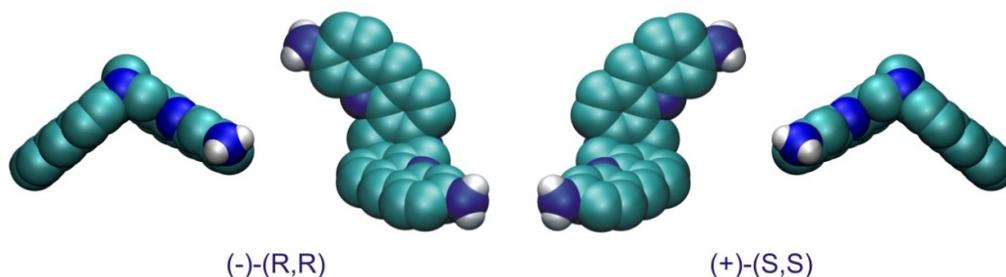


Figura 2: Formas enantioméricas de análogos das BT, simétricas, com substituintes de proflavina.

Outras aplicações das Bases de Tröger apresentam usos como catalisadores, ligantes quirais e diferentes atividades biológicas.

Dentre as diversas sínteses propostas na literatura, podem-se destacar as realizadas em 2004 por Abella *e.t al.* Esse grupo sintetizou novos análogos das bases de Tröger, com propriedades fluorescentes, os quais apresentaram um grande potencial para utilização como sondas biológicas.

No entanto a falta de dados experimentais torna de grande importância a elucidação dos mecanismos de interação moleculares envolvidos entre os derivados das BT com o DNA para determinar se há alguma seletividade no modo de interação entre essas estruturas. A estrutura em forma de “V” das BT e os diferentes substituintes podem estar diretamente ligados as formas de interações com o DNA, tornando esses ligantes e seus análogos substâncias capazes de interagir de forma seletiva e como marcadores de DNA em potencial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as formas de interação de derivados fluorescentes das *Bases de Tröger* com um fragmento de B-DNA (um dodecâmero, referido no trabalho simplesmente como “oligonucleotídeo”), investigando a estabilidade dos complexos e analisando a potencialidade de aplicação de tais compostos como sondas biológicas, via docking e dinâmica molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I) Obter a geometria de diferentes complexos de interação entre dois análogos de BT e o oligonucleotídeo de B-DNA, a partir da docking molecular, utilizando estes como pontos de partida para simulações de dinâmica molecular;

II) Analisar a estabilidade dos complexos obtidos através das simulações de dinâmica molecular;

III) Verificar as alterações estruturais, causadas pelas BT, no oligonucleotídeo;

IV) Avaliar o modo de interação entre os análogos das BT e o oligonucleotídeo, através dos dados obtidos nas simulações de dinâmica molecular para verificar sua potencial aplicação em meios biológicos.

3 BASES DE TRÖGER

3.1 HISTÓRICO

Em 1887, Carl Julius Ludwig Tröger, sintetizou o composto 2,8-dimetil-6H,12H-(5,11)-metanodibenzo[b,f][1,5]diazocina a partir da *p*-metilanilina e o formaldeído em presença de ácido clorídrico (Figura 3), sendo esse composto o precursor de uma nova classe de compostos conhecida como Bases de Tröger (BT).

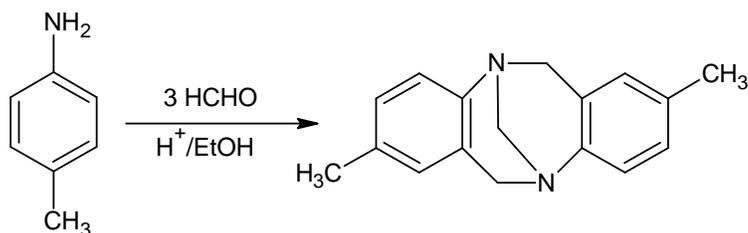


Figura 3: Reação de síntese original de TRÖGER.

A estrutura do composto sintetizado por Tröger foi proposto, após muitas controvérsias, por Spielman em 1935. A base de Tröger é uma molécula quiral, com eixo de simetria C_2 e teve suas formas enantioméricas, (5*S*,11*S*)-(+), e (5*R*,11*R*)-(-), determinadas por Vladimir Prelog (através de cromatografia em coluna de lactose hidratada) em 1944 (Figura 4).

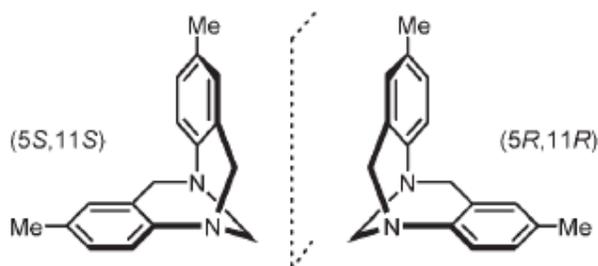


Figura 4: Formas enantioméricas da Base de Tröger.

As BT são compostos que apresentam suas estruturas em forma de *V* rígida com anéis aromáticos planos (Figura 5) onde o ângulo formado entre os planos das duas fenilas varia de acordo com os substituintes *R* variando com valores entre 92° - 104° (Larson e Wilcox – 1986).

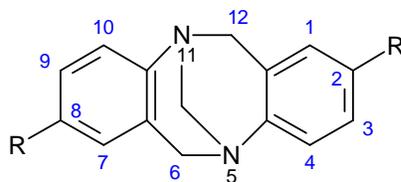


Figura 5: Fórmula estrutural genérica das Bases de Tröger (BT).

A configuração absoluta foi determinada em 1967 (Marson *et. al.*) por meio de dicroísmo circular das transições associadas com anéis aromáticos.

Em meados de 1985 (Wilcox e seus colaboradores), com o crescente interesse pela síntese de sistemas moleculares biomiméticos, as BT começam a receber uma maior atenção para tal aplicação porque sua estrutura quiral relativamente rígida contribui para construção desse tipo de sistema molecular.

3.2 SÍNTESE DAS BASES DE TRÖGER

A síntese pioneira envolve derivados da anilina com formaldeído em meio alcoólico promovida por um meio ácido, ilustrado na Figura 3. Meses depois das constatações de Spielman, Wagner (1954) propôs uma série de etapas para explicar tais reações (Figura 6).

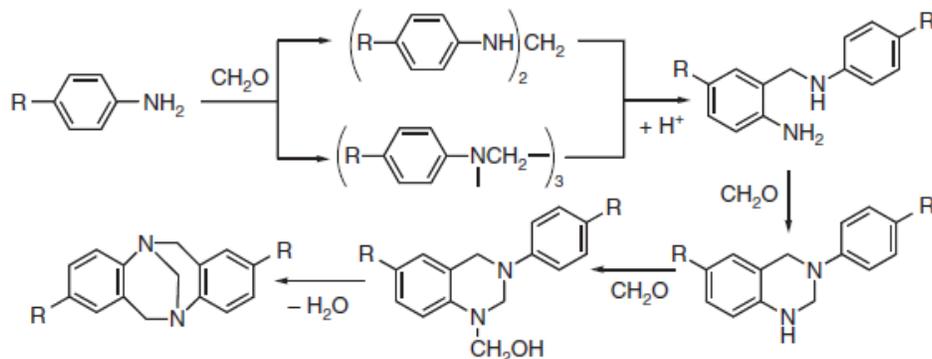


Figura 6: Etapas propostas por Wagner para a formação das BT.

O composto, inicialmente sintetizado por Tröger foi produzido por diversos autores nos anos seguintes, como por exemplo, Hesse e Hagel (1976). Outros autores relataram terem isolado compostos com grupos como $-NCH_2OH$ um dos precursores das BT. Tais eventos geraram muito interesse para um novo olhar aos mecanismos de reação de condensação entre derivados da amina e formaldeído.

A primeira publicação de uma síntese de análogos de BT polisubstituídos foi em 1948, por Smith e Schubert, na qual os autores relatam a necessidade de condições de reações com ácidos fortes para a formação de tais compostos.

De forma geral a preparação de análogos de BT é baseada em reações promovidas por meio ácido de aminas aromáticas com HCHO ou um aldeído equivalente, hexametileno-tetraamina ou dimetóxi-metano.

Algumas metodologias podem ser destacadas, demonstrando a evolução e as diferentes metodologias experimentais:

- Webb *et. al.* (1990) – possibilitaram a síntese de Bases de Tröger funcionalizadas assimétricas.

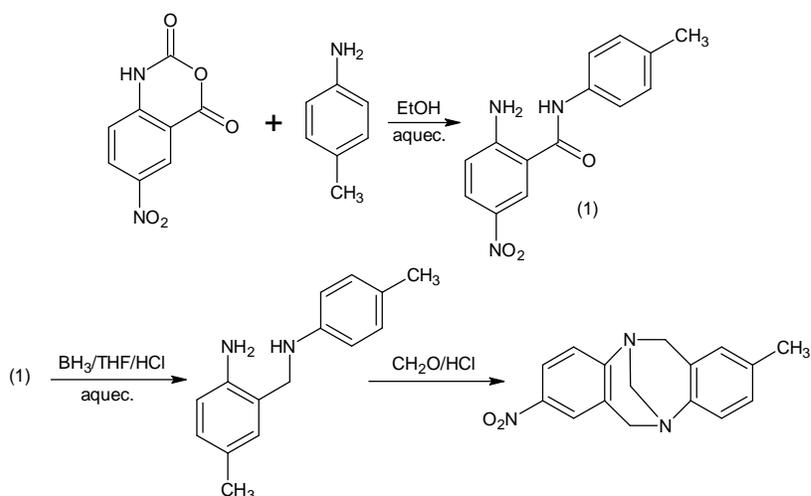


Figura 7: Síntese proposta por Webb e seus colaboradores. As diaminas foram preparadas pela reação de derivados do anidrido isatóico, com toluidina em etanol, seguida pela redução das 2-aminobenzamidas.

- Bag *et. al.* (1995) – utilização de solventes pouco polares e não hidroxílicos, o dimetóxi-metano foi utilizado como doador de CH₂, bem como, solvente da reação em presença de ácido metano-sulfônico.

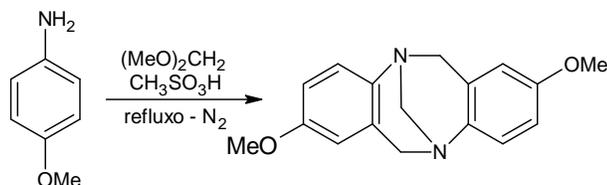


Figura 8: Reação de Bag *et al.*, utilizando dimetóxi-metano em presença de ácido metano-sulfônico.

- Jensen *et. al.* (2002) – determinaram uma nova alternativa para síntese de Bases de Tröger funcionalizadas, assimetricamente, pela adição de grupos funcionais nas posição 2- e 8-. Substituindo os grupos -Br, já existentes nas posições 2 e 8, por Lítio adicionando em seguida um eletrófilo.

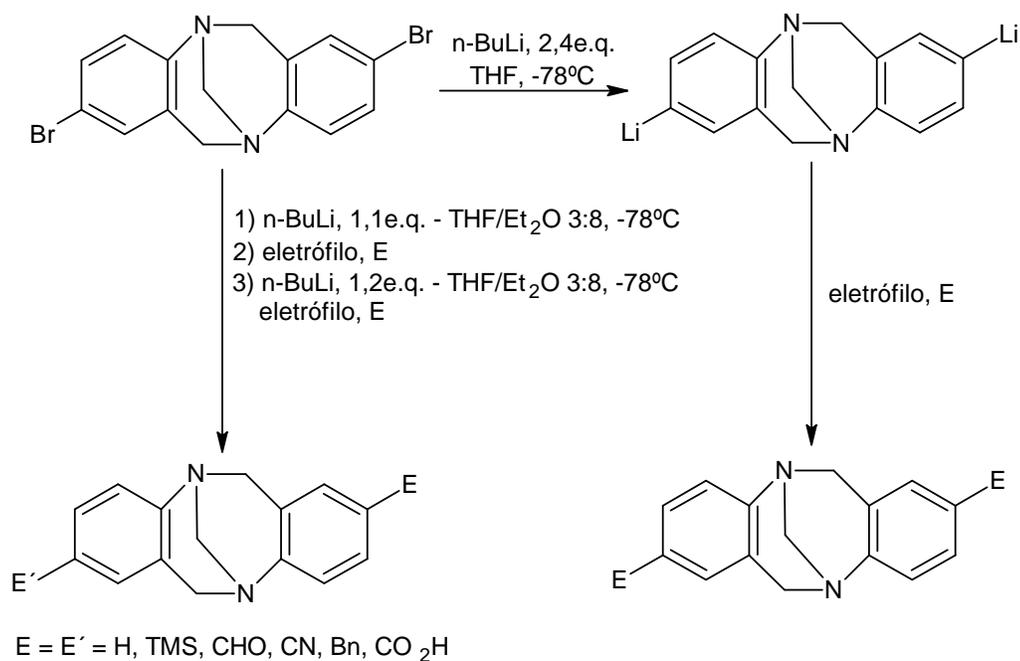


Figura 9: Aproveitando as posições fixas dos bromos no precursor, Jesen *et. al.*, introduziram grupos regioseletivamente nas posições 2- e 8- via dupla troca de bromo-lítio.

- Abonia *et. al.* (2002) – obtiveram um análogo da Base de Tröger a partir da pirazola.

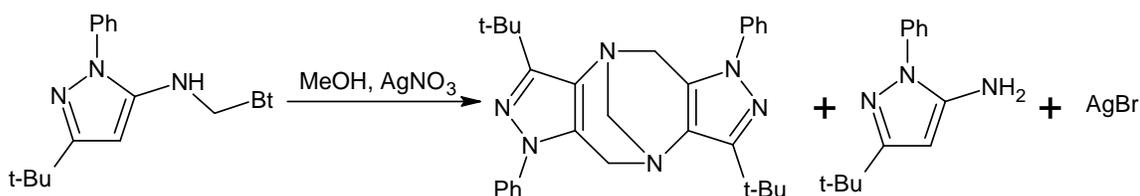


Figura 10: Reação proposta por Abonia e seus colaboradores.

- Carrée *et. al.* (2003) – estudaram a reatividade da 2-aminoacridina com formaldeído em ácido trifluoracético para obtenção de novos análogos da Base de Tröger.

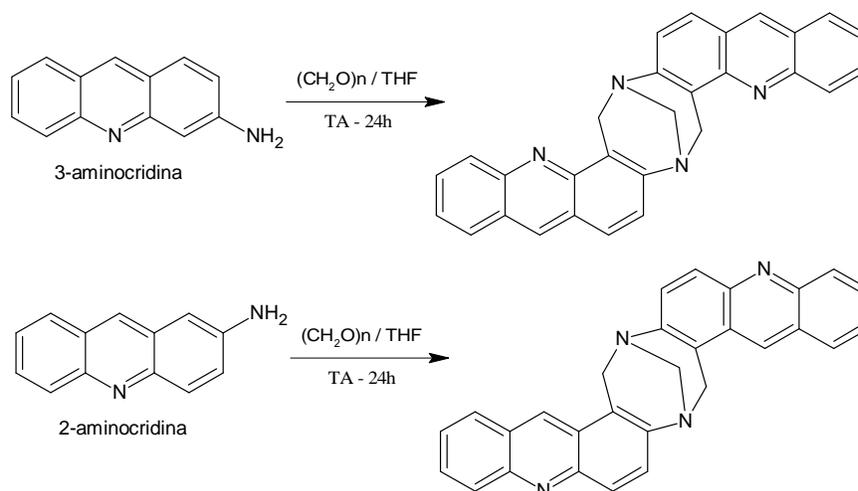


Figura 11: Síntese realizada pelo grupo de Carrée em 2003 utilizando das propriedades de análogos da aminocridina para obtenção de novas BT.

- Abella *et. al.* (2004) – juntamente com seus colaboradores, sintetizaram novos análogos das bases de Tröger fluorescentes, os quais apresentaram um grande potencial para utilização como sondas biológicas.

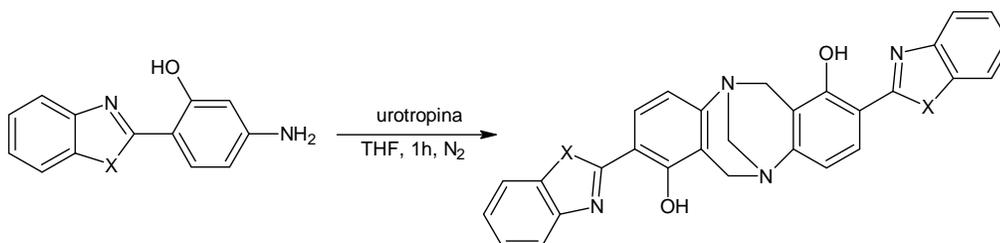


Figura 12: Síntese de Abella *et. al.*; X = S, O e NH.

- Wu *et. al.* (2007) – acrescentaram o uso de líquidos iônicos ($[\text{bpy}][\text{BF}_4]$) a síntese das bases de Tröger, juntamente com formaldeído e ácido clorídrico, obtendo rendimentos expressivos.

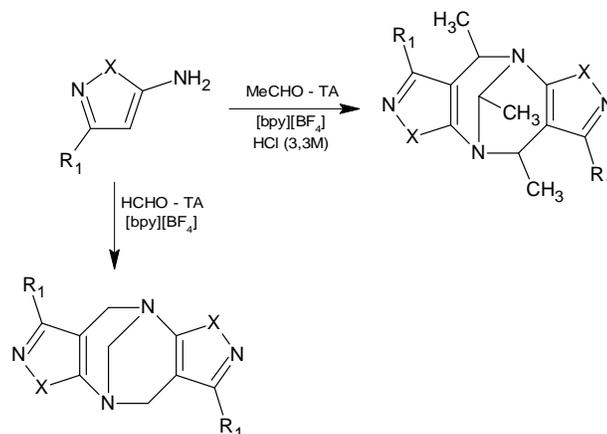


Figura 13: Reação catalisada por líquidos iônicos.

- Vardelle *et. al.* (2009) – utilizaram superácidos HF/SbF₃ como uma nova alternativa na síntese de novos análogos das bases de Tröger.

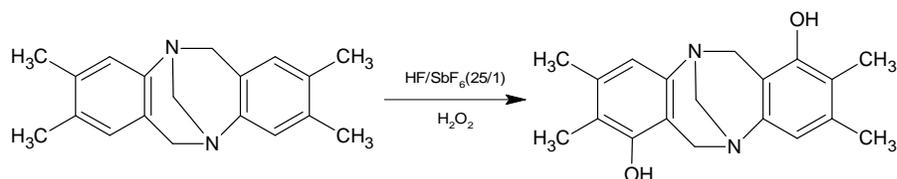


Figura 14: Síntese utilizando superácidos para adição de grupos ao anel aromático das BT.

3.3 APLICAÇÕES DAS BASES DE TRÖGER

Dentre as muitas aplicações dessa classe de compostos descritas na literatura, pode-se destacar:

- A utilização do enantiômero (5*R*,11*R*), sintetizado por Tröger (Figura 1), como *agente de solvatação quiral* para discriminação dos enantiômeros de hemiacetais cíclicos e acetais metílicos derivados de ácidos hidroxâmicos.
- A geometria única das BT tornou-as um grande atrativo para produção de compostos macrocíclicos receptores de moléculas orgânicas como terpenos e outros (Figura 15).

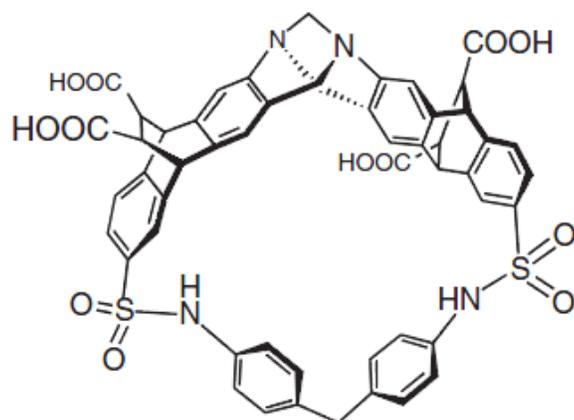


Figura 15: Composto macrocíclico derivado de análogos das BT solúvel em água capaz de interagir com terpenos.

➤ Em 1989, Wilcox e seu grupo, relataram a síntese de um receptor com dois grupos carboxílicos capazes de estabelecer simultâneas ligações de hidrogênio com derivados da biotina e adenina.

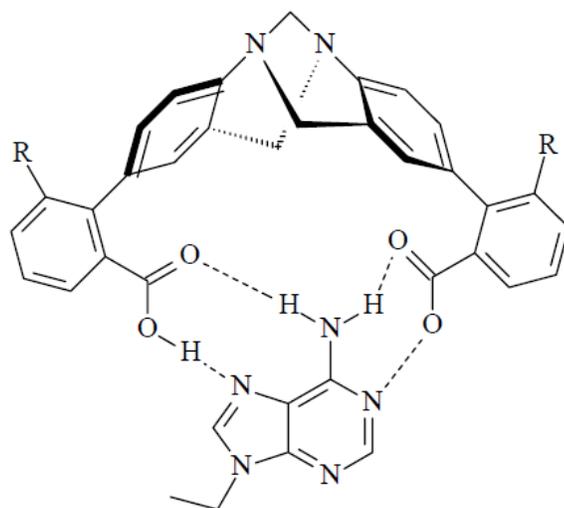


Figura 16: Receptor sintético análogo das BT contendo grupos carboxílicos capazes de formar quatro ligações de hidrogênio simultaneamente.

➤ A utilização de análogos das BT complexadas com metais (Rh e Ir) como catalisadores (Figura 17) foi descrita em 1995 por *Goldberg* e *Alper*, demonstrando ótimos rendimentos em transformações assimétricas.

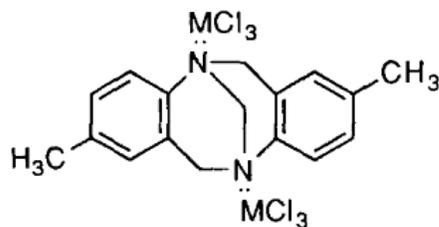


Figura 17: BT complexada com metais (M = Rh, Ir) utilizada em catálise assimétrica.

➤ A Base de Tröger (Figura 18) apresenta atividade biológica como inibidor da enzima *tromboxano sintetase A₂* responsável por problemas circulatórios e causadora de infarto.

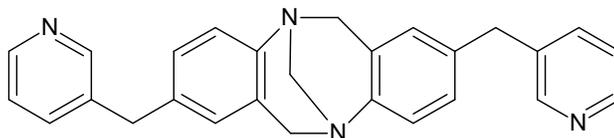


Figura 18: BT com atividade biológica capaz de inibir alguns problemas circulatórios e infarto.

3.4 INTERAÇÕES COM O DNA

Através da evolução dos conhecimentos referentes ao genoma de diversos organismos e dos inúmeros processos celulares, diretamente ligados aos ácidos nucléicos, há um crescente interesse para descoberta de novas moléculas capazes de interagir com o DNA (Hannon – 2007). Tais estudos são uma tendência, porque a maioria dos agentes antitumorais, que atuam sobre o DNA, utilizados atualmente são pouco seletivos e extremamente tóxicos segundo Hurley (2002).

As BT têm se mostrado moléculas capazes de interagir com o DNA graças a sua quiralidade, estrutura rígida e substituintes adequados. Em 1991, Yashima *et. al.* sintetizaram uma nova BT com substituintes bis(1,10)fenantrolina e elucidaram pela primeira vez a capacidade dessa classe de compostos em ligar-se de forma não covalente ao DNA. Esse foi o marco inicial para uma série de investigações sobre a interação das BT com o DNA. Valik e seus colaboradores (2006) determinaram a grande potencialidade dessas bases, com substituintes de fenantrolina e proflavina (Figura 19), como ligantes de DNA.

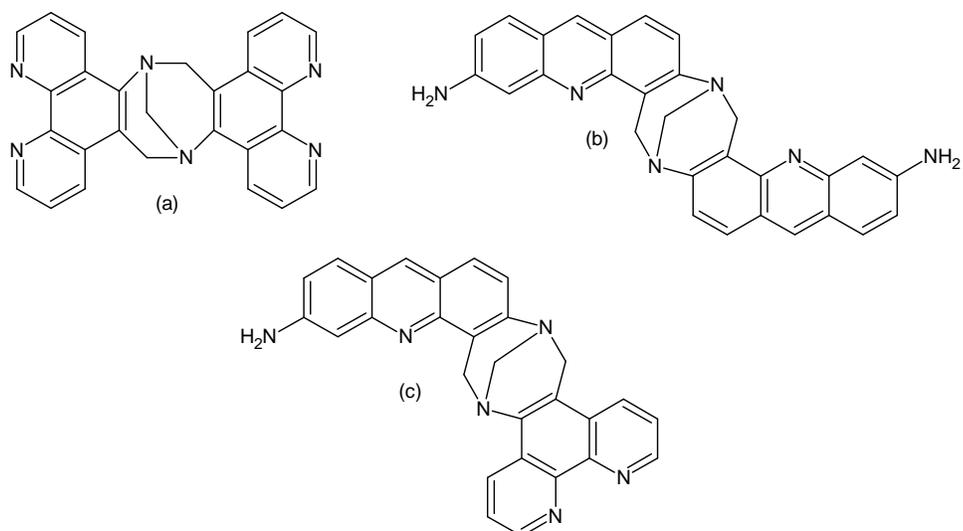


Figura 19: BT que interagem com o DNA. (a) Base de Tröger simétrica com dois substituintes de fenantrolina; (b) Base de Tröger simétrica com dois substituintes de proflavina; (c) Base de Tröger assimétrica com um substituinte de proflavina e outro de fenantrolina.

A geometria das BT permite aos seus derivados um formato de hélice que pode ter um sentido igual ou oposto ao sentido das hélices de DNA. Em 1991, Yashima e seu grupo sugeriram que o isômero levorrotatório (-)-(R,R), de mão direita, resultaria em um melhor encaixe às hélices em um B-DNA.

Essa previsão foi confirmada em 1999 por Tatibouët *et al.* e algum tempo depois por Bailly *et al.* (2000) e Baldeyrou *et al.* (2002), que mostraram através de estudos de desnaturação térmica que o enantiômero (-)-(R,R) possui maior afinidade pelo B-DNA do que o enantiômero (+)-(S,S).

Em 2009, Veale *et al.*, sintetizaram e realizaram análises fotofísicas e biológicas de novas BT fluorescentes (Figura 20) derivadas do composto 4-amino-1,8-naftalimidás. Os compostos descritos pelos autores mostraram uma grande afinidade com o DNA, podendo ser aplicadas como marcadores de DNA, porque demonstraram uma rápida absorção celular, acomodando-se no interior do núcleo (Figura 21).

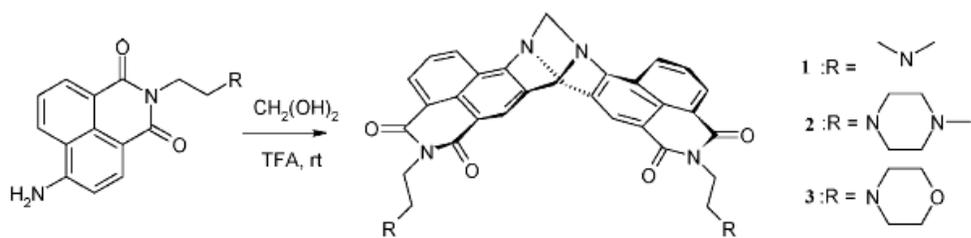


Figura 20: Síntese de novas BT fluorescentes, a partir de análogos da 4-amino-1,8-naftalimidás.

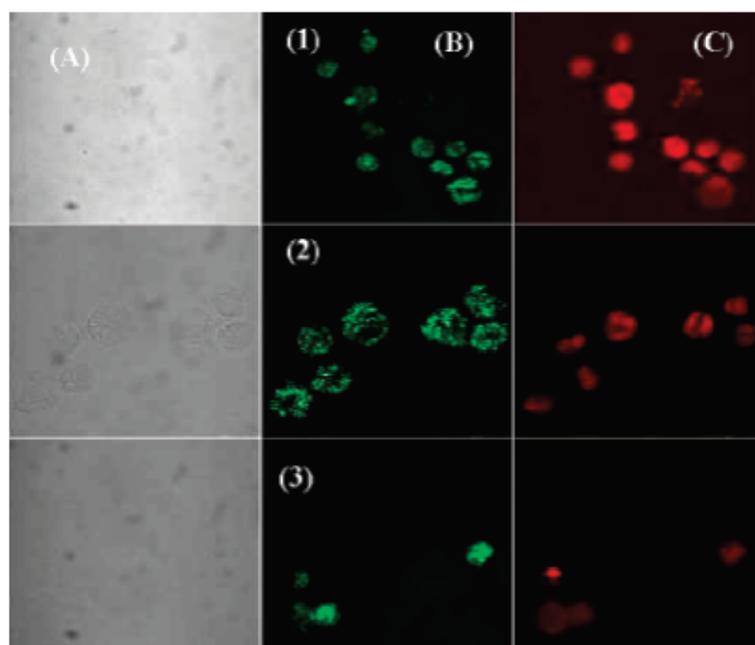


Figura 21: Imagem celular (24h após os compostos localizarem-se no núcleo); (A) Imagem normal; (B) Imagem fluorescente células marcadas com os compostos 1, 2 e 3 (10 μ M); (C) Células marcadas com iodeto de propídio.

4 DNA

4.1 HISTÓRICO

Desde a descoberta do DNA, em 1869 pelo bioquímico alemão Johann Friedrich Miescher, muito tempo se passou até que em 1944 (Avery, MacLeod e McCarty) sugerissem as primeiras ideias sobre as suas funções primordiais que foram realmente comprovadas em 1952 por Hersey e Chase. Um ano depois Wilkins e Franklin determinaram a natureza helicoidal do DNA através de técnicas de difração de raios X.

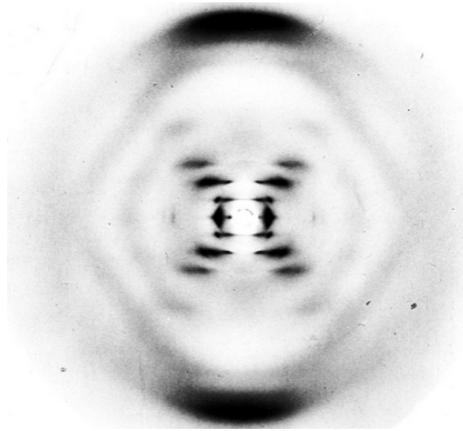


Figura 22: Imagem de difração de raios X da dupla hélice do DNA.

No mesmo ano das descobertas de Wilkins e Franklin, Watson e Crick, propuseram a estrutura do DNA em forma de dupla hélice.

4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Os ácidos nucleicos são estruturas poliméricas formadas por monômeros denominados nucleotídeos. Essas estruturas formadoras são compostas por uma base nitrogenada, um açúcar (pentose) e um grupo fosfato.

Existem quatro tipos de bases nitrogenadas: *citosina*(C), *timina*(T), *adenina*(A) e *guanina*(G) (Figura 23).

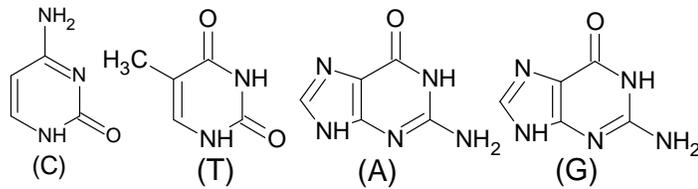


Figura 23: Bases Nitrogenadas formadoras dos ácidos nucleicos - (C) Citosina; (T) Timina; (A) Adenina e (G) Guanina.

4.3 ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE DNA

O açúcar presente na composição do nucleotídeo é a desoxirribose, uma pentose. Ligado ao carbono número 5 do açúcar aparece o grupo fosfato carregado negativamente, o que torna o nucleotídeo, bem como toda a molécula de DNA, negativos.

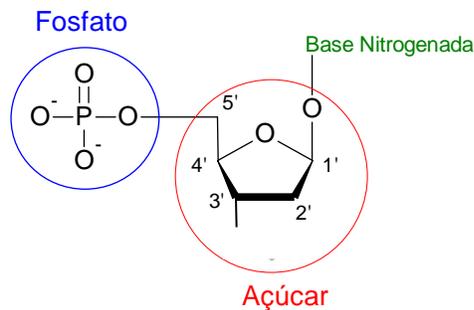


Figura 24: Estrutura do nucleotídeo: Base nitrogenada, açúcar e fosfato.

Açúcar e fosfato são componentes invariáveis nos nucleotídeos e apresentam uma função unicamente estrutural na molécula de DNA. As bases nitrogenadas guardam todas as informações necessárias para a síntese das proteínas. Milhares de nucleotídeos se empilham para construir uma cadeia da molécula de DNA, o grupo fosfato liga o carbono 3' do açúcar de um nucleotídeo ao carbono 5' do nucleotídeo seguinte, por meio de uma ligação *fosfodiéster* (Figura 25).

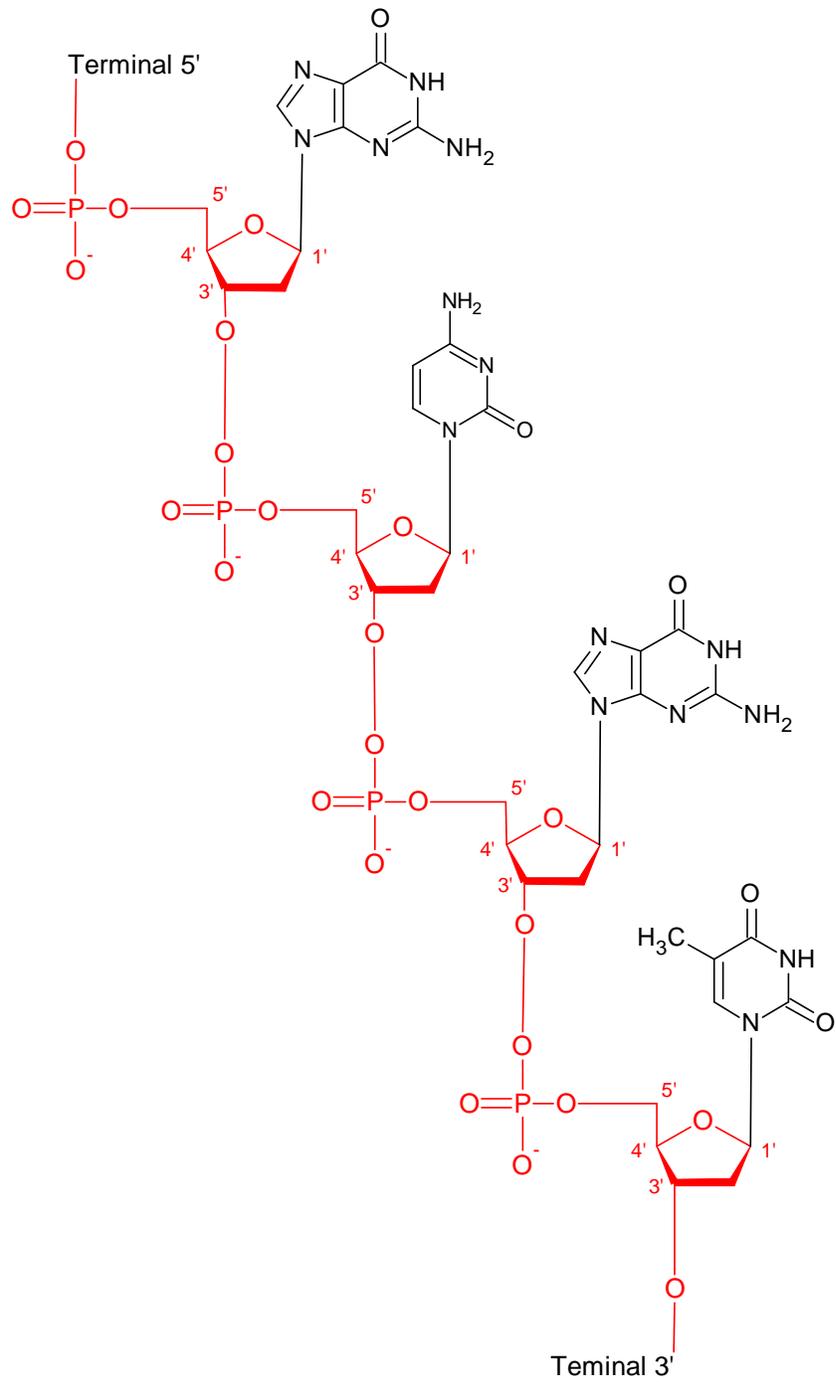


Figura 25: A cadeia de nucleotídeo mostrando os terminais 5' e 3'.

O espaço conformacional de um nucleotídeo é definido por seis ângulos de torção: α , β , γ , δ , ϵ , ζ e o ângulo de torção glicosídico χ (Figura 26).

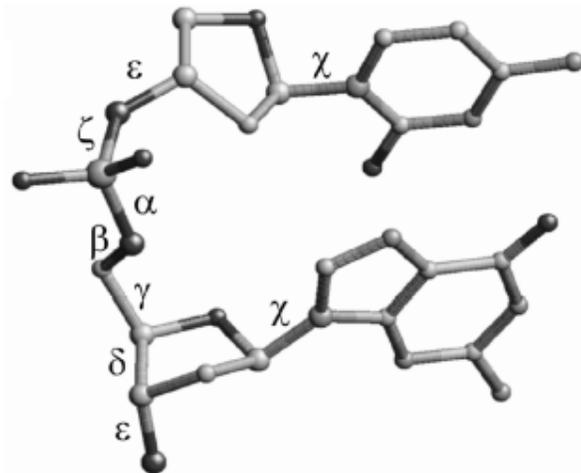


Figura 26: Um fragmento de dinucleotídeo com Citosina e Guanina. No esqueleto (cadeia) estão marcados os seguintes ângulos: $\alpha = \text{O}3'-\text{P}-\text{O}5'-\text{C}5$; $\beta = \text{P}-\text{O}5'-\text{C}5'-\text{C}4'$; $\gamma = \text{O}5'-\text{C}5'-\text{C}4'-\text{C}3'$; $\delta = \text{C}5'-\text{C}4'-\text{C}3'-\text{O}3'$; $\epsilon = \text{C}4'-\text{C}3'-\text{O}3'-\text{P}$; $\zeta = \text{C}3'-\text{O}3'-\text{P}-\text{O}5'$; $\chi = \text{O}4'-\text{C}1'-\text{N}9-\text{C}4$ (citosina); $\chi = \text{O}4'-\text{C}1'-\text{N}1-\text{C}2$ (guanina).

Como descrito por Watson e Crick (1953), a molécula de DNA é constituída por duas cadeias de nucleotídeos que se enrolam formando a *dupla hélice*. As cadeias estão dispostas de modo antiparalelo, ou seja, enquanto uma vai da direção 5' para 3', a outra ocorre na direção oposta. As duas cadeias estão mantidas juntas por meio de ligações de hidrogênio que ocorrem entre as bases nitrogenadas de cadeias diferentes. As interações entre as bases nitrogenadas estão relacionadas com a sua estrutura. Watson e Crick explicaram a forma com que as quatro bases nitrogenadas estão dispostas interagindo entre si onde sempre uma **A** sempre se liga a uma **T**, enquanto uma **C** sempre aparece ligada a uma **G**.

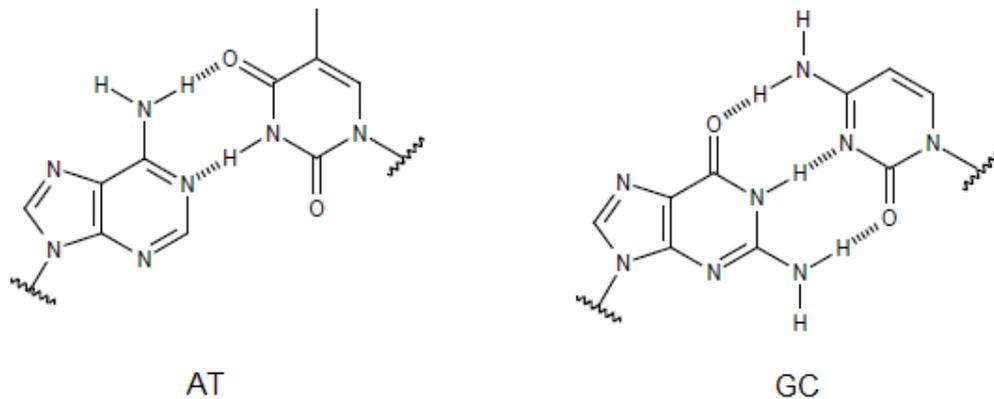


Figura 27: Interações entre os pares de bases. AT formação de duas ligações de hidrogênio entre as bases Adenina e Timina; GC formação de três ligações de hidrogênio entre as bases Guanina e Citosina.

Esses pares de bases formados, **AT** e **CG**, são conhecidos como pares de bases “canônicos” ou pares Watson-Crick. Esses pares apresentam algumas características fundamentais: *alta estabilização de energia via as ligações de hidrogênio estabelecidas entre os pares* (Figura 27); *e os pares GC e AT possuem dimensões similares ao longo de seus eixos.*

Pares de bases não-Watson-Crick também possuem interações através de ligações de hidrogênios, mas não possuem dimensões similares como nos pares Watson-Crick.

Os pares de bases podem sofrer alterações nas suas geometrias. Esses arranjos são descritos por um conjunto de parâmetros definidos pelo *Cambridge Accord*. As alterações estruturais nos oligonucleotídeos podem ser divididas como: Rotacionais (*Tip*(θ); *Inclination*(η); *Opening*(σ); *Propeller Twist* (ω); *Buckle*(κ); *Twist*(Ω); *Roll*(ρ); *Tilt*(τ)) e Translacionais (*y displacent*(d_y); *x displacent*(d_x); *Stagger*(S_z); *Stretch*(S_y); *Shear*(S_x); *Rise*(D_z); *Slide* (D_y); *Shift* (D_x)).

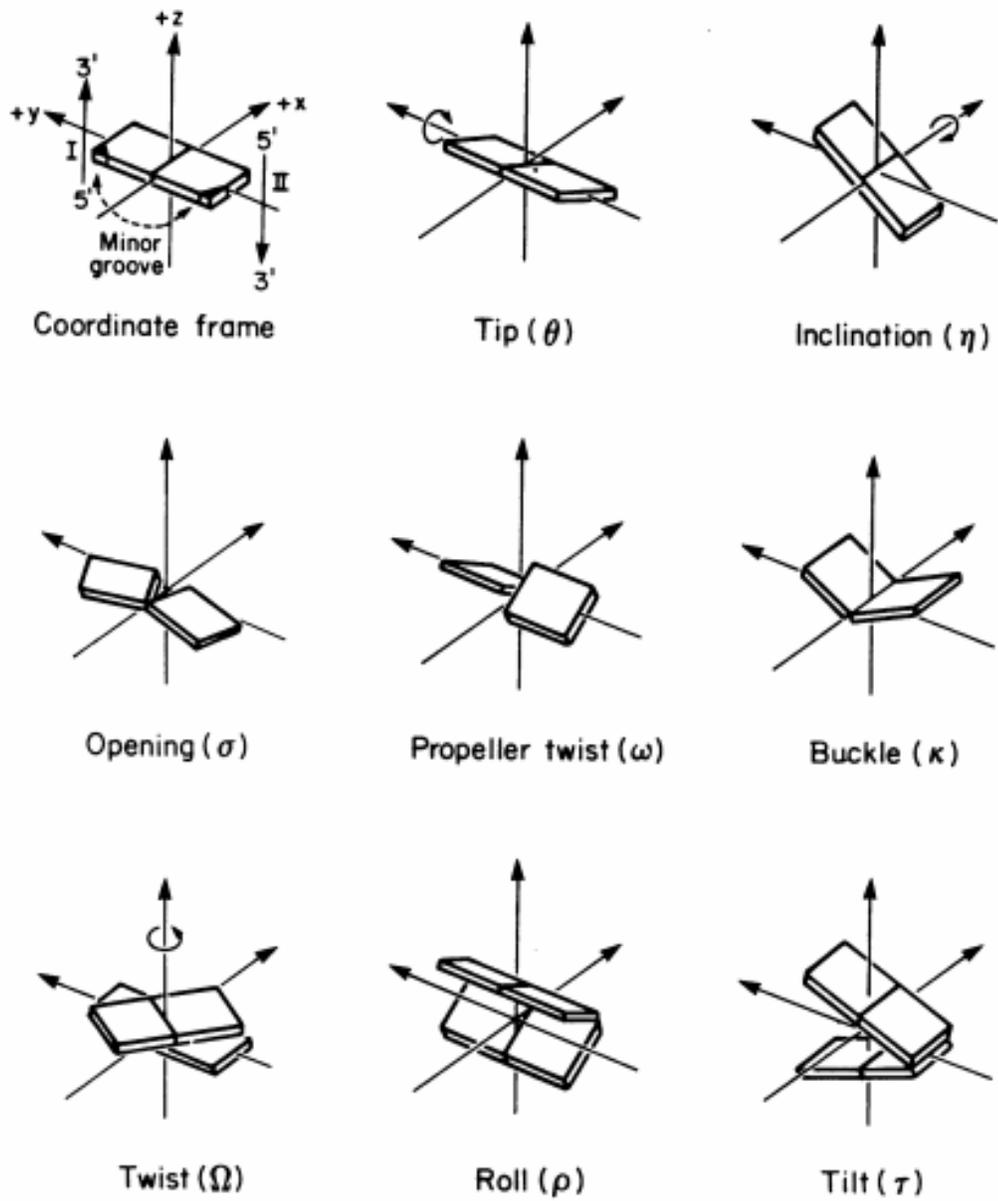


Figura 28: Parâmetros Rotacionais envolvendo dois pares de bases, Tip e Inclination são movimentos coordenados nos eixos y e x , respectivamente. Opening(eixo z), Propeller Twist (eixo y), Buckle(eixo x), Twist (eixo z), Roll(eixo y) e Tilt (eixo x) são movimentos opostos.

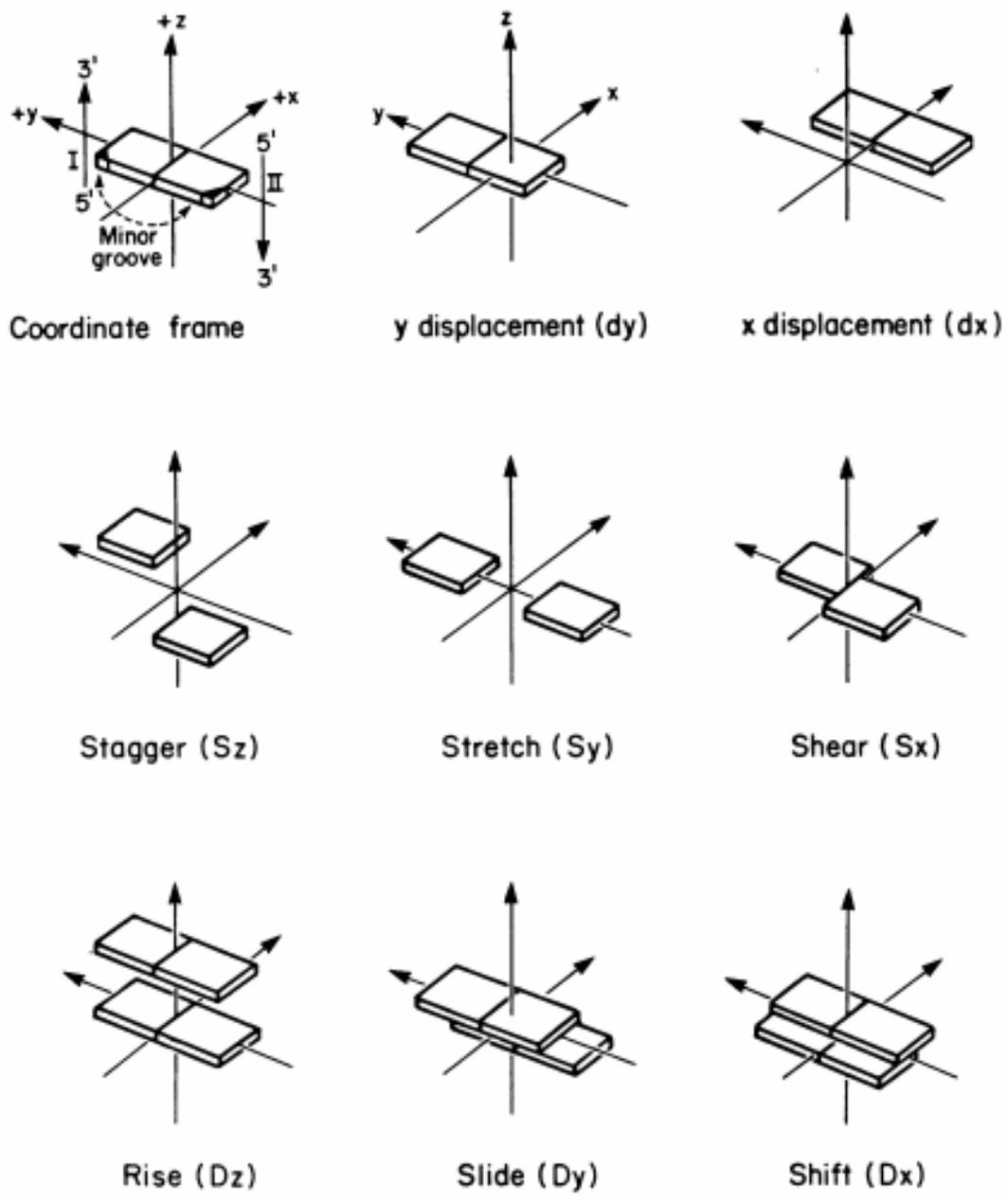


Figura 29: Parâmetros Translacionais envolvendo dois pares de bases, y displacentsão movimentos coordenados nos eixos y e x, respectivamente. Stagger (eixo z), Stretch (eixo y), Shear (eixo x), Rise (eixo z), Slide (eixo y) e Shift (eixo x) são movimentos opostos.

A combinação desses parâmetros em cada dois pares de bases da hélice que define a geometria global do DNA. A interação de um ligante com um oligômero de DNA pode ser estudada através dos parâmetros descritos anteriormente. Ao interagir com o sulco do oligonucleotídeo (Figura 31), o parâmetro *Roll* pode descrever alterações locais do oligômero. Intercaladores podem causar alterações no *Twist* (o grau de torção da dupla hélice) e *Rise* (medida da distância entre dois pares de bases consecutivos) que determina a formação de um *gap* (Dickerson – 1989).

Diferentes conformações já foram descritas para os ácidos nucleicos não complexados e determinadas por cristalografia de raios X. Algumas das estruturas são demonstradas na Figura 30, cada uma das formas apresentam valores distintos de *Rise*, *Twist*, *Roll* entre outros parâmetros.

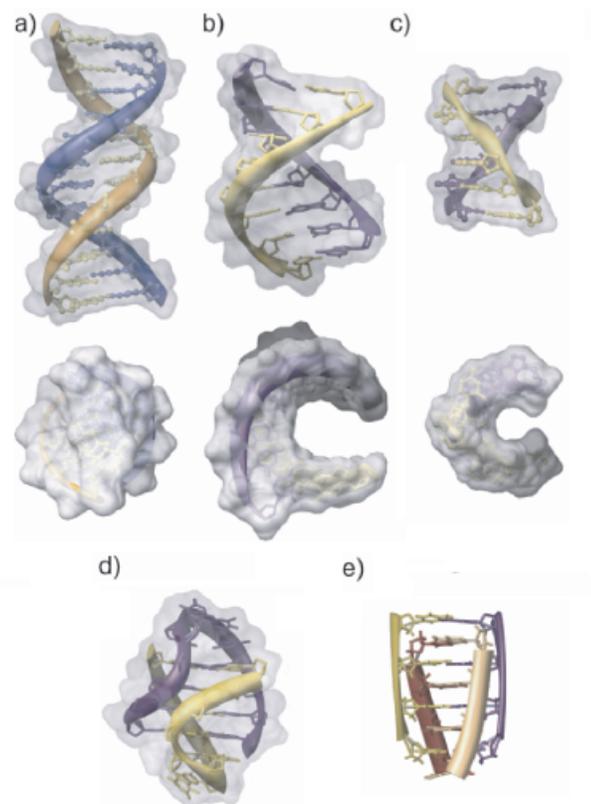


Figura 30: Algumas estruturas de diferentes estruturas de ácidos nucleicos bem caracterizadas. a) dodecâmero B-DNA (pdb:1BNA); b) octâmero A-DNA (pdb:2ANA); c) hexâmero Z-DNA (pdb:1DCG); d) tetraplex guanina DNA (pdb:1JPQ)

Na estrutura do B-DNA, pode-se destacar duas regiões distintas: o sulco menor e o sulco maior (Figura 31).

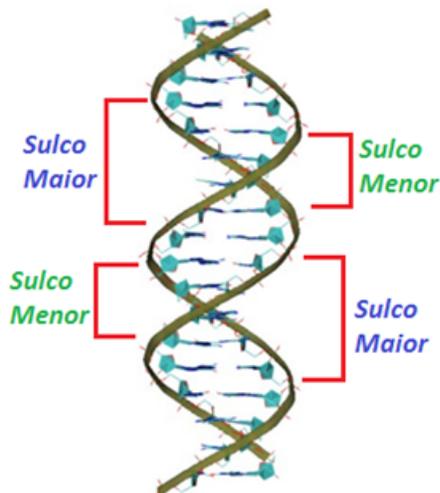


Figura 31: Regiões (**sulco maior** e **sulco menor**) em uma estrutura do oligômero de B-DNA.

4.4 FORMAS DE INTERAÇÃO LIGANTE – DNA

Diferentes ligantes podem interagir com diferentes regiões do nucleotídeo, de forma covalente ou não, causando as mais variadas alterações na estrutura do oligômero. Entre as diferentes formas de interações podem ser destacadas as intercalações, interações na forma de sulco e interações mistas (com parte da molécula intercalada e outra parte interagindo com um dos sulcos do DNA).

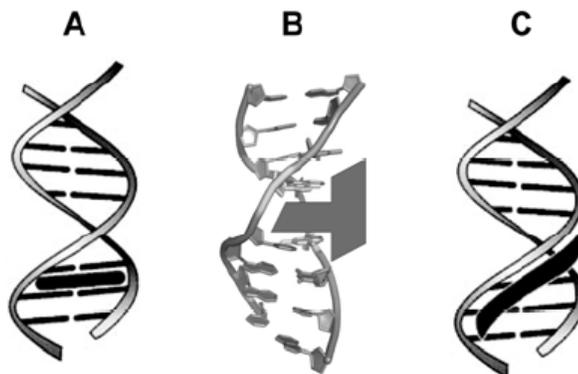


Figura 32: Formas de interação; A) intercalação; B) interação mista; C) interação na forma de sulco.

Os intercaladores, moléculas como a 9-aminoacridina e a elipticina, são compostos capazes de relaxar o DNA estabelecendo uma interação entre dois pares de bases. Um intercalador pode interagir de forma não covalente com interações do tipo π -Stacking, ligações de hidrogênio entre outras.

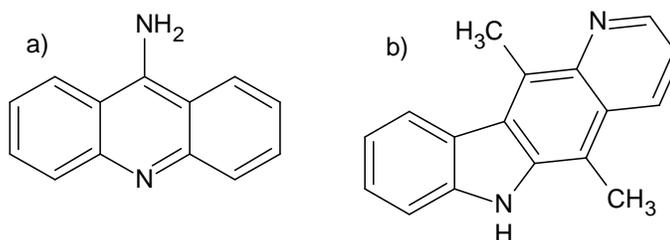


Figura 33: Típicos intercaladores de DNA. a) 9-aminoacridina conhecida pelas suas propriedades, anti-séptica, sua atividade mutagênica, altamente fluorescente e indicador de pH intracelular ; b) elipticina conhecida por ser um agente antineoplásico.

As interações na forma de sulco não induzem grandes alterações na conformação do DNA, como nas intercalações. Essas interações ocorrem tipicamente na forma intermolecular e apresentam potencial anticancerígeno e antibacteriano como na mitomicina (Figura 34).

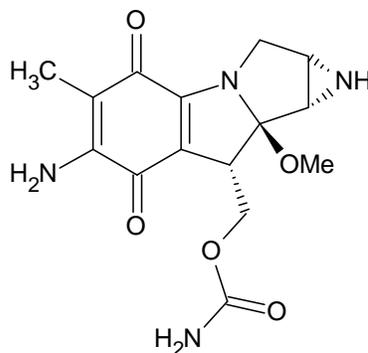


Figura 34: Ligante capaz de interagir com o sulco menor, Mitomicina possui atividade antibacteriana e é utilizado como medicamento quimioterápico.

Tabela 1: Droga, aplicação e modo de interação de alguns ligantes de DNA .

Droga	Aplicação	Modo de interação	PDB
Hoescht 33258	Antitumoral	Ligante de sulco	264D
Netropsin	Antitumoral e antiviral	Ligante de sulco	121D
Distamicina	Antitumoral e antiviral	Ligante de sulco	2DND
Nogalamicina	Antitumoral	Intercalador	182D
Menogaril	Antitumoral	Intercalador	202D

Outros ligantes podem interagir de forma mista com o DNA. Um exemplo desse tipo de molécula é a daunomicina. Esse composto possui um anel de antraquinona, capaz de interagir com o oligonucleotídeo como intercalador e em sua estrutura, o grupo amino açúcar é capaz de interagir com o sulco menor da molécula (Mukherjee – 2008).

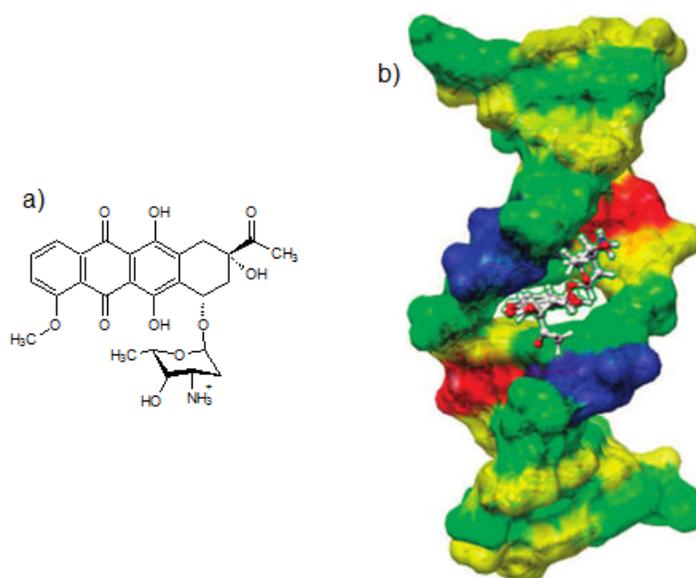


Figura 35: a) fórmula estrutural da daunomicina molécula de ação anticancerígena; b) estrutura cristalográfica (pbd: 1D11) da interação entre daunomicina e um oligômero de B-DNA interagindo de forma mista.

5 DOCKING MOLECULAR

Docking molecular é método computacional que analisa a forma de interação (conformação e orientação) de ligantes com alvos macromoleculares (proteínas ou oligômeros de DNA).

A metodologia do docking necessita uma boa definição de como o receptor e o ligante estão representados. Para o receptor são levadas em consideração três representações básicas: atômica (utilizada juntamente com funções de energia potencial e geralmente é utilizada nos procedimentos finais dos resultados), superfície (metodologia de representação muito utilizada no estudo de docking proteína-proteína, baseada em pontos da superfície, minimizando o ângulo entre as superfícies opostas) e *grid* (os pontos de *grid* coletam informações de dois tipos de energia potencial: eletrostática e van der Waals).

Diferentes algoritmos são utilizados para busca da melhor conformação entre ligante e seu alvo, levando em consideração a flexibilidade do ligante e até mesmo da macromolécula, os métodos podem ser divididos em três categorias básicas:

- Sistemático: explora sistematicamente todo espaço de fases, mas apresenta alguns problemas quando o ligante é flexível (explosão combinatorial).
- Estocástico (ou aleatório): são aplicadas alterações randômicas para cada ligante, que são avaliadas e classificadas pela função de escore, podendo essas conformações ser aceitas ou não.
- Simulação: utiliza simulações por dinâmica molecular e minimizações de energia, mas não são métodos que conseguem com facilidade ultrapassar barreiras energéticas entre mínimos locais sem um maior custo computacional.

Os diferentes programas de docking utilizam-se de diferentes métodos e algoritmos. Por exemplo, o programa *AutoDock* 4.0, disponibiliza diferentes algoritmos como o de *Monte Carlo (Simulated Annealing)* e os algoritmos genéticos (esses adaptam princípios da competição biológica e da dinâmica das populações).

Os algoritmos genéticos tem se mostrado uma ferramenta eficaz para a exploração (aleatória) do espaço de fases. Os algoritmos genéticos funcionam da seguinte forma: primeiramente é gerado um grande número de ligantes posicionados de forma randômica no espaço. Então é calculada uma estimativa de energia de interação de cada ligante com o alvo (receptor), a fim de selecionar as melhores conformações nas quais serão aplicados os

operadores genéticos. Se as interações ligante-receptor apresentarem energias de interação mais favoráveis, esses substituirão a conformação anterior. Assim são propostos (pelo usuário do programa) vários ciclos de gerações até que se possa atingir o número máximo de gerações.

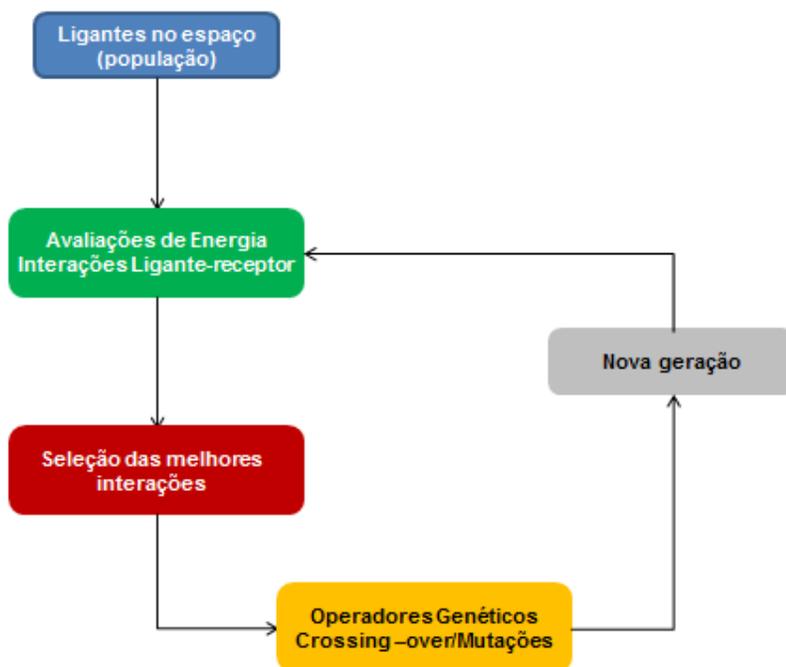


Figura 36: Esquema de funcionamento do algoritmo genético no programa AutoDock 4.0.

Mesmo o DNA sendo a molécula alvo de uma série de antibióticos e antitumorais poucos trabalhos sobre docking em ácidos nucleicos tem sido publicados, devido a maioria dos programas, como por exemplo, o *AutoDock 4.0*, possui suas funções de escore parametrizadas e validadas para interações ligante-proteína. Os ácidos nucleicos apresentam estruturas com características únicas e bem distintas em comparação às proteínas: alta densidade de carga, não apresentam um único sítio de interação e outros. O que leva a questionar sobre a aplicação de programas de docking para simulações entre ligante e oligômero de DNA. Ricci *et al*, em 2009, propuseram uma metodologia, aplicada a ácidos nucleicos de docking com resultados bem próximos a estruturas cristalográficas existentes.

6 DINÂMICA MOLECULAR

Segundo van Gunsteren *et. al.* (2006) as simulações de dinâmica molecular têm contribuído de forma importantíssima para estudo de sistemas biológicos.

A Dinâmica Molecular é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico dos átomos individuais que compõem o sistema, dependente do tempo.

Na Dinâmica Molecular as moléculas são tratadas como um grupo de átomos que pode ser descrito por forças newtonianas (Equações 1,2), ou seja, são tratados como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas interagindo com outras moléculas mediante interações intermoleculares.

$$m \frac{d^2 r}{dt^2} = m \frac{dv}{dt} = F; \quad F = -\nabla U(r) \quad (1,2)$$

Para uma melhor aproximação, considerando interações em três dimensões, é melhor utilizar os conceitos de movimento Lagrangiano e Hamiltoniano. A equação de movimento de Lagrange (Equação 3), apresenta o mesmo comportamento de coordenadas, de um ponto de vista teórico as aproximações mais uteis são as propostas no Hamiltoniano.

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{q}_j} \right) = \frac{\partial L}{\partial q_j} \quad (3)$$

As equações do movimento Hamiltoniano (4,5) conseguem descrever como as posições (q) e velocidades mudam com o tempo, contendo então todas as informações necessárias para descrever o sistema e sua evolução.

$$\dot{q}_j = \left(\frac{\partial H}{\partial p_j} \right); \quad \dot{p}_j = - \left(\frac{\partial H}{\partial q_j} \right) \quad (4,5)$$

Um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas (campo de força) conhecida como uma função da energia potencial.

$$U = U_b + U_\theta + U_\phi + U_\xi + U_{vdW} + U_{elet} \quad (6)$$

O que permite que a energia potencial total do sistema seja calculada a partir da estrutura tridimensional (*estiramento de ligação* (U_b), *deformação angular* (U_θ), *torsões* (U_ϕ), *interações diedrais impróprias* (U_ξ), *interações de van der Waals* (U_{vdW}) e *interações eletrostáticas* ($U_{elest.}$)) e que as forças que levam à evolução do sistema também sejam calculadas, passo a passo.

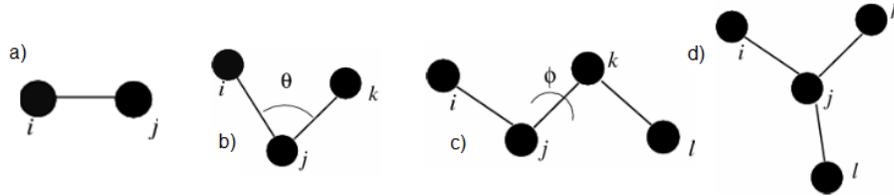


Figura 37: a) estiramento de ligação; b) deformação angular; c) torções; d) interações diedrais impróprias.

O *estiramento de ligação* (U_b) é calculado, utilizando potencial harmônico (Equação 7), expressão matemática considerando o modelo de ligação química bola e mola (Figura 37-a), onde r_{ij} é comprimento de ligação real e r_0 é o valor de equilíbrio. Essa soma ocorre sobre todos os átomos diretamente ligados.

$$U_b = \sum_{ij} U_b(r_{ij}) = \frac{1}{2} \sum_{ij} k_b (r_{ij} - r_0)^2 \quad (7)$$

A *deformação angular* (U_θ) pode ser calculada a partir do potencial harmônico no ângulo descrito pela equação (8), onde o ângulo θ_{ijk} entre os átomos ligados comparados com o valor de equilíbrio θ_0 .

$$U_\theta = \sum U_\theta(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} \sum k_\theta (\theta_{ijk} - \theta_0)^2 \quad (8)$$

Na equação (9), o potencial trigonométrico representa as alterações *torcionais* (U_ϕ) entre dois pares de átomos ligados formando um diedro. Onde ϕ_{ijkl} é o ângulo diedral, n é a multiplicidade e δ é o ângulo de fase.

$$U_\phi = \sum k_\phi [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \delta)] \quad (9)$$

E as *interações diedrais impróprias* (U_{ξ}) estão relacionadas com a energia necessária para deformar uma configuração local ao redor de um átomo escolhido e são calculadas através do potencial harmônico (Equação 10), onde ξ_{ijkl} é o ângulo diedral impróprio e ξ_0 é o valor de equilíbrio.

$$U_{\xi} = \frac{1}{2} \sum k_{\theta} (\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \quad (10)$$

As interações não ligadas (*van der Waals* (U_{vdw}) e *interações eletrostáticas* (U_{elet})) são calculadas por potenciais de Lenard-Jones (Equação 11) e de Coulomb carga-carga (Equação 12), respectivamente:

$$U_{vdw} = 4 \sum_i \sum_{j \neq i} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (11)$$

$$U_{elet} = \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r r_{ij}} \quad (12)$$

As interações de van de Waals surgem de uma correlação eletrônica entre as partes atraentes e repulsivas. O valor de σ está relacionado com o tamanho da nuvem eletrônica e o potencial é zero quando $\sigma = r$. Já o parâmetro ε representa a profundidade do poço atrativo.

E as interações eletrostáticas estão relacionadas a quantidade de carga (q) localizada nos átomos i e j .

7 METODOLOGIA

7.1 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES

Para os dockings são necessários ligantes com estruturas geometricamente otimizadas. Dois ligantes análogos das BT fluorescentes (Figura 38) foram construídos utilizando o programa GAUSSVIEW, as geometrias foram otimizadas com o cálculo de Hartree-Fock restrito (RHF) usando a base 6-31G, com o programa Gaussian98.

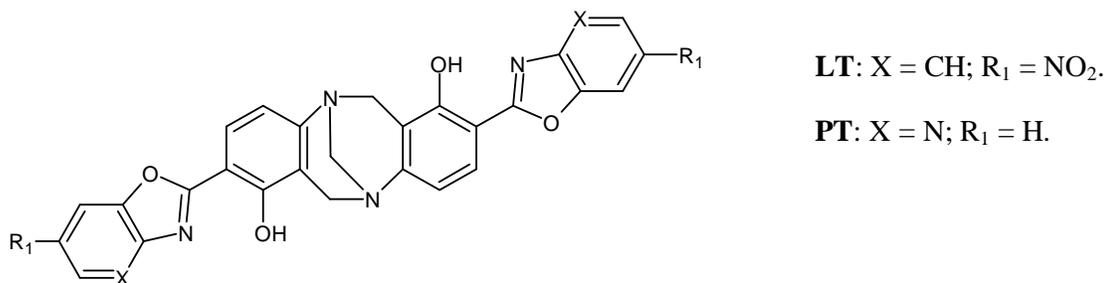


Figura 38: Fórmula estrutural generalizada dos ligantes: LT e PT.

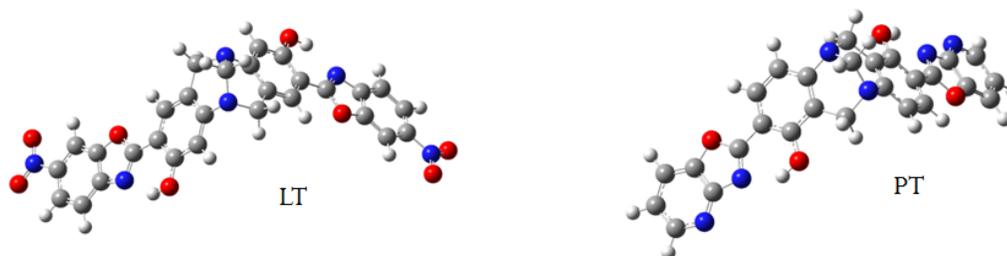


Figura 39: Ligantes LT e PT otimizados.

7.2 OLIGONUCLEOTÍDEO

O receptor escolhido para os dockings foi um oligômero canônico de B-DNA (Figura 39) com sequências semelhantes as dos dados cristalográficos para oligonucleotídeos desse tipo de molécula, o dodecâmero Dickerson-Drew d(CGCGAATTCGCG)₂, modificado de forma a se obter um *gap* artificial (6,5 Å) entre os pares AT e AT (5° e 6° pares de bases a partir da extremidade da fita A).

Ricci *et. al.* (2009), descreveram a validação de um protocolo no qual simularam diferentes dockings utilizando quatro oligômeros de B-DNA diferentes (dois canônicos e

dois cristalográficos), sendo que uma das estruturas canônicas foi modificada para o favorecimento da intercalação (no *gap*). Foram analisadas as interações entre os diferentes receptores com cinco ligantes diferentes: Elicitina (intercalador já conhecido e estudado e com estrutura complexada com oligonucleotídeo descrita no *Protein Data Bank* – *PDB:1Z3F*); *Netropsin* (com dados cristalográficos descritos no *PDB: 1DNE*, pela capacidade de interagir com o sulco menor do oligonucleotídeo); *Aflatoxin B1* (com estrutura cristalográfica complexada com oligonucleotídeo descrita no *PDB:1MKL*); e dois análogos de BT (uma simétrica, com substituintes derivados da proflavina; e outra assimétrica com substituintes derivados de proflavina e fenantrolina) as quais sua forma de interação ainda não possui informações cristalográficas. Os três primeiros ligantes foram utilizados para validação do protocolo de simulação, o qual foi utilizado para propor uma resolução para descrição do modo de interação entre as BT e *oligonucleotídeo* de DNA, mostrando-se como uma boa proposta para elucidação desse tipo de interação.

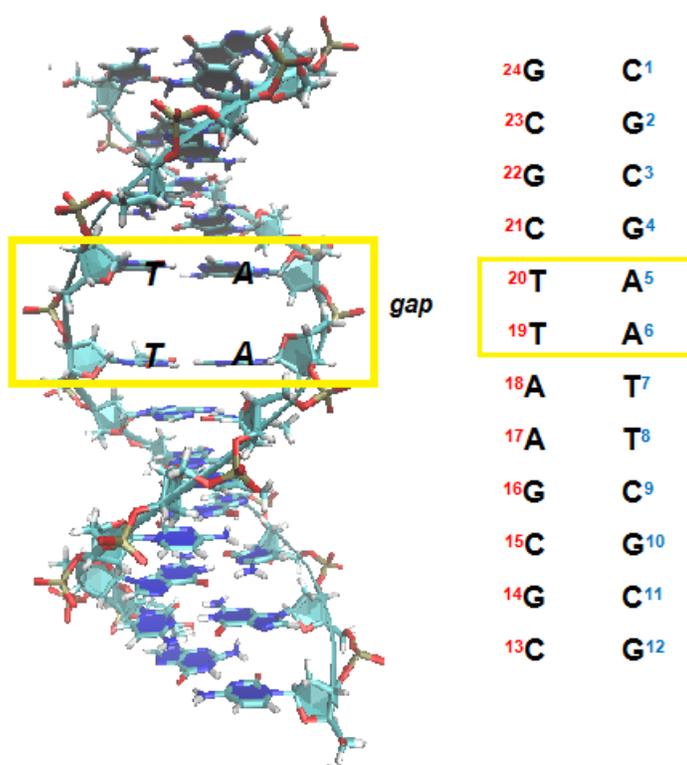


Figura 40: à direita estrutura do oligômero de B-DNA construído no programa X3DNA modificado com um *gap* entre os pares AT e AT; à esquerda esquema genérico das fitas **A** e **B** destacado em amarelo a posição do *gap* artificial.

7.3 DOCKING MOLECULAR

Os dockings foram realizados no programa *AutoDock 4.0* (função de escore baseada na variação de energia livre de ligação), utilizando o algoritmo estocástico *LGA* (algoritmo genético Lamarckiano), que é baseado na combinação do algoritmo genético (algoritmo de busca global) e o algoritmo de Solis e West (algoritmo de busca local).

A malha de afinidade (*grid*) foi construída utilizando como interface gráfica o programa *AutoDockTools* (ADT) com as seguintes dimensões: 96x96x110 pontos e uma resolução de 0,375 Å. O oligômero foi centralizado na malha de afinidade e os mapas de afinidade entre os átomos do ligante e do receptor (oligômero de B-DNA) foram gerados, utilizando o módulo *AutoGrid* do programa *AutoDock 4.0*. Os parâmetros utilizados para os dockings foram: 100 corridas, 5×10^7 avaliações de energia, número máximo de 27000 gerações, operador de mutação 0,02, operador de crossing-over 0,80, passo translacional de 0,2Å, passo de orientação 5°, passo torsional 5° e para o restante dos parâmetros foram utilizados os valores *default* do programa. Tais parâmetros foram usados por Ricci *et. al.* (2009).

7.4 DINÂMICA MOLECULAR

Para as simulações de dinâmica molecular (DM) foram selecionados, inicialmente, dois complexos (referentes aos clusters de energias mais negativas), para cada um dos ligantes testados, obtidos através dos dockings realizados.

As interações foram descritas, com os potenciais do campo de força AMBER e a topologia do ligante foi determinada utilizando o script ACPYPE (*AnteChamber Python Parser Interface*) que usa o programa *AnteChamber* para gerar os arquivos de topologia dos ligantes a partir dos parâmetros do GAFF (*Generalized Amber Force Field*).

Então, os sistemas foram colocados em caixas cúbicas com a distância mínima entre a molécula do soluto e as paredes da caixa de 18Å. Logo, foram adicionados contra-íons de sódio ao sistema contendo o oligonucleotídeo de DNA (22 íons Na^+), que foram submetidos ao método *steepest descent* para uma minimização de energia.

Os sistemas foram solvatados com moléculas de água TIP3P (15424 moléculas de solvente), e novamente submetidos a minimizações *steepest descent*. Para simulação de condições fisiológicas foram acrescentados íons de sódio (44) e cloreto (44).

Os sistemas foram aquecidos linearmente de 270K a 310K em simulação NVT. Todas as simulações correram na escala de tempo de 25ns, com um passo de integração de 0,0002 e número de *steps* igual a 100000.

Para análise dos dados foram utilizados módulos do pacote *GROMACS*, *X3DNA* e *scripts* escritos pelo Grupo de Química Teórica (GQT-UFRGS).

8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1 DOCKING MOLECULAR

Para cada um dos ligantes (*LT e PT*) foram realizadas 100 corridas. Em todas as simulações, as variações de energia (ΔG°) foram significativamente negativas (Tabela 2) indicando fortes interações na formação dos complexos *ligante-oligonucleotídeo de DNA*.

Tabela 2: Resultados para os dockings dos ligantes LT e PT com o oligonucleotídeo de B-DNA com gap.

<i>Complexo</i> (Cluster)	<i>Ligante</i>	N_{sulco} (%)	N_{int} (%)	$\Delta G^\circ_{mínima}$ (kcal/mol)
a	LT	61	0	-10,88
b	LT	39	0	-10,70
c	PT	54	0	-10,57
d	PT	42	0	-10,55

N_{sulco} , porcentagem de corridas resultando em interação no sulco do oligômero; N_{int} , porcentagens de corridas resultando em intercalação; $\Delta G^\circ_{mínima}$, energia livre de interação mais favorável do docking.

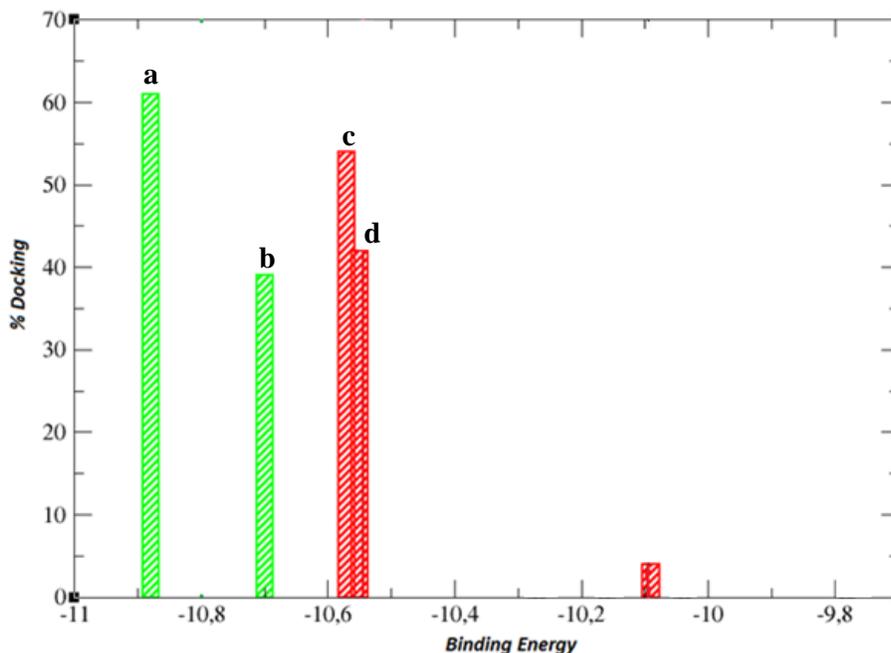


Figura 41: Perfis dos clusters dos dockings realizados. Cada cluster é representado por uma barra em que a altura corresponde ao número de conformações com posições e energias de ligações semelhantes. As cores representam os diferentes ligantes analisados: *verde (LT) e vermelho (PT)*. As letras *a, b, c, d*, representam os complexos analisado e selecionados para a DM.

O ligante *LT* apresenta nos dois complexos estudados (**a** e **b**), formas de interação na forma de sulco, interagindo com o sulco menor do oligonucleotídeo, com energias livres de interação com valores iguais a -10,88 e -10,70kcal/mol, respectivamente. Nas duas conformações a interação se dá próximo ao *gap* modificado, como descrito por Ricci *et. al.*.

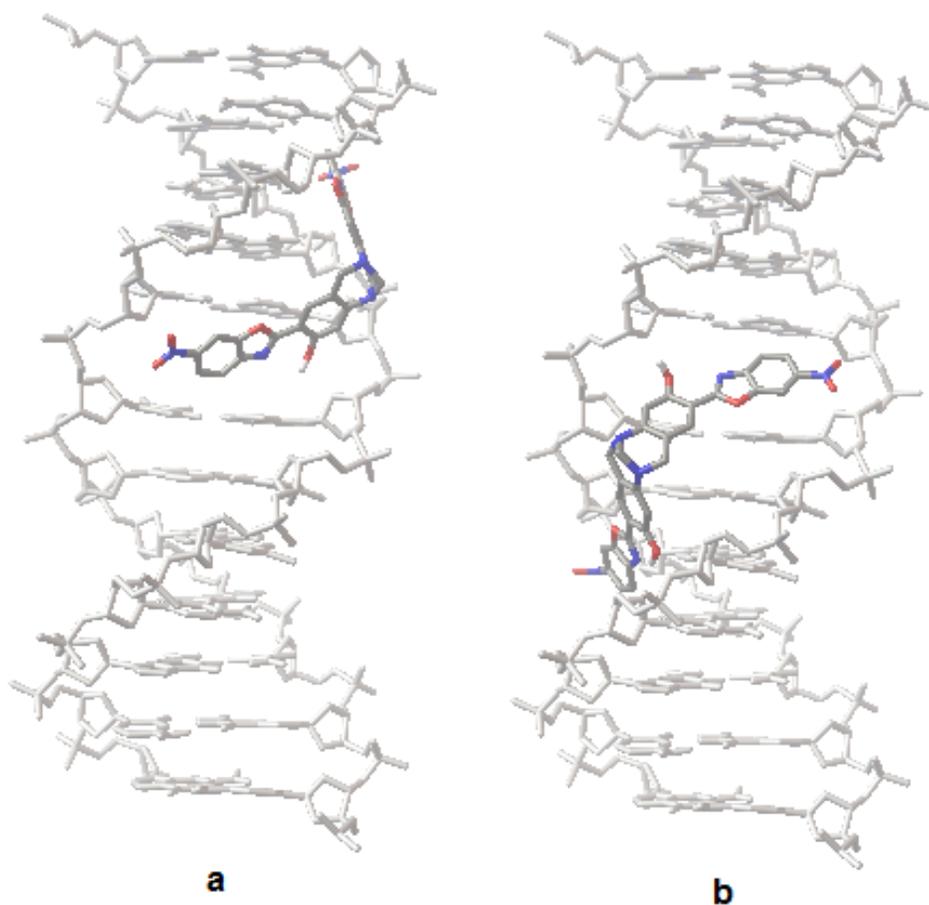


Figura 42: Complexos a (-10,88kcal/mol) e b (-10,70kcal/mol) com as conformações com energia de interação mais negativas interagindo com o sulco menor do oligômero de B-DNA com *gap*.

Nos complexos **c** e **d**, estão descritas duas conformações com um modo de interação bastante semelhante para o ligante *PT* (Figura 41) com o oligonucleotídeo no sulco menor, só que desta vez os ligantes estão distantes da lacuna (modificada-*gap*) para intercalação. O

mesmo ligante apresenta um *cluster* (-10,09kcal/mol) que representa 4% da simulação, com uma conformação (com interação na forma de sulco) no sulco menor próximo ao *gap*.

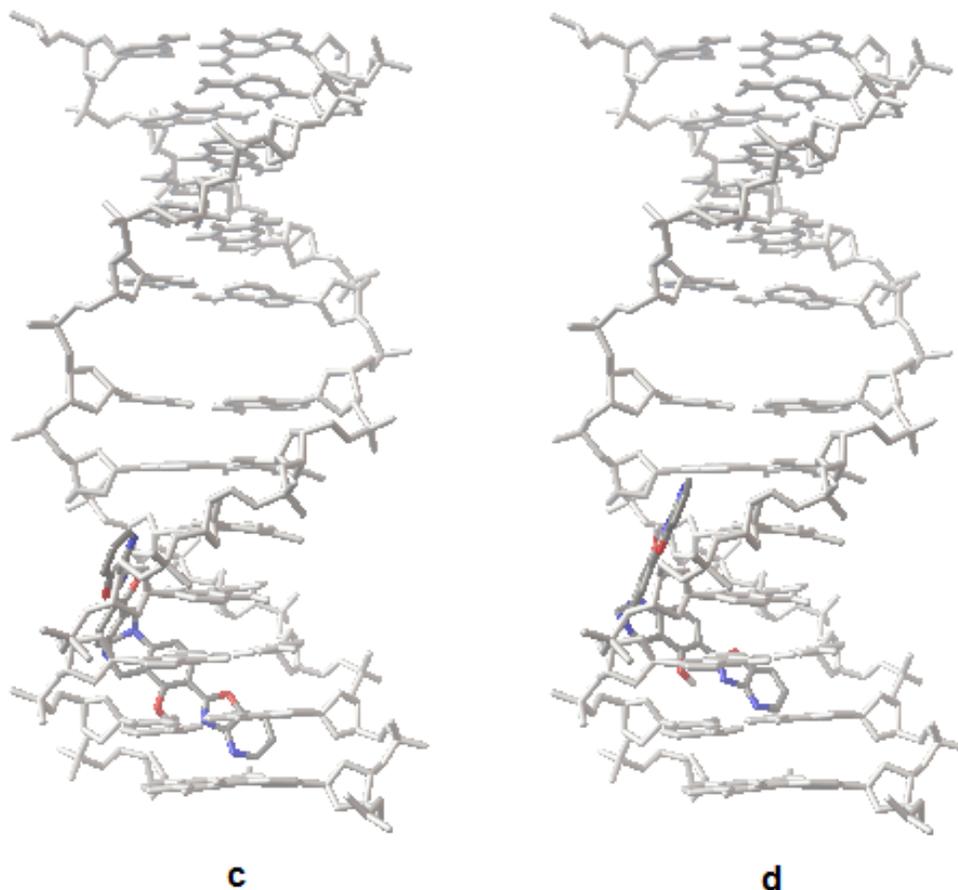


Figura 43: Complexos **c** (-10,57kcal/mol) e **d** (-10,55kcal/mol) com as conformações com energia de interação mais negativas interagindo com o sulco menor do oligômero de B-DNA com *gap*.

As simulações de docking molecular demonstraram que todos os ligantes estudados apresentaram seletividade pela interação com o sulco menor (Figuras 42-43), o que pode ser uma proposta para a forma de interação mais favorável e provável para análogos das BT confirmando as propostas discutidas experimentalmente por *Bailly et al* (2000) e *Baldeyrou et al* (2002) sobre a seletividade do isômero (-)-(R,R) pela interação com o sulco menor de oligonucleotídeos de B-DNA. Mas pode-se notar também que não apresentam nenhum tipo de seletividade por algum tipo específico de pares de bases.

8.2 DINÂMICA MOLECULAR

Após as simulações de DM, as trajetórias foram verificadas visualmente e foram analisados os seguintes parâmetros: desvio quadrático médio (*RMSD*); número de pares de bases canônicos (Watson-Crick) e pares de bases não canônicos, as mudanças estruturais do oligonucleotídeo (*Twist, Rise, Roll e Slide*) utilizando os recursos citados na metodologia.

8.2.1 Análise visual da trajetória

Verificando as trajetórias (*frames*) das simulações, pode-se verificar que o complexo **a** (Figura 44) o oligonucleotídeo sofre várias alterações estruturais como a perda de um par de bases canônico, em 10000ps, onde a base *Timina* (T) parece não interagir mais com *Adenina* (A). A base T mostra-se com os oxigênios voltados para fora da estrutura do oligômero.

Quando a forma de interação (Ligante-receptor) nas simulações do complexo **a**, o ligante *LT* inicialmente interagindo com o sulco menor da molécula, próximo ao *gap*. Com os relaxamentos o *gap* acaba se fechando (5000ps) quando então ocorre o desaparecimento de um par de bases (AT) para a abertura de um novo *gap* induzido, durante a simulação, pela presença do ligante. Após os 15000ps de trajetória um dos grupos ligado ao *V* do análogo da BT encontra-se totalmente intercalado entre dois pares de bases consecutivos.

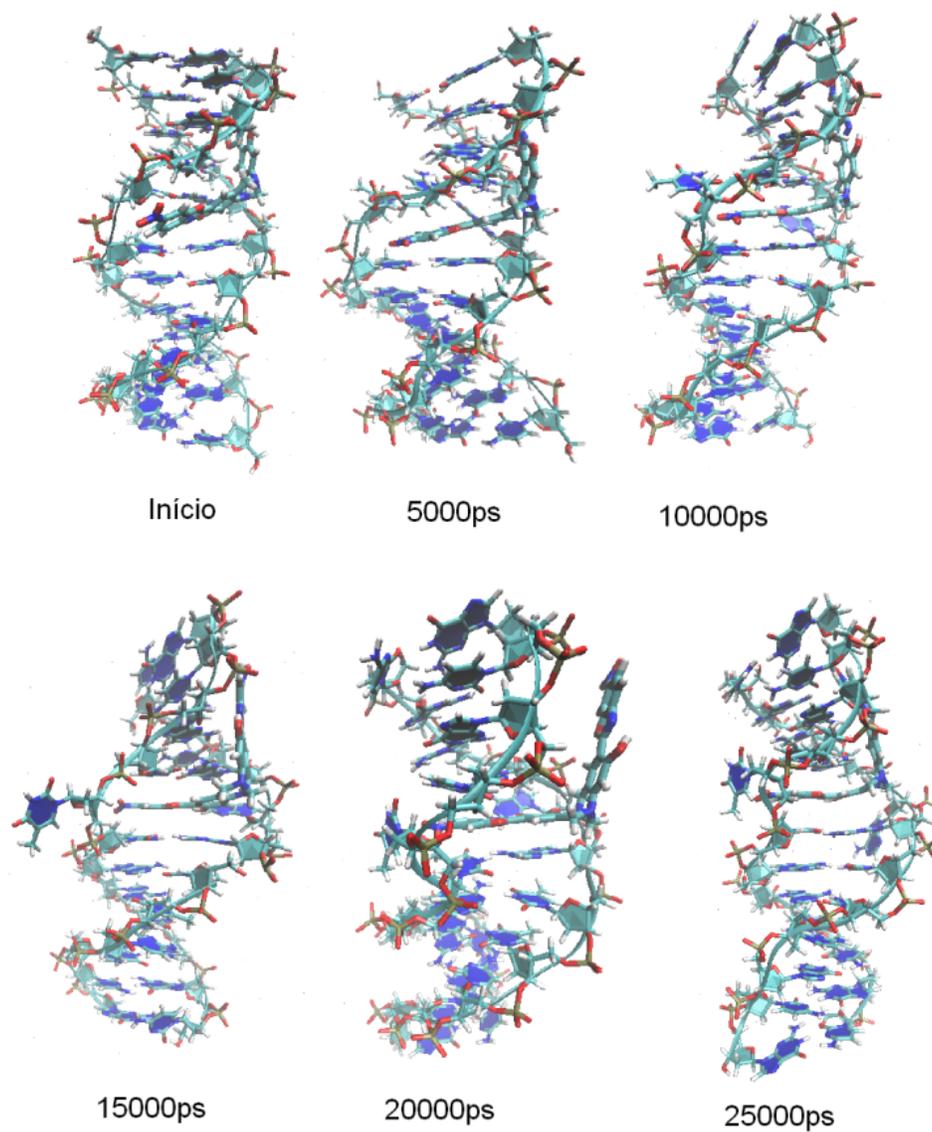


Figura 44: Frames de simulação de DM do complexo **a**, partindo da estrutura *docada* interagindo com o sulco menor para uma forma intercalada.

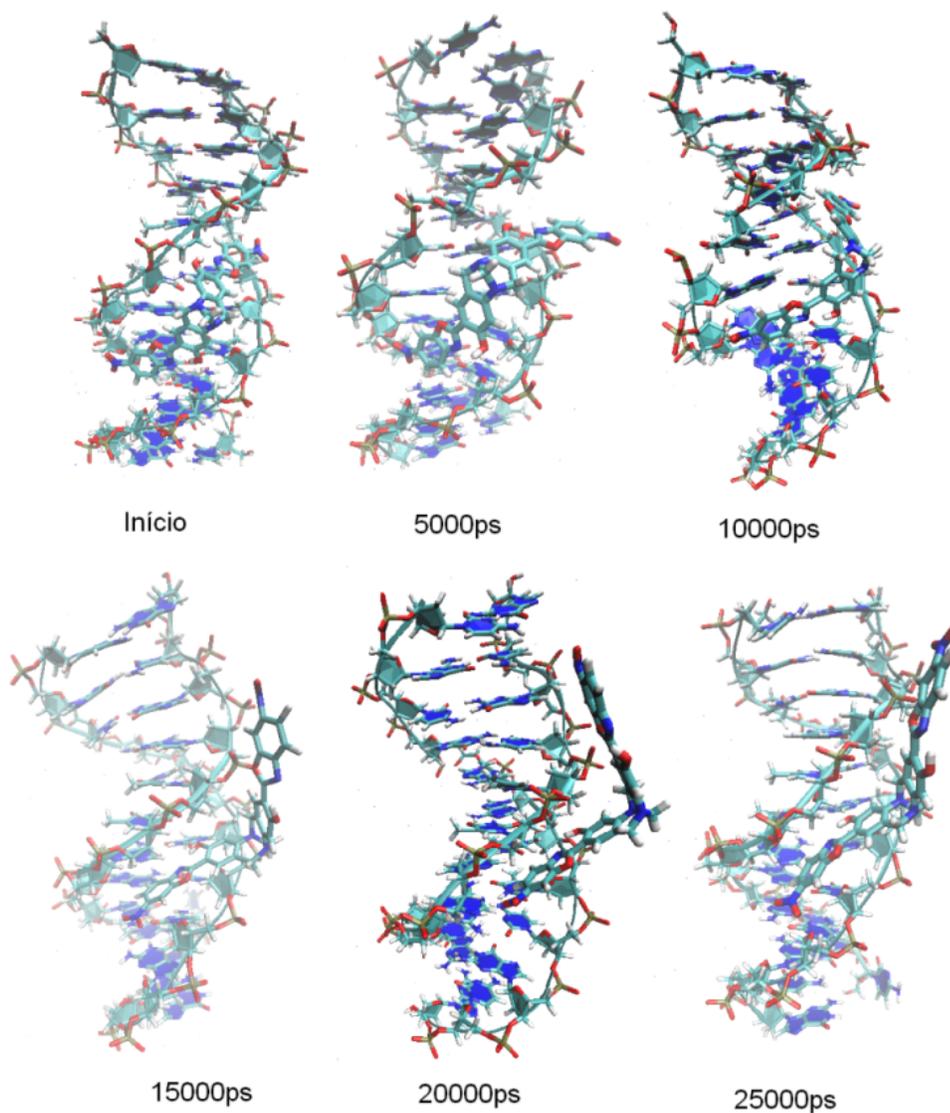


Figura 45: Frames de simulação de DM do complexo **b**, partindo da estrutura docada interagindo com o sulco menor, onde continua interagindo.

Observando os *frames* de simulação dos complexos **b**, **c**, e **d** (Figuras 45, 46 e 47 – respectivamente) verifica-se que os ligantes mantiveram-se interagindo muito próximos as suas posições iniciais, tendo alterações conformacionais nas interações referentes às

relaxações durante as simulações de DM. Os mesmos parecem não terem causado nenhum tipo de desnaturação no oligômero.

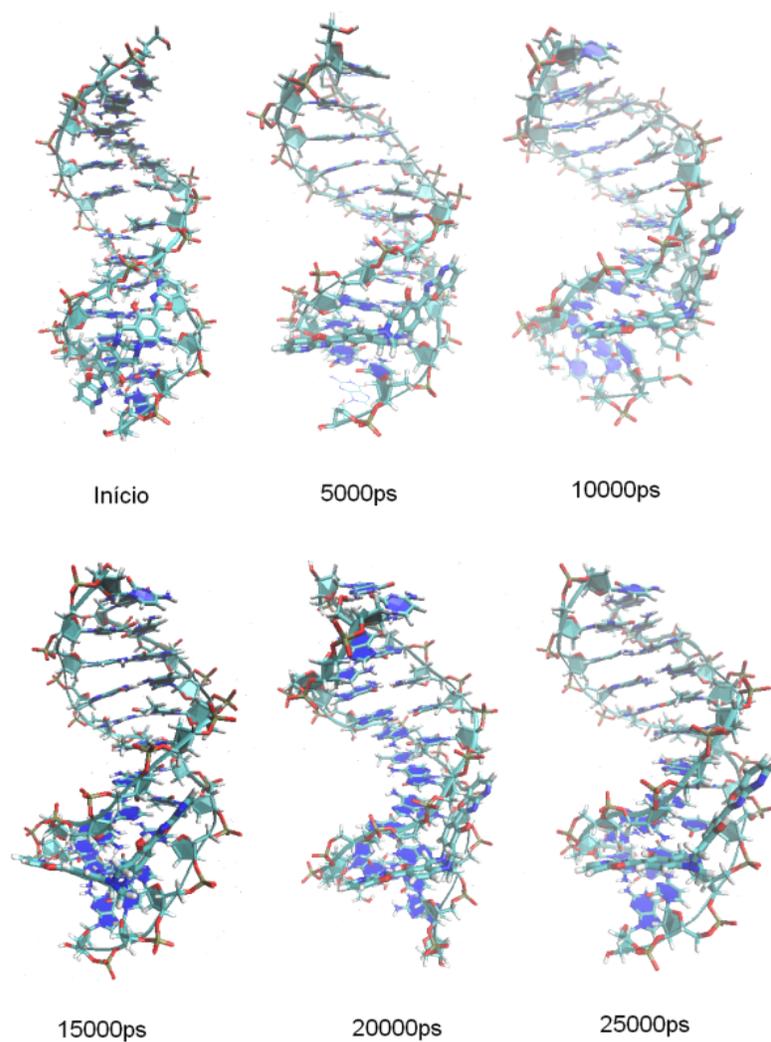


Figura 46: Frames de simulação de DM do complexo **c**, partindo da estrutura docada interagindo com o sulco menor, onde continua interagindo.

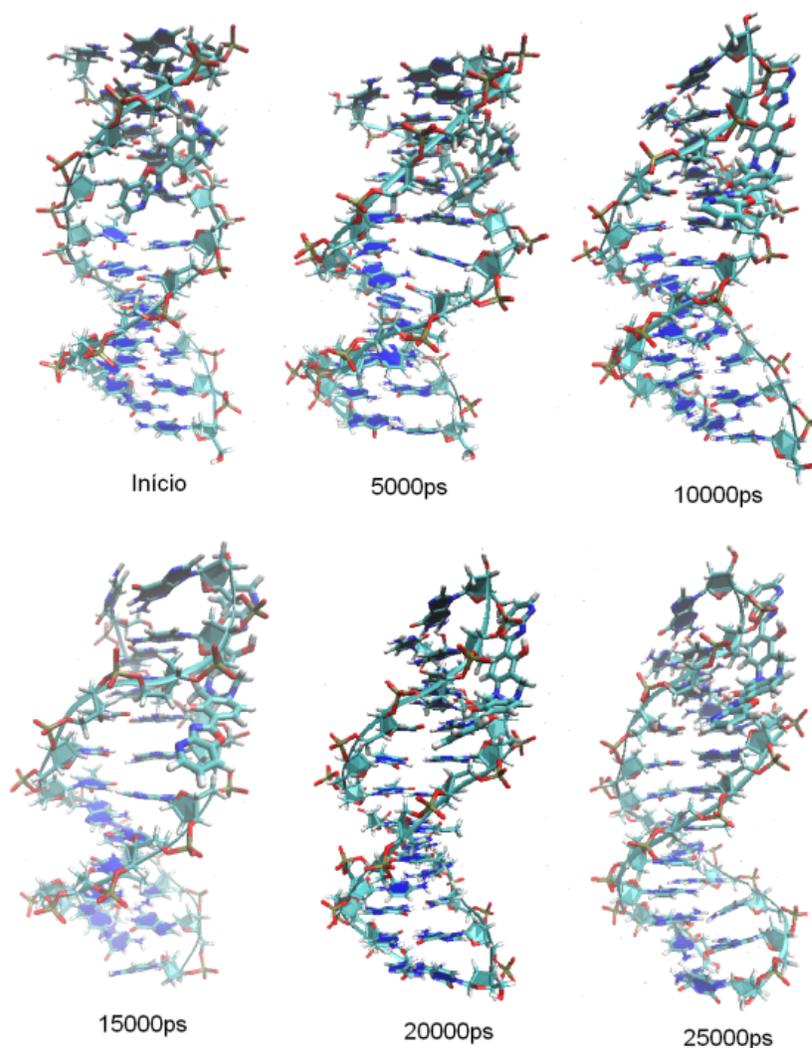


Figura 47: Frames de simulação de DM do complexo **d**, partindo da estrutura docada interagindo com o sulco menor, onde continua interagindo.

8.2.2 Desvio quadrático médio (RMSD)

O monitoramento dos valores de *RMSD* permite verificar se as simulações atingiram a estabilidade e avaliar a estabilidade do oligonucleotídeo, durante as varias etapas da DM, analisando a possível desnaturação. A desnaturação é caracterizada pelo rompimento das ligações de hidrogênio entre os pares de bases canônicos o que resulta na separação da dupla fita.

Nos complexos, onde está presente o ligante *LT*, **a** e **b** com a análise dos gráficos de RMSD (Figura 48) pode-se verificar maiores alterações na estrutura do oligômero complexado com o ligante (**curvas vermelhas**) do que nas curvas que representam o oligonucleotídeo de DNA isolado (**curvas pretas**). No gráfico do complexo **a** nota-se uma variação um pouco maior (atingindo valores de até 0,45nm) o que indica uma alteração maior na estrutura do oligonucleotídeo nessa conformação do que na do complexo **b**. Sendo, que nas duas simulações, o ligante *LT* parte de posições diferentes, mas próximas ao *gap*, com estruturas de docking com interações no sulco.

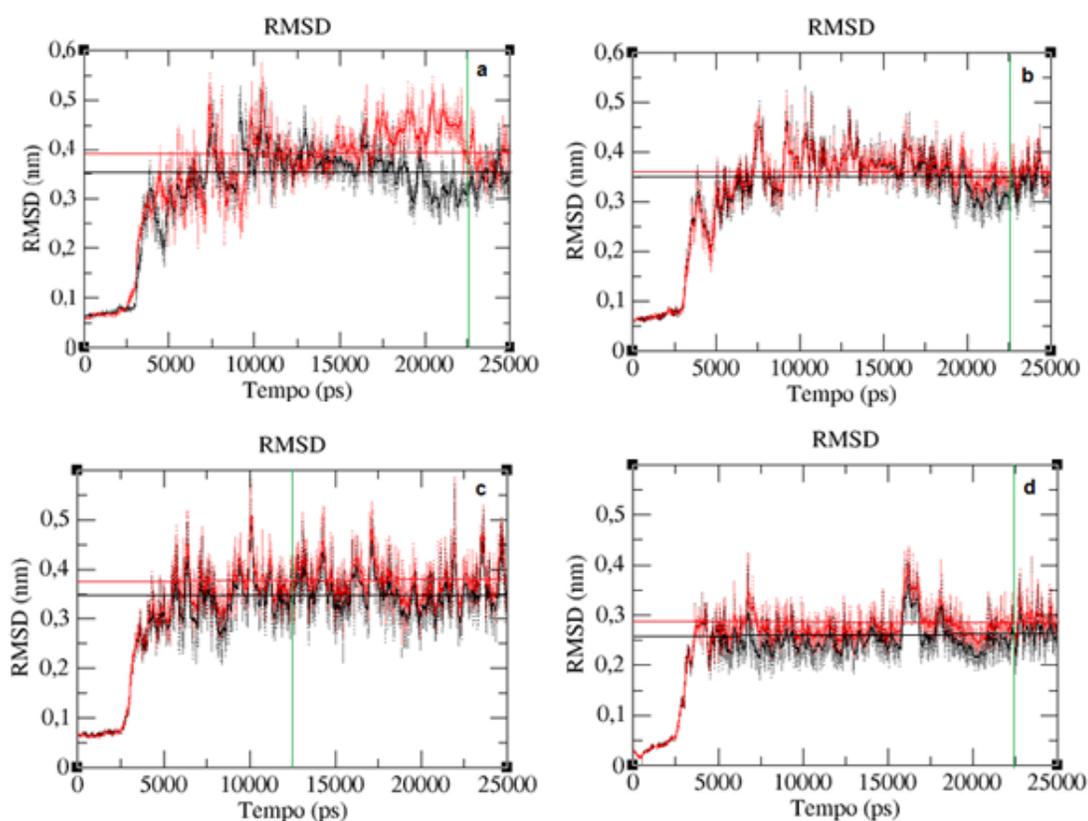


Figura 48: Gráficos de RMSD (desvio médio quadrático). As linhas **pretas** representam os dados do DNA isolado e sua respectiva média; as linhas **vermelhas** representam os dados referentes os complexos **a**, **b**, **c** e **d**; e as linhas **verdes** representam o momento onde as estruturas atingem a estabilidade.

Tabela 3: Resultados estatísticos das análises dos gráficos de RMSD das simulações.

<i>Simulação</i> (<i>complexo</i>)	<i>RMSD_{DNA}</i>		<i>RMSD_{complexo}</i>	
	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
a	0,35	0,04	0,39	0,06
b	0,35	0,04	0,37	0,04
c	0,35	0,05	0,38	0,05
d	0,26	0,04	0,28	0,03

RMSD_{DNA} refere-se a valores (em nm) do desvio quadrático médio do oligonucleotídeo de DNA isolado; *RMSD_{complexo}* são os valores do oligonucleotídeo complexado com os ligantes *LT* e *PT* nas simulações **a**, **b**, **c** e **d**.

Avaliando, visualmente, os *frames* de simulação do complexo **a** e comparando com os dados do seu gráfico de RMSD, as maiores alterações ocorrem após 15000ps onde o ligante *LT* passa de uma interação com o sulco menor para uma interação do tipo intercalação.

Nos gráficos de RMSD dos complexos **b**, **c** e **d** os valores de RMSD do complexo estão sempre com valores (Tabela 3) superiores aos do oligômero isolado, o que indica a incorporação dos ligantes ao oligonucleotídeo. E mesmo com as flutuações e com as interações parecem atingir certa estabilidade (*linhas verdes* – Figura 48) parecendo não causar danos à estrutura do oligômero.

8.2.3 Número de Pares de Bases

Nesse tópico foi analisado o desaparecimento dos pares de bases e/ou a formação de pares não canônicos (não seguem estritamente as ligações de hidrogênio descritas por Watson-Crick), na Figura 49.

Analisando o gráfico **a**, referente ao complexo de mesma letra, nota-se que durante a simulação o oligonucleotídeo de DNA realmente tem o desaparecimento de um ou até mesmo dois pares de bases canônicos, sendo que os valores oscilam durante toda simulação com valores iguais a **10-11** pares canônicos (**colunas pretas**), com eventuais formações de pares não canônicos (**colunas vermelhas**). O que demonstra que realmente o receptor não sofreu desnaturação da dupla hélice e sim alterações conformacionais causadas pela presença do

ligante, o que justifica as flutuações do *RMSD* do oligômero complexado serem maiores que os valores do mesmo estando isolado.

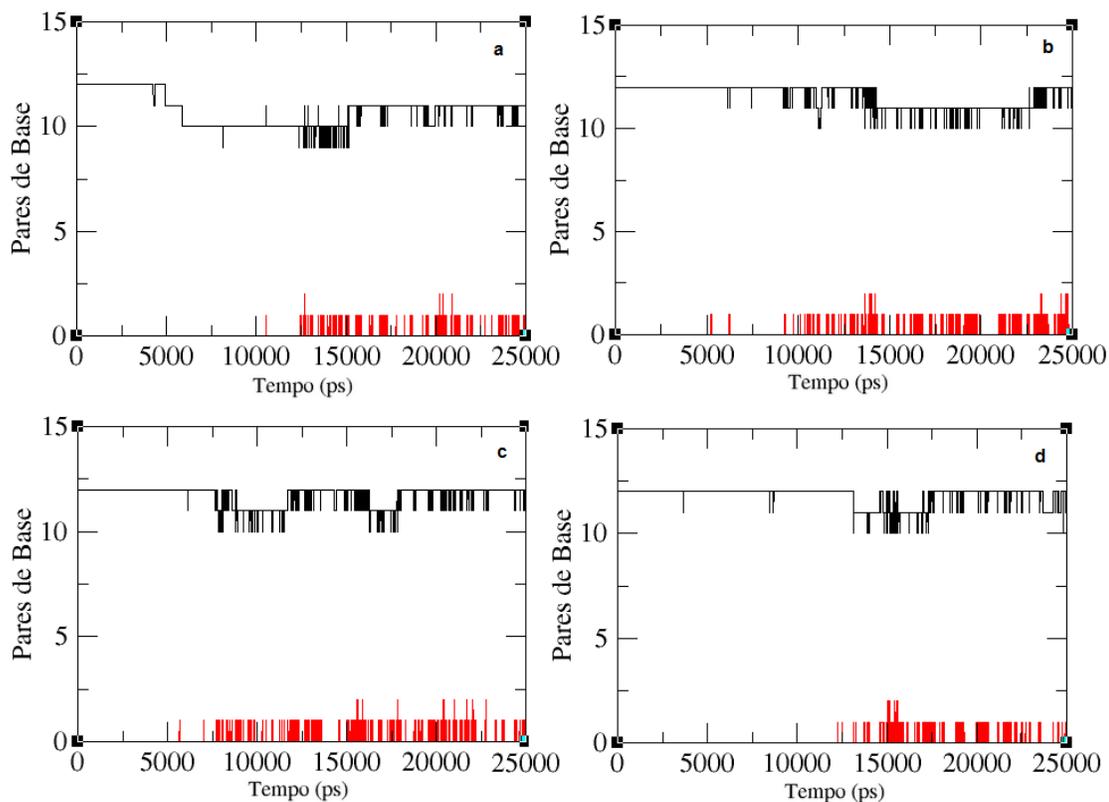


Figura 49: Número de pares de bases ao longo da simulação para os oligonucleotídeos presentes nos complexos **a**, **b**, **c** e **d**. Os pares de bases canônicos são mostrados em *preto*, e os pares de bases não canônicos (não Watson-Crick39) são mostrados em *vermelho*.

Para o complexo **b**, pode-se verificar no gráfico **b** que durante toda simulação, praticamente, o oligômero manteve o número inicial de bases canônicas pareadas, com poucas formações de pares não canônicos (um eventualmente). O mesmo comportamento é verificado nas simulações dos complexos **c** e **d**, nos gráficos com suas respectivas letras, que mantiveram *doze* pares canônicos durante toda simulação. Pode-se constatar então a não desnaturação da dupla hélice.

8.2.4 Análise das distorções do oligonucleotídeo

É possível quantificar algumas alterações estruturais identificadas visualmente na estrutura dos receptores complexados com os ligantes, usando parâmetros bem definidos por *Dickerson e seus colaboradores* (1989) como desenrolamentos, curvaturas e presença do *gap*. Os parâmetros escolhidos para analisar as distorções estão ilustrados na Figura 50.

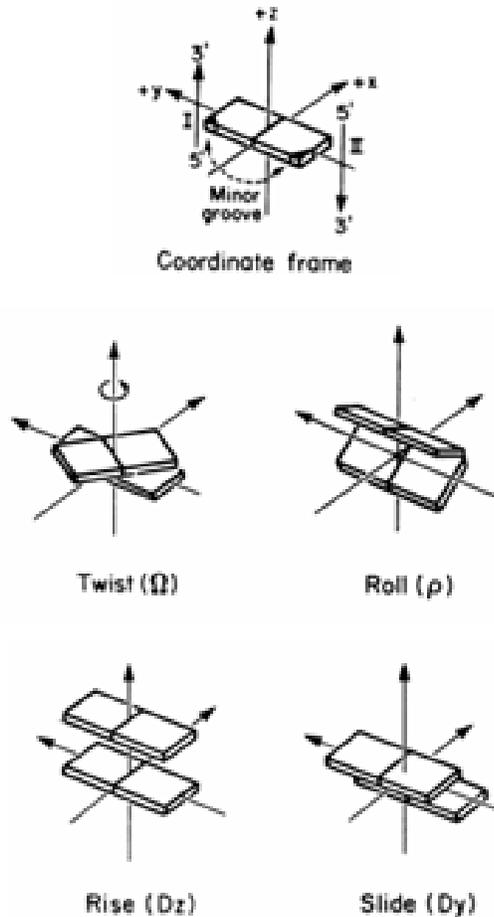


Figura 50: Parâmetros de distorções de pares de bases, propostos por convenção por Dickerson *et. al.*

A análise desses parâmetros e suas combinações em cada parte da dupla hélice determinam as condições estruturais do oligonucleotídeo.

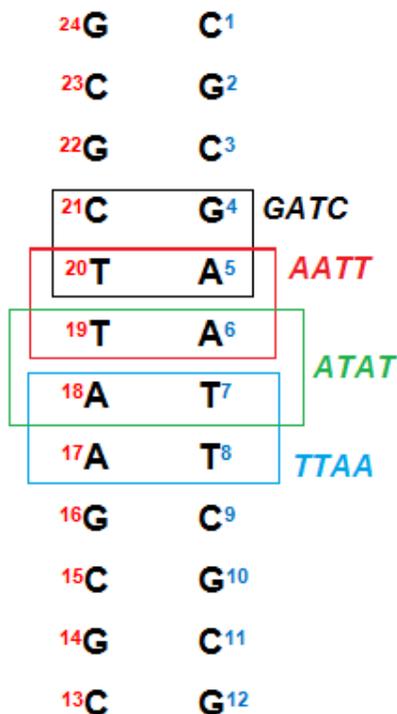


Figura 51: Descrição dos passos da dupla hélice – **GATC**, **AATT**, **ATAT** e **TTAA** – os quais os parâmetros de distorções do oligonucleotídeo foram analisados durante a simulação.

O parâmetro *Twist* descreve os movimentos de rotação no eixo z, que resultam no desenrolamento da dupla hélice, sendo seu valor canônico para a estrutura do oligonucleotídeo B-DNA igual a 35°, aproximadamente.

A presença de um agente intercalador, como no complexo **a** (Figura 52-a), causou uma alteração mais significativa no *Twist* do passo **GATC** demonstrando um aumento superior a 7° (Tabela 4), em relação ao valor canônico, o que define um *enrolamento* dessa região. Na literatura, já foi descrito, que a presença de um intercalador desenrola parcialmente a dupla hélice⁶¹, mas nessa simulação pode-se notar que a presença do ligante *LT* causou o desaparecimento de um par AT no passo **AATT**, que representava o *gap* inicial, durante a rampa de aquecimento do complexo (5000ps). Esse fator pode ter ocasionado mudanças estruturais locais capazes de alterar de forma mais brusca o *Twist* da região

GATC. Enquanto nos outros passos apresentaram valores iguais ou pouco abaixo (Tabela 4) do mesmo valor referencial.

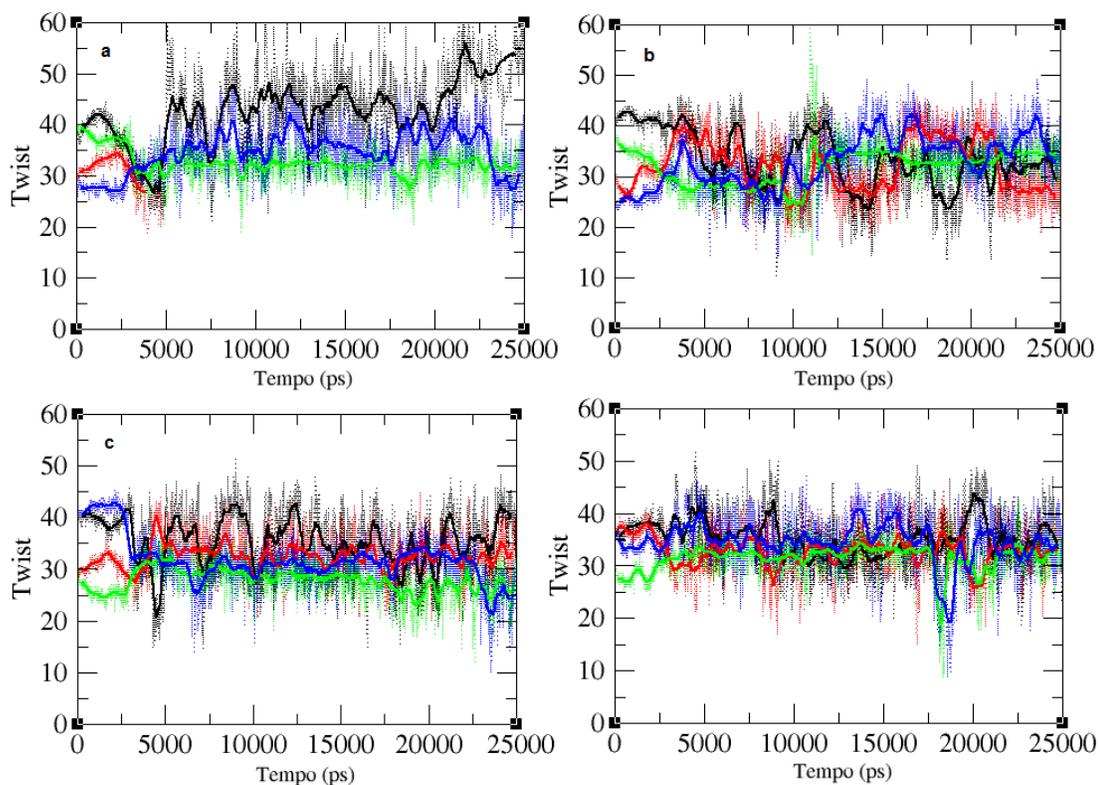


Figura 52: valores de Twist para o oligômero nas simulações dos complexos **a**, **b**, **c** e **d**, representados nos gráficos **a**, **b**, **c**, e **d**, respectivamente. Os passos da dupla hélice analisados estão representados pelas seguintes cores: **GATC**, **AATT**, **ATAT**, **TAA**.

Tabela 4: Valores médios de Twist dos passos de dupla hélice **GATC**, **AATT**, **ATAT**, **TAA**

Simulação (complexo)	Twist (°)							
	GATC		AATT		ATAT		TAA	
	Média	Desvio Padrão						
a	42,38	7,69	-	-	32,34	2,91	34,77	4,95
b	33,10	6,42	32,20	5,86	31,71	4,10	33,16	5,61
c	35,41	6,31	32,47	3,73	27,86	3,29	31,40	4,79
d	35,26	4,96	32,65	3,93	31,34	3,40	34,44	4,97

Twist representa o desenrolamento da dupla hélice, tendo um valor canônico para a forma B, descrito na literatura, aproximadamente igual a 35°.

Nas estruturas que interagiram com no sulco menor do DNA (complexos **b**, **c** e **d**), os valores de *Twist* apresentaram valores muito próximo ao valor canônico, mantendo o enrolamento da dupla hélice praticamente igual aos valores iniciais, sendo que as alterações podem ser associadas às alterações ocorridas durante a rampa de aquecimento. Um dos fatores que pode ter causado as alterações é que o campo de força AMBER é conhecido por subestimar valores de *Twist* em 3-4°.

O parâmetro *Rise* descreve movimentos de translação no eixo *z* (Figura 50), o que mede a distância entre dois pares de bases consecutivos, que se mostra como um dado importante como indicador da presença de um *gap* de intercalação. Para a forma B do oligonucleotídeo os valores canônicos de *Rise* são aproximadamente iguais a 3,4 Å.

Analisando os gráficos **a**, **b**, **c** e **d** (Figura 52), simulações dos complexos **a**, **b**, **c** e **d**, o *gap* modificado no passo **AATT** tem o valor de *Rise* diminuído, rapidamente (~3000ps), de 6,5Å para valores próximos ao valor canônico (Tabela 5), sendo que na simulação do complexo **a** nota-se o desaparecimento da **linha vermelha**, referente ao passo do *gap*, causado pela perda de pareamento no par AT.

Tabela 5: Valores médios de *Rise* (medidos em Å) dos passos de dupla hélice **GATC**, **AATT**, **ATAT**, **TTAA**

<i>Simulação</i> (complexo)	<i>Rise</i> (Å)							
	GATC		AATT		ATAT		TTAA	
	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
a	6,05	1,38	-	-	3,26	0,18	3,26	0,18
b	3,32	0,24	3,73	0,90	3,32	0,38	3,23	0,29
c	3,38	0,30	3,71	1,04	3,07	0,19	3,22	0,22
d	3,43	0,28	3,52	0,94	3,24	0,19	3,33	0,21

Rise representa a distância entre dois pares de bases consecutivos, tendo um valor canônico para a forma B, descrito na literatura, aproximadamente igual a 3,4 Å.

Todos os outros passos, nas quatro simulações, mantiveram-se próximos aos valores canônicos do dodecâmero de B-DNA, com exceção ao passo **GATC** do oligonucleotídeo do complexo **a** o qual atingiu um valor de *Rise* muito próximo a valores de distanciamento entre pares de bases sucessivos com a presença de um intercalador (~6,5Å). Caracterizando a intercalação, no ponto **GATC**, do ligante **LT**.

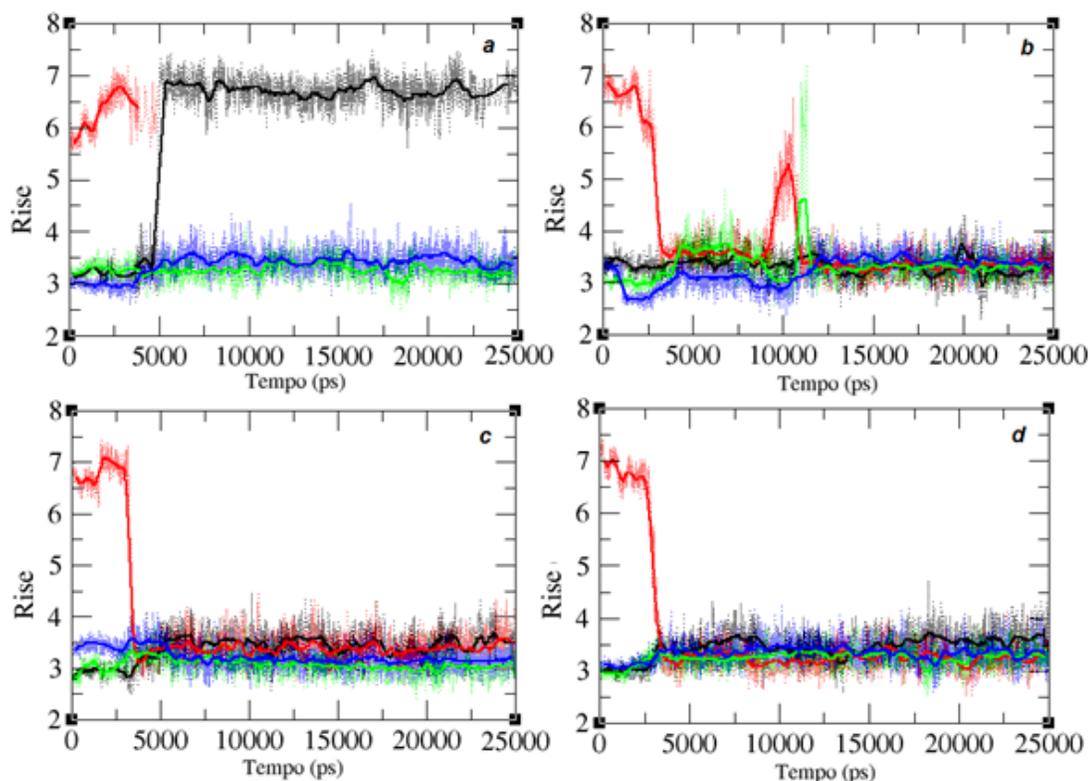


Figura 53: valores de Rise para o oligômero nas simulações dos complexos **a**, **b**, **c** e **d**, representados nos gráficos **a**, **b**, **c**, e **d**, respectivamente. Os passos da dupla hélice analisados estão representados pelas seguintes cores **GATC**, **AATT**, **ATAT**, **TTAA**.

O parâmetro *Slide* representa movimentos de translação no eixo y, que podem causar alterações na largura da hélice, originando uma estrutura mais larga e achatada, e na profundidade dos sulcos, ocasionando uma assimetria na profundidade – tornando o sulco menor mais raso e o sulco maior mais profundo. O modelo descrito por Calladine-Drew, é uma boa forma de exemplificar que alterações nos valores de *Slide* combinados com alterações de *Roll* (esse parâmetro será comentado no próximo tópico) podem causar uma transição da forma B para a forma A do oligonucleotídeo (Figura 54).

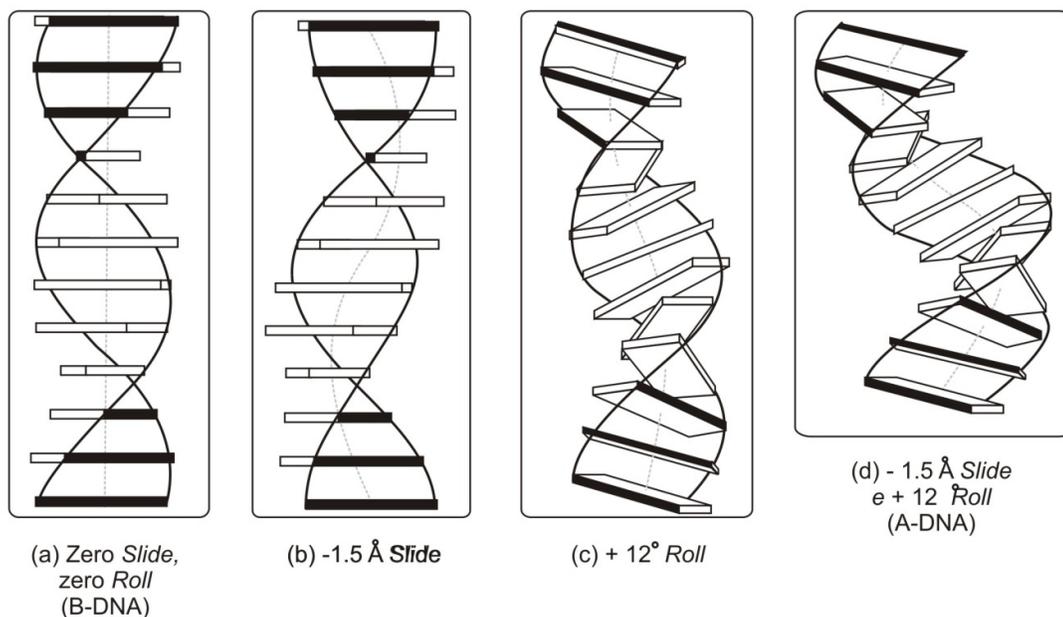


Figura 54: modelo das alterações estruturais do oligonucleotídeo na forma B (a) se transformando na forma A (d), após a aplicação uniforme de -1,5Å de *Slide* (b) e aplicação uniforme de +12° de *Roll* (c).

Sendo assim, o parâmetro *Slide* traz dados úteis para descrever mudanças na geometria dos sulcos causadas pela presença de um ligante interagindo com o oligômero de DNA.

As simulações de todos complexos apresentaram valores médios (Tabela 6) próximos aos valores canônicos da forma B do oligonucleotídeo (Figura 53), com exceção do passo de hélice *GATC* – do complexo **a** – que apresentou valor positivo.

Tabela 6: Valores médios de *Slide* (Å) dos passos de dupla hélice *GATC*, *AATT*, *ATAT*, *TTAA*.

<i>Simulação</i> (complexo)	<i>Slide</i> (Å)							
	<i>GATC</i>		<i>AATT</i>		<i>ATAT</i>		<i>TTAA</i>	
	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
a	0,50	1,33	-	-	-1,18	4,14	-0,37	0,57
b	-0,09	0,58	-0,36	0,68	-0,84	0,35	0,01	0,62
c	-0,16	0,67	-0,65	0,57	-0,83	0,35	-0,65	0,48
d	-0,33	0,68	-0,19	0,70	-0,92	0,37	-0,44	0,54

Slide representa alterações de translação no eixo y capaz de causar modificações na profundidade dos sulcos. Valores de *Slide* forma B (0Å) e da forma A (-1,5Å).

Os valores de *Slide*, com exceção do passo *GATC* do complexo **a**, mostram que de uma forma geral apresentam um pequeno afastamento das bases em relação ao eixo da dupla hélice, o que resulta em um sulco maior mais profundo e um sulco menor mais raso. Os gráficos de *Slide* estão representados na Figura 55, onde no gráfico **a** (que representa a simulação do complexo **a**) pode-se verificar a maior flutuação (positiva) no passo *GATC* (linha preta).

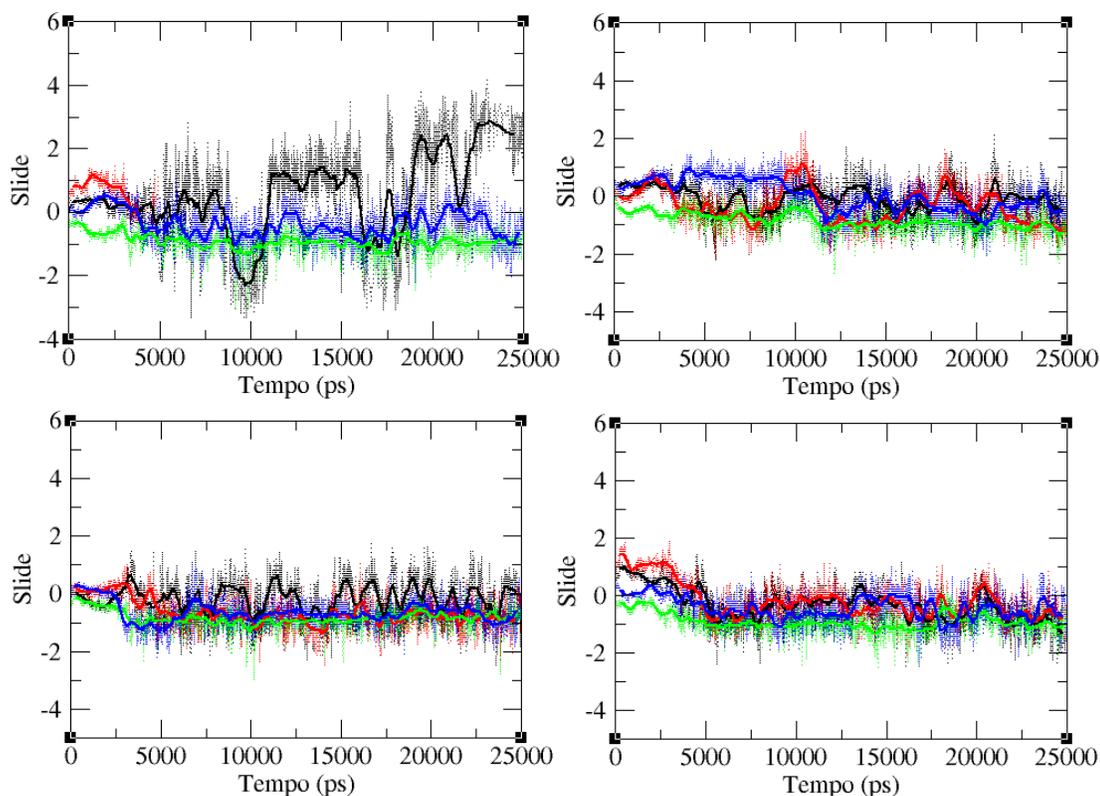


Figura 55: valores de *Slide* para o oligômero nas simulações dos complexos **a**, **b**, **c** e **d**, representados nos gráficos **a**, **b**, **c**, e **d**, respectivamente. Os passos da dupla hélice analisados estão representados pelas seguintes cores: *GATC*, *AATT*, *ATAT*, *TTAA*.

O parâmetro *Roll*, representa curvaturas, ou seja, movimentos de rotação no eixo *y* sendo que a aplicação de valores positivos de *Roll* também afetam as dimensões da largura dos sulcos, estreitando o sulco maior e alargando o menor (Figura 56).

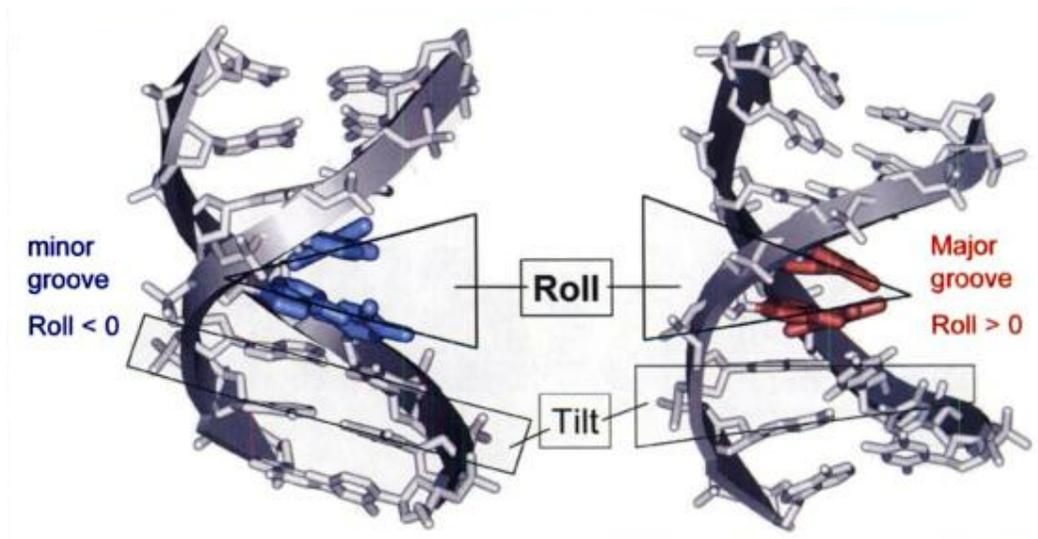


Figura 56: As imagens são baseadas em uma estrutura cristalográfica de B-DNA; em **vermelho** uma curvatura para dentro do sulco maior – **Roll positivo**; em **azul** curvatura para dentro do sulco menor – **Roll negativo**.

Analisando os valores médios (Tabela 7) do parâmetro *Roll* nas simulações dos complexos **a**, **b**, **c** e **d** (Figura 56) todos os oligômeros apresentaram valores próximos aos valores da forma B canônica do oligonucleotídeo, ou seja, valores variando próximo a zero. No complexo **a**, no qual pode ser visualizada uma interação do tipo mista, em que parte do ligante está interagindo como intercalador e a outra parte interage com o sulco menor, não se detecta grandes alterações no *Roll*. Já nos complexos onde os ligantes ficaram interagindo com o sulco menor, os valores de *Roll* são mais positivos o que define que o sulco maior foi estreitado e o sulco menor alargado para acomodar o ligante.

Tabela 7: Valores médios de *Roll* dos passos de dupla hélice *GATC*, *AATT*, *ATAT*, *TTAA*.

<i>Simulação (complexo)</i>	<i>Roll</i>							
	<i>GATC</i>		<i>AATT</i>		<i>ATAT</i>		<i>TTAA</i>	
	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>						
a	0,12	6,77	-	-	-1,18	4,14	2,43	4,37
b	3,43	5,69	6,27	11,08	1,07	5,79	3,25	4,86
c	3,40	4,88	3,67	4,86	3,86	4,11	4,24	4,76
d	0,20	4,41	5,83	7,35	-0,61	3,67	1,24	4,11

Roll representa alterações de rotação no eixo y capaz de causar modificações na profundidade dos sulcos. Valores de *Roll* forma B (0°) e da forma A (+12°).

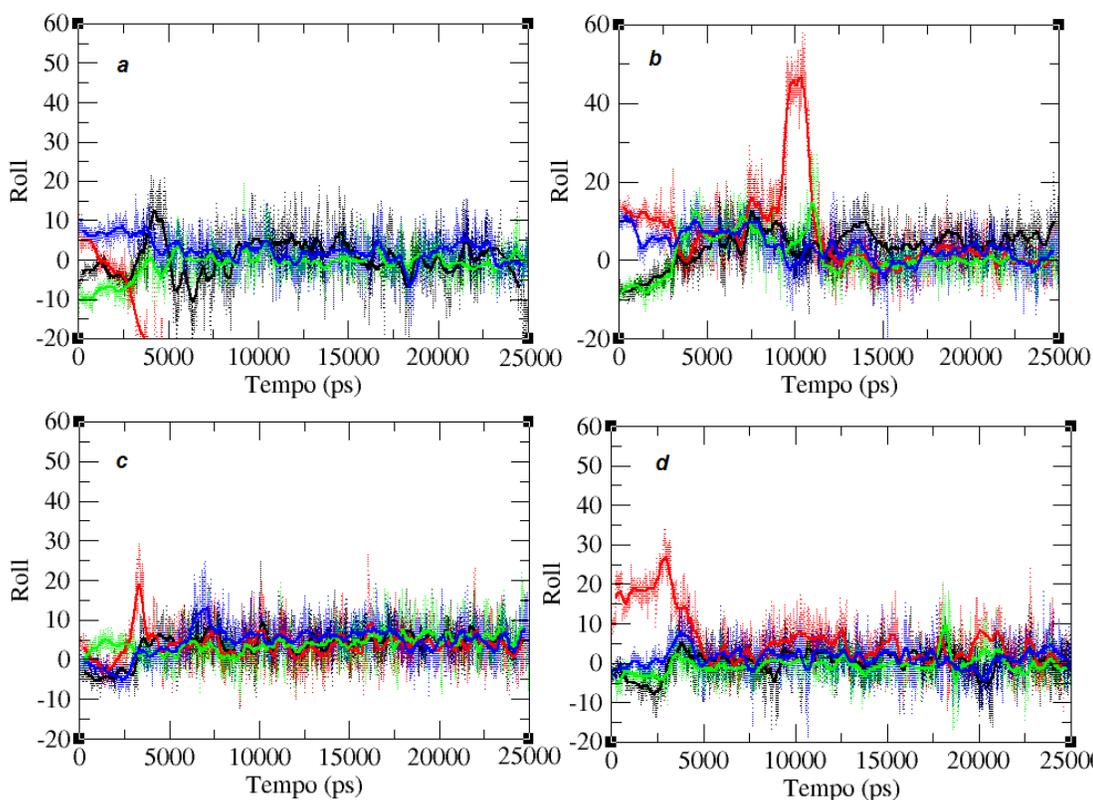


Figura 57: valores de Roll para o oligômero nas simulações dos complexos **a**, **b**, **c** e **d**, representados nos gráficos **a**, **b**, **c**, e **d**, respectivamente. Os passos da dupla hélice analisados estão representados pelas seguintes cores: *GATC*, *AATT*, *ATAT*, *TTAA*.

De maneira geral, a análise das distorções dos oligonucleotídeos complexados com os ligantes (complexos **a**, **b**, **c**, **d**), mostram-se mais significativas para os parâmetros *Twist* e *Rise* para o complexo **a**, onde o ligante *LT* forma um novo gap de intercalação e acaba com uma forma mista de interação. Enquanto nos demais complexos, nos quais os ligantes estão interagindo com o sulco menor, ocorrem alterações mais significativas nas dimensões dos sulcos (parâmetros *Slide* e *Roll*).

9 CONCLUSÕES

Durante esse trabalho foram estudadas as formas de interação de dois novos análogos das Bases de Tröger fluorescentes com oligonucleotídeos de DNA, através de métodos de docking e dinâmica molecular.

Mesmo com muitos indícios experimentais da capacidade das Bases de Tröger interagirem com oligonucleotídeos de forma enantiosseletiva segundo Tatibouët *et. al.* (1999), Bailly *et. al.* (1999) e Baldeyrou *et. al.* (2000), o modo com que as Bases de Tröger interagem com os ácidos nucleicos não foi elucidado de maneira conclusiva. A utilização da dinâmica molecular para elucidar a forma de interação entre diferentes ligantes e oligonucleotídeos de DNA tem se mostrado como uma ferramenta eficiente quando os dados teóricos são comparados com estruturas cristalográficas existentes. A dinâmica molecular necessita de um ponto de partida (dados cristalográficos) para as simulações. A falta de tais dados, no caso das Bases de Tröger, sugere que o docking molecular se apresenta como um bom método para propor uma maneira de resolver as formas de interação para produção das estruturas que sirvam como ponto de partida para as simulações de dinâmica molecular Ricci *et. al.* (2009).

A análise dos resultados dos dockings dos novos análogos das Bases de Tröger com o receptor (o dodecâmero de B-DNA modificado com um *gap* de intercalação) sugere que esses compostos apresentam seletividade pela interação com o sulco menor do oligonucleotídeo, mesmo com a presença de um *gap* artificial de intercalação e a planaridade dos substituintes que previamente sugeriam uma tendência à intercalação. Tendo em vista que a energia livre mínima de interação de cada uma das simulações apresentou-se com valor razoavelmente negativo, o que é um bom indício de uma forte interação entre o ligante e o receptor.

Para as simulações de dinâmica molecular foram selecionados os *clusters* gerados nos dockings, classificados com as menores energias e conformações mais repetitivas em uma determinada região do oligômero. Para o ligante *LT* foram analisados os complexos **a** e **b** e para o ligante *PT* foram acompanhados os complexos **c** e **d**.

Na maioria das simulações de dinâmica molecular (complexos **b**, **c** e **d**) os ligantes mantiveram-se interagindo com o sulco menor do receptor, sendo que nenhum apresentou como resultado o rompimento das interações de hidrogênio dos pares de bases (mantendo os

pareamentos de bases canônicos e eventualmente com a formação de pares de bases não Watson-Crick). A estabilidade do oligonucleotídeo, nessas três simulações, foi atingida próximo aos 5ns finais de simulação, como descrito nos resultados do desvio quadrático médio (*RMSD*). Ainda sobre a estabilidade do receptor, nas três simulações (**b**, **c** e **d**), o *gap* criado artificialmente se fecha logo nos três primeiros nanossegundos de simulação, mantendo o parâmetro *Rise* com valores muito próximos aos valores canônicos descritos para a forma B do oligonucleotídeo. O mesmo ocorre com os valores de *Twist*, os ligantes não foram capazes de causar um desenrolamento da dupla hélice. Para o parâmetro *Slide*, os valores desses três complexos apresentaram valores levemente negativos indicando um pequeno distanciamento das bases em relação ao eixo da dupla hélice, sugerindo alterações do oligonucleotídeo como uma transição da forma B para a forma A. O parâmetro *Roll* nessas três simulações apresentaram características comuns onde o receptor está complexado com um ligante, interagindo com o sulco menor da molécula, apresentando valores de *Roll* positivo indicando que, nesses casos, ocorre um alargamento do sulco menor e um estreitamento do sulco maior, ocasionado pela curvatura na direção do sulco maior (*Roll* > 0).

Já a simulação do complexo de docking **a**, apresentou maiores flutuações em relação ao *RMSD* que podem ser o resultado de uma transição, na qual o ligante inicialmente interagia com o sulco menor do oligonucleotídeo e passa a interagir com o receptor na forma de intercalação. Com isso nota-se que durante a simulação foi desfeita a interação entre um par de bases AT, no qual a base *T* se distancia de sua posição inicial. Logo a análise do parâmetro *Rise* revela a perda do par de bases sendo que o passo **AATT** “desaparece” logo nos primeiros instantes de simulação. Ainda na análise deste parâmetro, nota-se um aumento no distanciamento entre os pares de bases do passo de hélice **GATC**, formando no decorrer da simulação um novo *gap* de intercalação, que precisa ser mais bem analisado quanto ao distanciamento (*g_dist*) dos centros de massa dos pares de bases envolvidos nesse passo de dupla hélice. Os resultados referentes ao desenrolamento da dupla hélice (*Twist*) mostram-se de forma geral próximo aos valores canônicos já descritos, a não ser por uma alteração mais brusca no passo **GATC** onde ocorre certo enrolamento da dupla hélice, ocasionado pela presença do intercalador ou até mesmo pelo efeito do despareamento das interações descritas anteriormente, que pode ter afetado diversos dados estruturais durante a simulação. Com relação aos resultados dos parâmetros *Roll* e *Slide*, não foram detectados grandes alterações

estruturais, apenas com algumas flutuações descritas nos gráficos e nos resultados anteriormente. Com isso, nessa simulação, o ligante *LT*, no complexo **a**, a Base de Tröger foi capaz de assumir uma orientação favorável para intercalação durante sua trajetória.

De acordo com os resultados a interação com o sulco menor (complexos **b**, **c** e **d**) parece ser o modo de interação preferencial das Bases de Tröger estudadas, mas que apresentam a possibilidade de se colocarem de forma orientada, no sentido dos pares de bases e forçar a abertura de um *gap*, sugerindo uma interação do tipo intercalação (complexo **a**) como proposto por alguns estudos experimentais.

Através da análise das simulações, mesmo com formas variadas de interação entre as Bases de Tröger e o oligonucleotídeo, confirmam a potencial aplicação desses compostos como estruturas capazes de serem utilizadas como sondas de DNA.

REFERENCIAS

- 1) Abella, C.A.M.; Rodembusch, F.S.; Stefani, V. *Tetrahedron Letters*, 45, 5601-5604, **2004**.
- 2) Abonia, R.; Rengifo, E.; Quiroga, J.; Insuasty, B.; Sánchez, A.; Cobo, J.; Low, J.; Noguerras, M. *Tetrahedron Lett.* 43, 5617-5620, **2002**.
- 3) Amorim, H. L. N.; Netz, P. A. *Molecular Dynamics Simulations of Proteins: Theory and Applications*. (Trabalho não publicado).
- 4) Bag, B. G.; Maitra, U. *Synth. Commun.* 25 (12),1849-1856, **1995**.
- 5) Bailly, C.; Laine, W.; Demeunynck, M.; Lhomme, J. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 681-685, **2000**.
- 6) Baldeyrou, B.; Tardy, C.; Bailly, C.; Colson, P.; Houssier, C.; Charmantray, F.; Demeunynck, M. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 325-322, **2002**.
- 7) Batista, P.R.; Wilter, A.; Durham, E.H.A.B.; Pascutti, P.G. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 44, 395-404, **2006**.
- 8) Calladine, C.R.; Drew, H.R. *Journal of Molecular Biology*, 178, 773-782, **1984**.
- 9) Carrée, F.; Pardo, C.; Galy, J. P.; Boyer, G.; Robin, M.; Elguero, J. *ARKIVOV*, 1, 1-8, **2003**.
- 10) Deprez, N. R.; McNitt, K. A.; Petersen, M. E.; Brown, R. G.; Lewis, D. E. *Tetrahedron Lett.*, 46, 2149, **2005**.
- 11) Dickerson, R. E. *The EMBO journal*, 8, 1-4, **1989**.
- 12) Dickerson, R.E.; Ng, H.-L. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 6986-6988, **2001**.
- 13) Dolenský, B.; Elguero, J.; Král, V.; Prado, C.; Valík, M. Current Träger's Base Chemistry. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, v. 93, p. 1-56, **2007**.
- 14) Farah, S. B. *DNA: segredos e mistérios*, Sarvier, São Paulo, **2007**.
- 15) Fukae, M.; Inazu, T. *J. Incl. Phenomena*, 2, 223, **1984**.
- 16) Gaussian 98 (Revision A.1x), Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, Jr., J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M.

C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **2001**.

17) GaussView, Version 4.1, Dennington II, Roy; Keith, Todd; and Millam John; *Semichem, Inc., Shawnee Mission, KS, 2007*.

18) Goldberg, Y.; Alper, H. *Tetrahedron Lett.* 36, 369-372, **1995**.

19) Hannon, M.J. *Chemical Society Review*, 36, 280-295, **2007**.

20) Hesse, G.; Hagel, R. *Liebigs Ann. Chem.* 996, **1976**.

21) Huey, R.; Morris, G.M.; Olson, A.J.; Goodsell, D.S. *Journal of Computational Chemistry*, 28, 1145-1152, **2007**.

22) Hurley, L.H. *Nature Reviews Cancer*, 2, 188-199, **2002**.

23) Jensen, J.; Tejler, J.; Warnmark, K. *J. Org. Chem.*, 67, 6008-6014, **2002**.

24) Johnson, R. A.; *U.S. Patent* 1984, n° 4447607.

25) Johnson, R. A.; Gorman, R. R.; Wnuk, R. J.; Crittenden, N. J.; Aiken, J. W. *J. Med. Chem.*, 36, 3202-3206, **1993**.

26) Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R.; Bajorath, J. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 935-949, **2004**.

27) Klein, J.; Hartenstein, H.; Sicker, D. *Magn. Reson. Chem.*, 32, 727, **1994**.

28) Larson, S. B.; Wilcox, C. S. *Acta Crystallogr. Sect C*, 224-227, **1986**.

29) Mark, P.; Nilsson, L. *J. Phys. Chem. A*, 105, 9954-9960, **2001**.

30) Mason, S. F.; Vane, G. W.; Schofield, K.; Wells, R. J. Whitehurst, J. S. *J. Chem. Soc. B*; 553, **1967**.

31) Miller, T. R.; Wagner, E. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 832, **1941**.

- 32) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.*, *19*, 1639-1662, **1998**.
- 33) Mukherjee, A.; Lavery, R.; Bagchi, B.; Hynes, J. T. *J. AM. CHEM. SOC.*, *130*, 9747-9755, **2008**.
- 34) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M. *Molecules*, *14*, 1725-1746, **2009**.
- 35) Olson, W.K.; Zhurkin, V.B. *Current Opinion in Structural Biology*, *10*, 286-297, **2000**.
- 36) Palchaudhuri, R.; Hergenrother, P. J. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*, 497-503, **2007**.
- 37) Prelog, V.; Wieland, P. *Helv. Chim. Acta*, *27*, 1127, **1944**.
- 38) Ricci, C. G. *Investigação computacional dos Mecanismos de Interação entre Bases de*
- 39) *Tröger e o DNA*. Dissertação de Mestrado – UFRGS, **2010**.
- 40) Ricci, C. G.; Netz, P. A., *J. Chem. Inf. Mod.* *49*, 1925, **2009**.
- 41) Ricci, C. G.; Andrade, A. S. C, Mottin, M. e Netz, P. A. *J. Phys. Chem. B*, *114*, 9882, **2010**.
- 42) Sanner, M. F. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, *17*, 57-51, **1999**.
- 43) Shaikh, S. A.; Jayaram, B. *Supercomputing Facility for Bioinformatics and Computational Biology*.
- 44) Smith, L. I.; Schubert, W. M. *J. Am. Chem. Soc.*, *70*, 2656, **1948**.
- 45) Solis, F.J.; Wets, J.-B. *Mathematics of Operations Research*, *6*, 19-30, **1981**.
- 46) Spielman, M.A. The structure of Troger's base. *Journal of American Chemical Society*, *v. 57*, p. 583-585, **1935**.
- 47) Šponer, J.; Lankaš, F. *Computational Studies of RNA and DNA*, Springer, *2*, **2006**.
- 48) Stiboravá, M.; Sejbál, J.; Aimová, D.; Poljaková, J.; Forsterová, K.; Rupertová, M.; Wiesner, J.; Hudeček, J.; Wiessler, M.; Frei, E.; *Cancer Research*, *15*, 8374, **2004**.
- 49) Strathern, P. *Crick, Watson e o DNA em 90 minutos*. Jorge Zahar Ed., Rio de Janeiro, **2001**.
- 50) Sucholeiki, I.; Lynch, V.; Phan, L.; Wilcox, C. S. *J. Org. Chem.*, *53*, 98, **1988**.

- 51) Tatibouët, A.; Demeunynck, M.; Andraud, C.; Collet, A.; Lhomme, J. *Chemical Communications*, 161-162, **1999**.
- 52) Tröger, J. Ueber einige mittelst nascirenden formaldehydes entstehende basen. *Journal für Praktische Chemie*, v. 36, p. 225-245, **1887**.
- 53) Valik, M.; Malina, J.; Palivec, L.; Foltýnová, J.; Tkadlecová, M.; Urbanová, M.; Brabec, V.; Král, V. *Tetrahedron Lett.*, 62, 8591-8600, **2006**.
- 54) Valik, M.; Strongin, R.M.; Král, V. Tröger's base derivatives – new life for old compounds. *Supramolecular Chemistry*, v. 17, p. 347-367, **2005**.
- 55) van Gunsteren, W.F; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D.P.; Glättli, A.; Hünenberger, P.H.; Kastenholtz, M.A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N.F.A.; Yu, H.B. *Angewadte Chemie International Edition*, 45, 4064-4092, **2006**.
- 56) Vardelle, E.; Mingot, A. M.; Jouannetaud, M. P.; Jacquesy, J. C.; Marrot, J. *Tetrahedron Letters* 50, 1093-1096.
- 57) Veale, E. B.; Frimannsson, D. O.; Lawler, M.; Gunnlaugsson, T. *Organic Lett.*, 11, 4040-4043, **2009**.
- 58) Vermillion-Salsbury, R. L.; Hercules, D. M. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 1575-1581, **2002**.
- 59) Wagner, E. C. *J. Org. Chem.*, 19, 1862, **1954**.
- 60) Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. *J. Comput. Chem.*, 25, 1157-1174, **2004**.
- 61) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 25, 247-260, **2006**.
- 62) Watson, J.D.; Crick, F.H.C. *Nature*, 171, 737-738, **1953**.
- 63) Webb, T. H.; Suh, H.; Wilcox, C. S. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 8554, **1991**.
- 64) Webb, T. H.; Wilcox, C. S. *Acta Crystallogr., Sect. C*, C42, 224-227, **1986**.
- 65) Wilcox, C. S. *Tetrahedron Lett.* 26, 5749-5752, **1985**.
- 66) Wilcox, C. S.; Cowart, M. D. *Tetrahedron Lett.* 27, 5563-5566, **1986**.
- 67) Wu, H.; Zhang, P.; Shen, Y.; Zhang, F.; Wan, Y.; Shi, D. *SYNLETT*, 2, 336-338, **2007**.

- 68) Yashima, E.; Akashi, M.; Miyauchi, N. *Chemistry Letters*, p. 1017-1020, **1991**.
- 69) Zeglis, B.M.; Pierre, V.C.; Barton, J.K. *Chem. Commun*, 4565-4579. **2007**.