

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
GRUPO DE QUÍMICA TEÓRICA**

**“DINÂMICA MOLECULAR DO FÁRMACO ANTITUMORAL  
ECTEINASCIDINA E SUA INTERAÇÃO COM O DNA”**

**Alex Sandro Cardoso de Andrade**

**Defesa de Dissertação apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como parte dos requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Química.**

**Porto Alegre, Abril de 2008**

**“DINÂMICA MOLECULAR DO FÁRMACO ANTITUMORAL  
ECTEINASCIDINA E SUA INTERAÇÃO COM O DNA”**

Alex Sandro Cardoso de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Paulo Augusto Netz.

Banca Examinadora:

---

Hubert Karl Stassen

---

Paolo Roberto Livotto

---

Osmar Norberto de Souza

Dedico este trabalho aos meus pais Kleber e Rut, cuja honra, carinho e dignidade sempre me servirão de exemplo. Além de me ensinarem a não desistir e enfrentar os momentos difíceis. Muito obrigado, com amor...

## AGRADECIMENTOS

- Ao professor Paulo A. Netz, que sempre conduziu a pesquisa com maestria, pela oportunidade e pela confiança em mim depositadas durante todo o meu percurso (desde a graduação) até a pós-graduação.
- Aos professores Hubert Karl Stassen, Paolo Roberto Livotto e Osmar Norberto de Souza por terem tão gentilmente aceito o convite para a apreciação deste trabalho.
- A minha colega Melina Mottin, pela valiosa ajuda e dedicação com este trabalho.
- Aos meus colegas do laboratório de química teórica, Jones, Alvaro, Clarisse, Elisa, Paulo Gonçalves, Leandro, pelo companheirismo.
- A Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, em especial o Grupo de Química Teórica e Computacional por possibilitar a utilização de equipamentos necessários para a realização deste trabalho.



## LISTA DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS.

Simulação dinâmica molecular de complexos Ecteinascidina-DNA: energias de interação e formação de complexo covalente. – 31<sup>a</sup> Reunião Anual de SBQ – Águas de Lindóia – Julho/2008.

Estudo das interações e alterações estruturais induzidas em complexos DNA-Ecteinascidina via Dinâmica Molecular – 14<sup>a</sup> Simpósio Brasileiro de Química Teórica – Poços de Caldas – Novembro de 2007.

Simulação da Interação de Oligonucleotídeos com o Fármaco Antitumoral Ecteinascidina: Caracterização Estrutural e Termodinâmica – 30<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ – Águas de Lindóia – Junho/2007.

Simulação Dinâmica Molecular de Oligonucleotídeos: Caracterização Estrutural – 14<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQSul – Erechim – Novembro/2006.

Dinâmica Molecular do Fármaco Antitumoral Ecteinascidina e sua Interação com o DNA – 29<sup>o</sup> Reunião Anual da SBQ – Águas de Lindóia – Maio/2006.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Simulação via dinâmica molecular.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.1. Campo de força.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2. Condição periódica de contorno.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.3. Interações de longo alcance.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.4. Constraints e restraints: shake e lincs.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5. Termostato e barostato.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2. Ácidos nucleicos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3. O Fármaco antitumoral ecteinascidina.....</b>	<b>36</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Análises realizadas.....</b>	<b>46</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1. Resultados da ET 743.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2. Resultados dos oligonucleotídeos em solução.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3. Resultados para os complexos não covalentes na aproximação.....</b>	<b>63</b>
<b>5.4. Resultados para os complexos não covalentes no afastamento.....</b>	<b>73</b>
<b>5.5. Resultados para os complexos covalentes.....</b>	<b>85</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
1. (a) Estrutura da ET743, consistindo em três anéis tetraidroisoquinolínicos fundidos. (b) Representação da espécie marinha <i>Ecteinascidia Turbinata</i> de onde é isolado o fármaco.	13
2. Estruturas da ET743 e saframicina A. Os grupos cabinolaminas são indicados pelas linhas tracejadas. Subunidades A-, B- e C- da ET743 e saframicina estão marcadas em azul, verde e laranja, respectivamente.	13
3. Princípio do estiramento médio da ligação entre os átomos i e j.	19
4. Princípio da rotação torcional para os diedros próprios	20
5. Replicação da caixa de simulação em duas dimensões em função da condição Periódica de Contorno (PBC) aplicada. A direita temos um exemplo de um Box de simulação contendo águas (vermelho/branco) envolta do DNA (azul).	23
6. Aplicação da convenção da imagem mínima.	24
7. Raio de corte esférico e convenção da imagem mínima para um sistema periódico bidimensional.	25
8. Composição do DNA: (a) estrutura geral de um desoxirribonucleotídeo, mostrando a convenção da numeração do anel D-Ribose. (b) Estrutura das bases nitrogenadas e dos compostos dos quais derivam, mostrando a convenção da numeração.	29
9. Estrutura do DNA: (a) desenho esquemático do modelo de dupla fita proposto por Watson e Crick em 1953 <sup>20</sup> . (b) Ligação fosfodiéster entre a (deoxi)ribose e o fosfato na cadeia principal e ligações $\beta$ -glicosídica entre (deoxi)riboses e bases nitrogenadas.	30
10. Padrões das ligações de hidrogênio: as ligações de hidrogênio estão representadas por conjuntos de linhas azuis e em rosa está mostrando o comprimento médio das ligações de hidrogênio.	31
11. Três diferentes representações 3D da estrutura do DNA. (a) vista perpendicular ao eixo da hélice. Modelo de preenchimento espacial o açúcar-fosfato está destacado por uma fita azul, e as bases estão em cinza. (b) representação em tirar cilíndricas. (c) Vista superior da hélice.	32
12. Parâmetros da geometria das bases para caracterização conformacional de ácidos nucleicos.	34
13. Parâmetros da geometria das bases para caracterização conformacional de ácidos nucleicos.	35
14. Desenho representativo dos estágios de formação da metástase em células normais.	37
15. Mecanismo da reação reversível de ET743 com o DNA para formar o aduto ET743-N2-guanina-DNA. O “B” corresponde a base do DNA acceptora da ligação de hidrogênio. O 21NH da carbinolamina (2) catalisa a desidratação do C21 retendo o íon imínio (3). Ataque nucleofílico do GN2 na (3) resulta na expulsão de uma água que contém um próton que se liberou da guanina N2 (4). O aduto resultante (5) retém o próton do N12.	40
16. Fluxograma de reatividade de seqüências específicas de três bases de seqüência 5'-XG <sub>cov</sub> Y, mostra que Y deve ser G ou C, e dependendo da base que ocupar Y, o X deve ser o tipo de sistema oposto. A relação entre as regras destas seqüências e a ligação de hidrogênio entre DNA-fármaco é mostrada no	41

- fluxograma que conduz no final à meta da reatividade mais alta.
17. Estrutura da ET743 e sítios de interação de ligações de hidrogênio (HBs) entre ET743 e DNA (numeração das ligações no complexo covalente). 42
  18. RMSD de todos os átomos da estrutura da ET743 após 1,0ns. 48
  19. RMSF de todos os átomos da estrutura da ET743. As diferentes cores se referem a diferentes escala de tempo. 50
  20. Representação 3D do fármaco antitumoral ET743 após 1,0ns. Átomos hidrogênio (branco), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul), carbono (cinza), enxofre (amarelo). 50
  21. RMSD de todos os átomos das seqüências de oligonucleotídeos após 1,5 ns de dinâmica. (a) CGG, (b) AGC, (c) CGG, (d) AGT e (e) AGG. RMSD de todos os átomos das seqüências de oligonucleotídeos após 1,5 ns de dinâmica. (a) CGG, (b) AGC, (c) CGG, (d) AGT e (e) AGG. 51
  22. RMSF de todos os átomos das seqüências de oligonucleotídeos. (a) CGG, (b) AGC, (c) CGG, (d) AGT e (e) AGG. As diferentes cores se referem a diferentes escala de tempo. 52
  23. Distâncias médias do pares de bases após 1,5ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATAGCATCCG). Linha preta (1C-24G) e vermelha (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha azul (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo. 56
  24. Distâncias médias do pares de bases após 1,5ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATCGGATCCG). Linha preta (1C-24G) e vermelha (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha azul (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo. 57
  25. Distâncias médias do pares de bases após 1,5 ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATCGAATCCG). Linha preta (1C-24G) e verde (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha vermelha (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo. 58
  26. Distâncias médias do pares de bases após 1,5ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATAGTATCCG). Linha preta (1C-24G) e vermelha (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha azul (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo. 59
  27. Distâncias médias do pares de bases após 1,5ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATAGGATCCG). Linha preta (1C-24G) e vermelha (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha azul (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo. 60
  28. Estruturas médias geradas pelo X3DNA e SPDBV do oligonucleotídeo CGATAGCATCCG. Representação da visão superior (do eixo Z) e visão frontal respectivamente. 61
  29. Sobreposição da estrutura inicial e final dos oligonucleotídeos de tríades centrais (AGC, CGG e AGG). Estrutura inicial em vermelho e estrutura final em azul. 62
  30. Sítios de interação entre a ET743 e os oligonucleotídeos. (I) esquema da ligação ET743 e oligonucleotídeo (AGG), (II) oligonucleotídeo (AGT) e sítios de interação com a ET743. (III) e (IV) ET743 e seus sítios de interação. 64
  31. Distâncias das ligações de hidrogênio (HBs) entre os átomos doadores e aceptores da seqüência AGT com a ET743. 65
  32. Distâncias das ligações de hidrogênio (HBs) entre os átomos doadores e aceptores da seqüência CGG com a ET743. 66
  33. Distâncias das ligações de hidrogênio (HBs) entre os átomos doadores e 66

- aceptores da seqüência AGG com a ET743.
34. Dobramento da estrutura do DNA para a maior cavidade. (I) Oligonucleotídeo 5'-AGT inicial. (II) oligonucleotídeo 5'-AGT estado final. (III) gráfico dos ângulos monitorados durante a simulação. 68
  35. Monitoramento da mínima distância entre a ET743 e regiões do oligonucleotídeo AGT. 69
  36. Sobreposição dos complexos não covalente ET-AGC na **aproximação** do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g) visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGC inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC final), Laranja (ET final). 70
  37. Sobreposição dos complexos não covalente ET-CGG na **aproximação** do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g), visão lateral. (b) e (h) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (CGG inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (CGG final), Laranja (ET final). 71
  38. RMSF de todos os átomos do DNA, perante aproximação da ET743. Preto (DNA inicial), Azul (após aproximação da ET743). Circulo em vermelho indica menos flutuação da estrutura. 72
  39. RMSF de todos os átomos do DNA, perante aproximação da ET743. Preto (DNA inicial), Azul (após aproximação da ET743). Circulo em vermelho indica menos flutuação da estrutura. 73
  40. RMSD de todos os átomos do DNA, Complexo Não-Covalente, aproximação e afastamento da ET743 após 2,5 ns de simulação. (a) RMSD de todos os átomos da seqüência CGG. (b) RMSD de todos os átomos da seqüência CGA. 74
  41. Sobreposição das estruturas iniciais e finais da seqüência **CGA** (a) inicial – aproximação; (b) inicial – afastamento. 75
  42. RMSD de todos os átomos da seqüência AGT, Complexo Não-Covalente, aproximação e afastamento da ET743 após 2,75 ns de simulação. 76
  43. RMSF de todos os átomos da seqüência AGT, perante aproximação da ET743. Preto (DNA inicial), vermelho (após aproximação da ET743). Amarelo (após o afastamento da ET743). 76
  44. RMSD de todos os átomos da seqüência AGC, Complexo Não-Covalente , aproximação e afastamento da ET743. 77
  45. RMSF de todos os átomos da seqüência AGC, perante aproximação da ET743 após 600 ps de simulação. Preto (DNA inicial), vermelho (após aproximação da ET743). Amarelo (após o afastamento da ET743). 77
  46. RMSD de todos os átomos da seqüência AGG, Complexo Não-Covalente e afastamento da ET743 após 1,5 ns de simulação. 78
  47. RMSF de todos os átomos da seqüência AGG, perante aproximação da ET743. Preto (DNA inicial), vermelho (maior RMSD da estrutura). Azul (afastamento final). 78
  48. Sobreposição dos complexos não covalente ET-CGG no afastamento do fármaco. (a), (d), (e), (f), visão lateral. (b) e (g) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (h) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGC inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC final), Laranja (ET final). 79
  49. Sobreposição dos complexos não covalente ET-AGC no afastamento do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g), (h), visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGC inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC final), Laranja (ET final). 80

50.	Sobreposição dos complexos não covalente ET-AGG no <b>afastamento</b> do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGG inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGG final), Laranja (ET final).	81
51.	Sobreposição dos complexos não covalente ET-AGT no <b>afastamento</b> do fármaco. (a), (d), (e), (f) e (g) visão lateral. (b) e (h) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGT inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGT final), Laranja (ET final).	82
52.	RMSF de todos os átomos da seqüência AGG, perante aproximação da ET743 na dinâmica molecular. Linha vermelha AGG-ET743 complexo não covalente, linha preta AGG isolado e linha azul AGG-ET743 complexo covalente.	85
53.	RMSD de todos os átomos da seqüência AGG do complexo covalente AGG-ET743 após 1,0 ns de simulação.	86
54.	RMSD de todos os átomos da seqüência AGT do complexo covalente AGG-ET743 após 400 ps de simulação.	86
55.	Sobreposição do complexos não covalente ET-AGG com o complexo covalente ET-AGG. (a), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGG não covalente), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC covalente), Laranja (ET final).	87
56.	Sobreposição dos complexos covalente ET-AGT ao longo da dinâmica. (a), (d), (e), (f) e (g) visão lateral. (b) e (h) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGT inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGT final), Laranja (ET final).	88

## LISTA DE TABELAS

Tabelas	Páginas
1. Características estruturais das isoformas ideais (A, B e Z) do DNA.	33
2. Grupos doadores e aceptores das ligações de hidrogênio dos complexos não-covalentes entre ET743 e oligonucleotídeos.	42
3. Análises realizadas durante as simulações, via dinâmica molecular.	47
4. Parâmetros estruturais monitorados no oligonucleotídeo CGATAGCATCCG, do tríade central.	62
5. Doadores e aceptores descritos pela literatura com sua distância média de ligação, comparados com as distâncias das ligações de hidrogênio alternativas dos complexos não-covalentes entre ET743 e oligonucleotídeos.	67
6. Energias calculadas com o afastamento do fármaco de seu sítio de interação da seqüência AGC.	83
7. Energias calculadas com o afastamento do fármaco de seu sítio de interação da seqüência CGG.	83
8. Energias calculadas com o afastamento do fármaco de seu sítio de interação da seqüência AGG.	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

ET743: Ecteinascidina 743.

DM: Dinâmica molecular.

PBC: Condição periódica de contorno.

RMSD: Desvio quadrado médio.

RMSF: Mobilidade relativa dos segmentos.

DNA: Ácido desoxirribonucléico.

ET (N42): Nitrogênio 42 da ectenascidina.

ET (O47): Oxigênio 47 da ectenascidina.

ET (O34): Oxigênio 34 da ectenascidina.

ET (O5): Oxigênio 5 da ectenascidina.

T20 (O2): Oxigênio 2 da timina 20.

T20 (O3'): Oxigênio 3' da timina 20.

T9 (O1P): Oxigênio 1 ligado ao fosfato da timina 9.

G6 (N2): Nitrogênio 2 da guanina 6.

G7 (N2): Nitrogênio 2 da guanina 7.

HBs: Ligações de hidrogênio.

## RESUMO

Neste trabalho usamos simulações de Dinâmica Molecular para analisarmos interações e alterações estruturais em complexos não covalentes e covalentes entre o fármaco Ecteinascidina (ET743) e o DNA (modelado como dodecâmeros). De acordo com a literatura, a Ecteinascidina forma primeiro um complexo não-covalente, determinado por ligações de hidrogênio, com um segmento do DNA, sendo que ocorre uma posterior alquilação de uma guanina, levando a um complexo covalente ET743-DNA. Dependendo da seqüência de DNA, constata-se a existência de diferentes reatividades frente à ET743. Assim, foram escolhidas para a formação dos complexos duas seqüências de alta interação com o fármaco, duas de baixa interação e uma de interação moderada. A interação do fármaco induz uma torção estrutural do DNA em direção ao sulco maior, impedido a ação do sistema de reparo celular, levando a morte da célula.

Em simulações envolvendo DNA e ligantes, é fundamental a boa parametrização e descrição das interações eletrostáticas e a caracterização dos parâmetros estruturais, bem como de suas flutuações. As simulações confirmaram a interação entre a ET743 e as seqüências escolhidas, sendo constatada a permanência do fármaco no sítio de interação por um longo período de tempo e uma forte distorção dos oligonucleotídeos. A análise das ligações de hidrogênio confirmou algumas das ligações previstas e também algumas não antes reportadas. Não foi constatada nenhuma correlação significativa entre a interação induzida e a reatividade das seqüências, embora em um caso tenha sido constatada a migração da ET743 em direção a um sítio de interação de maior reatividade.

A análise termodinâmica foi realizada calculando-se as energias de interação em complexos não-covalentes e, após, afastando gradualmente os mesmos em relação ao DNA e monitorando os diversos termos energéticos até a convergência. Apesar da estabilidade do complexo, a análise termodinâmica, obtida mediante simulações de afastamento da ET743, mostrou que a formação do complexo não covalente é endotérmica. A simulação dos complexos covalentes destes oligonucleotídeos com o ligante também mostrou fortes distorções induzidas.



## ABSTRACT

In this work we used molecular dynamics simulations to analyse the interactions and induced structural changes in non-covalent and covalent complexes between Ecteinascidin (ET743) and DNA dodecamers. According to the literature, the interaction between Ecteinascidin and DNA involves the formation of a non-covalent complex characterized by several hydrogen bonds with a DNA segment. Further, there is an alkylation of a guanine, leading to a covalent complex between ET743 and DNA. Depending on the base pair sequence, ET743 displays different reactivities. In this work, two sequences of high reactivity, two sequences of low reactivity and one sequence of moderate reactivity were chosen. The interaction between the Ecteinascidin and DNA leads to a bending of the DNA towards the major groove, blocking the cell repair system and leading to cell's death.

In simulations with DNA and ligands the detailed description of the structural parameters as well as a careful parameterization, especially in the description of the electrostatic interactions, are fundamental. The simulations confirmed the strong interaction between Ecteinascidin and the chosen sequences, with a high residence time of the drug in the site of interaction and a strong distortion of the oligonucleotides. The analysis of the hydrogen bonds (HBs) confirmed some of known HBs and revealed some alternative HBs. There were no significant correlation between the induced distortion and interactions and the reactivity of the sequences, although a migration of the ET743 towards a higher interaction site was found in one system.

The thermodynamic analysis was carried out calculating the interaction energies of the non-covalent complexes and gradually increasing the distance between drug and interaction site, until the energetic terms converge. Despite of the stability of the complex, the thermodynamic analysis showed an endothermic enthalpy of formation for the non-covalent complex. The simulation of covalent complexes between ET743 and oligonucleotides also showed strong induced distortions.



## 1. INTRODUÇÃO

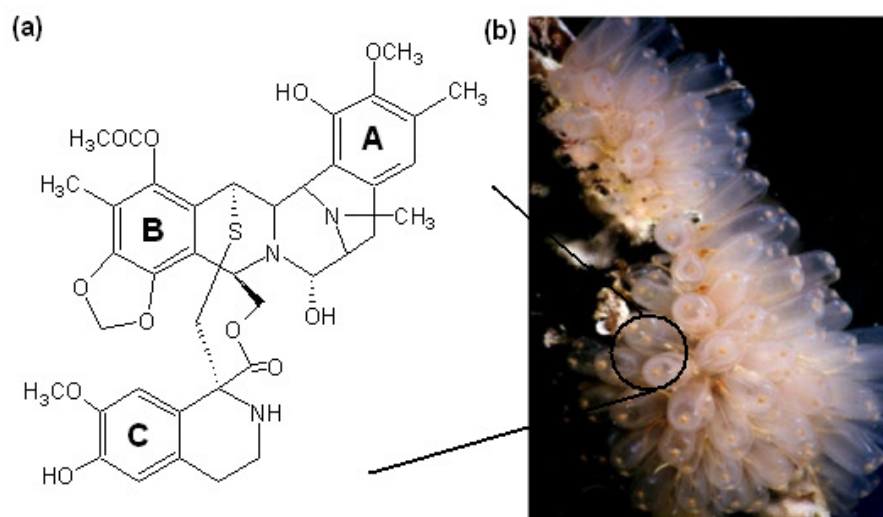
A incidência do câncer cresce no Brasil, como em todo o mundo, num ritmo que acompanha o envelhecimento populacional decorrente do aumento da expectativa de vida. É um resultado direto das grandes transformações globais das últimas décadas, que alteraram a situação de saúde dos povos pela urbanização acelerada, novos modos de vida, novos padrões de consumo<sup>1</sup>.

Quanto à mortalidade, em 2004 o Brasil registrou 141 mil óbitos de câncer. Câncer de pulmão, próstata e estômago foram as principais causas de morte em homens; mama, pulmão e intestino, as principais na mortalidade feminina por câncer.

O SUS registrou 423 mil internações por neoplasias malignas em 2005, além de 1,6 milhão de consultas ambulatoriais em oncologia. Mensalmente, são tratados cerca de 128 mil pacientes em quimioterapia e 98 mil em radioterapia ambulatorial. Nos últimos 5 anos ocorreu um aumento expressivo no número de pacientes oncológicos atendidos pelas unidades de alta complexidade do SUS, o que pode estar refletindo uma melhora na capacidade do sistema em aumentar o acesso aos recursos de tratamento especializado, ainda que pesem os gargalos existentes em algumas especialidades, as dificuldades de regulação e articulação entre as unidades da rede e a inexistência de resultados positivos na saúde da população<sup>2</sup>.

No Brasil, as agências de fomento à pesquisa destinam entre 25% e 30% de seu orçamento à saúde. A maior parte dos pesquisadores deste campo está concentrada na área acadêmica, especificamente em universidades. Assim, a busca por novos fármacos na prevenção e/ou tratamento contra o câncer tem um papel fundamental na sociedade moderna<sup>1</sup>.

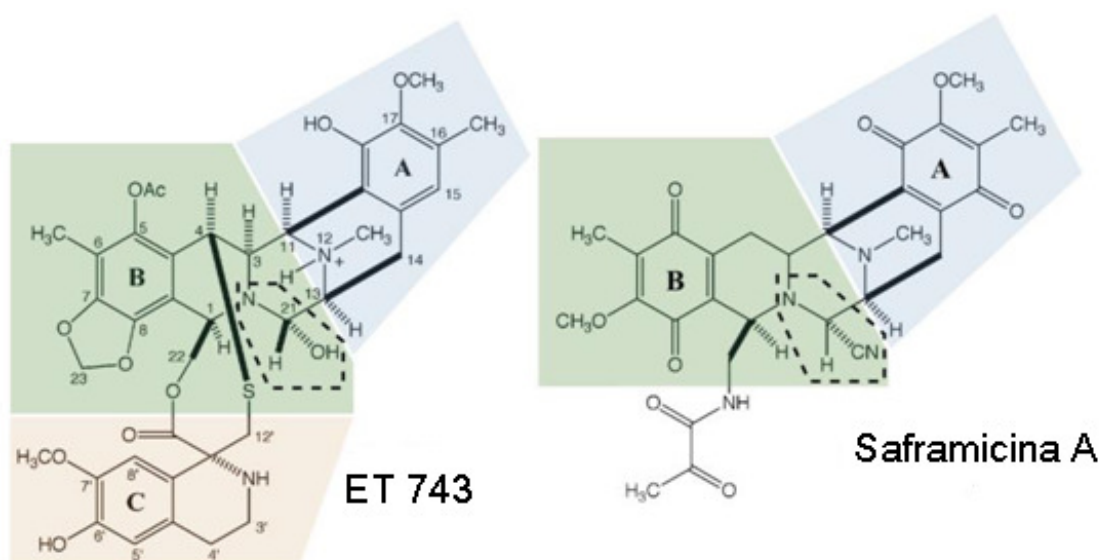
Nesta busca por novos fármacos anticancerígenos os oceanos tem se mostrado uma boa fonte de alternativas, que é o caso das ecteinascidinas (ETs), que são produtos naturais derivados da espécie marinha *Ecteinascidia Turbinata* (Figura 1b), encontrada no mar do Caribe. É conhecido que o extrato de *E. Turbinata* é um importante inibidor da proliferação celular, sendo que diversos de seus princípios ativos (ETs) já foram isolados. Destes, a ET743 (Figura 1a) mostrou-se o mais promissor, principalmente devido a sua citotoxicidade e abundância no tunicado<sup>1</sup>(animais que vivem em colônias e fixos ao fundo do mar, na terminologia científica são chamados de ascídias) como mostrado da figura 1a.



**Figura 1:** (a) Estrutura da ET743, consistindo em três anéis tetraidroisoquinolínicos fundidos. (b) Representação da espécie marinha *Ecteinascidia Turbinata* de onde é isolado o fármaco.

A ET743 (Trabectidina ou Yondelis)<sup>3</sup> é um potente fármaco antitumoral, tendo mostrado respostas satisfatórias em testes clínicos já de fase III, contra uma variedade de tumores humanos, incluindo sarcoma de tecidos moles<sup>3,4,5,6,7</sup>.

A ET743 consiste em um grupo funcional carbinolamina, além de três anéis tetraidroisoquinolínicos fundidos (Figura 1a) e apresenta estrutura química relacionada a família de antibióticos saframicina. (Figura 2).



**Figura 2:** Estruturas da ET743 e saframicina A. Os grupos carbinolaminas são indicados pelas linhas tracejadas. Subunidades A-, B- e C- da ET743 e saframicina estão marcadas em azul, verde e laranja, respectivamente<sup>4</sup>.

Sabe-se que a ET743 liga-se no sulco menor do DNA, na posição N2 de uma guanina, ocorrendo a alquilação da mesma e provocando o dobramento do DNA sobre o sulco maior. A alquilação é dependente dos pares de bases que flanqueiam o sítio da guanina central, sendo as seqüências mais favorecidas 5'-AGC, 5'-GGC, 5'-CGG e 5'-TGG<sup>8</sup>.

Atualmente o desenvolvimento de fármacos antitumorais derivados de ET743 está limitado, em parte, devido à ausência de informações estruturais, em resolução atômica, sobre os complexos formados pela interação de ET743 com o DNA. Neste trabalho, aplicamos técnicas de simulação computacional via dinâmica molecular clássica para a obtenção de modelos tridimensionais destes complexos.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho se constitui no estudo do fármaco anticancerígeno Ecteinascidina (ET743) e de seqüências de oligonucleotídeos. Para tanto, é necessário um estudo aprofundado dos aspectos moleculares, estruturais e termodinâmicos da interação ET743 com DNA. Para que este objetivo seja alcançado, nos propomos a:

1. Propor a geometria e a topologia da molécula de ET743, bem como parametrizar as suas cargas parciais;
2. Simular a ET743 via dinâmica molecular com os parâmetros obtidos, tais como, geometria, topologia e cargas parciais;
3. Analisar a estrutura, estabilidade e flexibilidade de cinco oligonucleotídeos (dodecâmeros) escolhidos de forma a exibirem diferentes reatividades frente à ET743 (duas seqüências de alta reatividade, uma seqüência de média reatividade e duas seqüências de baixa reatividade);
4. Avaliar os parâmetros geométricos, a estrutura, a estabilidade, as ligações de hidrogênio e a energia de interação dos complexos não covalentes formados entre a ET743 e os oligonucleotídeos escolhidos;
5. Avaliar os parâmetros geométricos, a estrutura, e a estabilidade dos complexos covalentes formados entre a ET743 e os oligonucleotídeos escolhidos.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. SIMULAÇÃO VIA DINÂMICA MOLECULAR (DM)

Dentre os métodos de simulação computacional que partem do conhecimento microscópico, a simulação dinâmica molecular (DM) ocupa um lugar central, principalmente em simulações de sistemas biológicos (proteínas, ácidos nucleicos, membranas)<sup>9,10</sup> etc. Uma vez que a realidade microscópica somente pode ser descrita, quantitativamente, com a abordagem da mecânica quântica, o uso de métodos quânticos (métodos *ab Initio* (HF “*Hartree-Fock*” ou DFT “*density functional theory*” (teoria funcional da densidade)) na dinâmica molecular seria necessário. No entanto, a maioria dos problemas de interesse da modelagem molecular são inviáveis de serem tratados com métodos quânticos, por exemplo, sistemas com muitas moléculas, sistemas de moléculas muito grandes ou sistemas com muitas moléculas interagindo entre si. Pelo fato de a DM quântica considerar os movimentos dos elétrons, a complexidade do sistema cresce na ordem de  $N^3$  e  $N^4$ , onde  $N$  seria o número de funções de onda. Então, embora apresente grande precisão nos resultados, em sistemas biológicos o cálculo via DM quântica torna-se inviável do ponto de vista computacional<sup>10,11</sup>.

Nas situações em que a DM quântica não pode ser aplicada, uma alternativa é o uso da Dinâmica Molecular Clássica. A DM clássica ignora os elétrons e considera os átomos como pontos de massa nos quais atuam diversos potenciais, assim a complexidade do sistema cresce em função de  $n^2$  ( $n = n^\circ$  de átomos). Naturalmente, a DM clássica é uma abordagem apenas aproximada, mas, ainda assim, com as inclusões de parâmetros dos potenciais clássicos (Campos de Forças “*Force Fields*”) é possível obter resultados de muita qualidade, mesmo com o emprego da física clássica. A base da simulação dinâmica molecular clássica é a descrição do sistema como constituído de partículas que interagem entre si mediante forças analiticamente descritíveis e cujo movimento é regido pelas leis de Newton da mecânica clássica<sup>11,12</sup>.

O estado microscópico de um sistema pode ser especificado em termos das posições e momentos das partículas que o constituem. Dessa forma, o Hamiltoniano  $H$  de um sistema molecular clássico pode ser escrito como a soma das energias cinética  $T$

e potencial  $V$ , como função das séries de coordenadas generalizadas  $\mathbf{q}_i$  e de momentos generalizados  $\mathbf{p}_i$  de todos os  $N$  átomos do sistema

$$H_{((\mathbf{q}_i, \mathbf{p}_i))} = T_{((\mathbf{p}_i))} + V_{((\mathbf{q}_i))}, \quad (1)$$

onde  $\mathbf{q}_i = \mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \dots, \mathbf{q}_N$  e  $\mathbf{p}_i = \mathbf{p}_1, \mathbf{p}_2, \dots, \mathbf{p}_N$ .

A energia potencial  $V_{((\mathbf{q}_i))}$  contém os termos das interações inter e intramoleculares, de curto e longo alcance (será mostrado mais adiante), e pode ser substituída pela função potencial  $V_{((r_i))}$ , tal que as coordenadas  $q_i$  sejam as coordenadas cartesianas  $r_i$  e  $p_i$  seus momentos conjugados. A energia cinética assume a forma

$$T_{((\mathbf{p}_i))} = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} \quad (2)$$

em que a  $m_i$  é a massa do átomo  $i$ .

A partir do Hamiltoniano ( $H$ ) é possível construir as equações de movimento que governam a evolução temporal do sistema e suas propriedades dinâmicas. Como a energia potencial  $V_{((r_i))}$  independe das velocidades e a energia cinética é independente das posições e as equações de movimento de Hamilton

$$\dot{q}_i = \frac{\partial H}{\partial p_i} \quad (3)$$

$$\dot{p}_i = -\frac{\partial H}{\partial q_i} \quad (4)$$

$$\dot{r}_i = \frac{p_i}{m_i} = v_i \quad (5)$$

conduzem às equações do movimento de Newton:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V_{((r_i))}}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (6)$$

onde  $\mathbf{F}_i$  é a força que atua sobre o átomo  $i$ .<sup>10</sup>



A DM consiste, portanto, na resolução numérica das equações (5) e (6) e na integração das mesmas passo-a-passo no tempo, de maneira eficiente e acurada. Como resultado obtém-se energias e trajetórias para todas as partículas (ou átomos) e para o sistema como um todo, a partir das quais várias propriedades podem ser calculadas.

### 3.1.1. CAMPO DE FORÇA

A energia potencial de interação  $V_{(t)}$  representa um conjunto de energias da molécula, sendo descrita pelo chamado campo de força. O campo de força pode ser definido como um conjunto de funções e parametrizações usadas em cálculos de mecânica e dinâmica molecular<sup>11</sup>.

A energia da molécula é calculada a partir da soma da energia referente aos estiramentos das ligações, às deformações do ângulo de ligação e também aos graus de liberdade torcionais das moléculas, bem como a energia devido às interações entre átomos não ligados, como interações de van der Waals e eletrostáticas<sup>9</sup> (7).

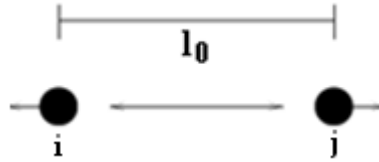
$$V_{total} = \sum_{lig} V_l + \sum_{ang} V_\theta + \sum_{died} V_\varphi + \sum_{nobond} V_{nb} \quad (7)$$

Na equação (7)  $V_l$ ,  $V_\theta$ ,  $V_\varphi$  e  $V_{nb}$  são respectivamente energias de ligação, ângulo, diedros e interações de átomos não ligados.

Para o estiramento das ligações (Figura 3) a maioria dos campos de forças adota a função harmônica (8), que descreve a energia associada ao desvio da distância  $l$ , entre dois átomos ligados covalentemente, da distância de equilíbrio  $l_0$ ,

$$V_l = \frac{1}{2} k_l (l - l_0)^2 \quad (8)$$

onde  $k_l$  é a constante de força do estiramento que descreve a deformação,  $l$  é o comprimento da ligação entre dois átomos  $i$  e  $j$ ,  $l_0$  é o comprimento de equilíbrio.



**Figura 3:** Princípio do estiramento médio da ligação entre os átomos i e j.

Porém, no campo de força 53A6<sup>20</sup> do programa GROMACS<sup>21</sup>, pacote no qual foi utilizado no presente trabalho, o potencial do estiramento de ligação covalente por razões de eficiência computacional (porque nenhuma raiz quadrada tem que ser calculada) é escrito

$$V_l = \frac{1}{4} k_l (l^2 - l_0^2)^2 \quad (9)$$

A constante de força desta forma do potencial é relacionada com a constante usual do potencial harmônico  $k^{l,harm} = k_l$  da equação 8

$$2k_l l_0^2 \approx k^{l,harm} \quad (10)$$

Uma desvantagem deste método é que sua forma não é harmônica, a média da energia de um único estiramento de ligação não é igual a  $\frac{1}{2} kT$  como é para um potencial harmônico normal.

Os ângulos de ligações são tratados da mesma maneira que o comprimento da ligação e descrito pela função harmônica (11), esta é associada aos desvios do ângulo de equilíbrio  $\theta_0$  formado entre três átomos i, j, k, covalentes e consecutivamente ligados.

$$V_\theta = k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (11)$$

onde  $\theta$  é o ângulo definido pela equação i-j-k,  $k_\theta$  é a constante de força e  $\theta_0$  o valor do equilíbrio do ângulo da ligação.

No campo de força GROMOS-96<sup>13</sup>, a vibração angular é representada por

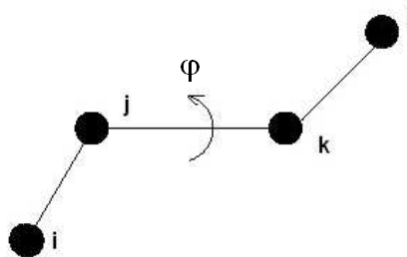
$$V_{\theta} = \frac{1}{2} k_{\theta} [\cos(\theta) - \cos(\theta_0)]^2 \quad (12)$$

onde  $k_{\theta}$  é uma constante a ser ajustada para descrever a vibração angular específica que tem  $\theta_0$  como ângulo de equilíbrio.

Os potenciais torcionais representam explicitamente a torção própria das ligações covalentes entre dois átomos (Figura 4). Para um conjunto de átomos **i**, **j**, **k**, **l**, o potencial próprio de rotação (diedro próprio) em torno de um eixo definido pela ligação **j-k** pode ser expresso por

$$V_{\varphi} = k_{\varphi} [1 + \cos(n\varphi - \delta)] \quad (13)$$

onde  $K_{\varphi}$  é a constante que define a barreira rotacional,  $n$  é o número de mínimos para a rotação de uma ligação química específica,  $\varphi$  é o ângulo diedral para a ligação central e  $\delta$  é a defasagem no ângulo diedral.



**Figura 4:** Princípio da rotação torcional para os diedros próprios.

Além das contribuições dos potenciais torcionais próprios, também é incluído o potencial torcional impróprio, descrito por

$$V_{\xi} = \frac{1}{2} k_{\xi} [\xi - \xi_0]^2 \quad (14)$$

onde  $k_\xi$  é uma constante a ser ajustada para descrever a vibração diedral imprópria específica que tem  $\xi^0$  como ângulo de equilíbrio. Se esta ocorrer entre os átomos i-j-k-l, tem-se que

$$\vec{R}_{\alpha,j} = \mathbf{r}_{i,j} \times \mathbf{r}_{k,l} \quad (15)$$

e

$$\vec{R}_{\alpha,k} = \mathbf{r}_{k,j} \times \mathbf{r}_{k,l} \quad (16)$$

logo

$$\xi_n = \text{sign}(\xi_n) \cdot \arccos \left( \frac{\vec{R}_{\alpha,j} \cdot \vec{R}_{\alpha,k}}{R_{\alpha,j} \cdot R_{\alpha,k}} \right) \quad (17)$$

onde  $\text{sign}(\xi_n) = \text{sign}(\mathbf{r}_{i,j} \cdot \vec{R}_{\alpha,k})$  é o sinal de  $\mathbf{r}_{i,j} \cdot \vec{R}_{\alpha,k}$

As interações entre átomos não ligados são tratadas normalmente por potenciais efetivos, compostos por termos de curto e longo alcance que incluem a repulsão das nuvens eletrônicas, a atração de van der Waals e o termo eletrostático de Coulomb. Em uma molécula individual, com exceção dos primeiros e segundos vizinhos quimicamente ligados (cujas interações são tratadas por potenciais harmônicos já descritos) a interação de cada átomo com os outros átomos da molécula é também descrita por termos de van der Waals e de Coulomb. É importante salientar que as conformações das macromoléculas no meio biológico são definidas em grande parte por interações intramoleculares entre os átomos não diretamente ligados e por interações intermoleculares com o solvente, obedecendo a esses potenciais.

A função mais comum para descrever a interação de van der Waals é o potencial de Lennard-Jones, que associa o termo atrativo ao termo repulsivo, o qual varia com o inverso da décima segunda potência da distância  $r$  que separa os núcleos (11)

$$V_{vdw} = 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (18)$$

onde  $\epsilon$  é a profundidade do fosso e  $\sigma$  é o diâmetro de Lennard-Jones.

Dentro do GROMACS existem dois tipos de regras de combinação na construção dos parâmetros de Lennard-Jones para os átomos não ligados de natureza diferente (ij)

com base nos parâmetros para a interação entre átomos iguais entre  $\sigma_i = (ii \text{ e } jj)$ :

$$\sigma_{ij}^{(6)} = \left( \sigma_{ii}^{(6)} \times \sigma_{jj}^{(6)} \right)^{1/2} \quad (19)$$

$$\sigma_{ij}^{(12)} = \left( \sigma_{ii}^{(12)} \times \sigma_{jj}^{(12)} \right)^{1/2} \quad (20)$$

Como alternativa pode ser utilizado as regras de Lorentz-Bertelot. Uma média aritmética é usada para os sigmas ( $\sigma$ ), enquanto uma média geométrica é usada para os épsilons ( $\epsilon$ ).

$$\sigma_{ij} = \frac{1}{2} (\sigma_{ii} + \sigma_{jj}) \quad (21)$$

$$\epsilon_{ij} = \left( \epsilon_{ii} \times \epsilon_{jj} \right)^{1/2} \quad (22)$$

O segundo componente da interação não ligante é o termo eletrostático. Este é normalmente calculado usando-se a carga ( $q$ ) parcial dos átomos, que pode ser obtida por cálculos *abinitio* considerando a densidade de carga no estado eletrônico fundamental. A energia potencial eletrostática pode ser dada pela Lei de Coulomb

$$V_{el} = \frac{q_i \cdot q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}} \quad (23)$$

onde  $\mathbf{q}_i$  e  $\mathbf{q}_j$  são as cargas parciais sobre os átomos  $i$  e  $j$ , separadas pela distância  $r_{ij}$ ,  $\epsilon_0$  é a permissividade do espaço livre e  $\epsilon$  é a constante dielétrica que corrige  $\epsilon_0$  para considerar a polarizabilidade do meio

A interação eletrostática varia com o inverso da distância de separação entre os átomos, sendo, portanto de longo alcance.

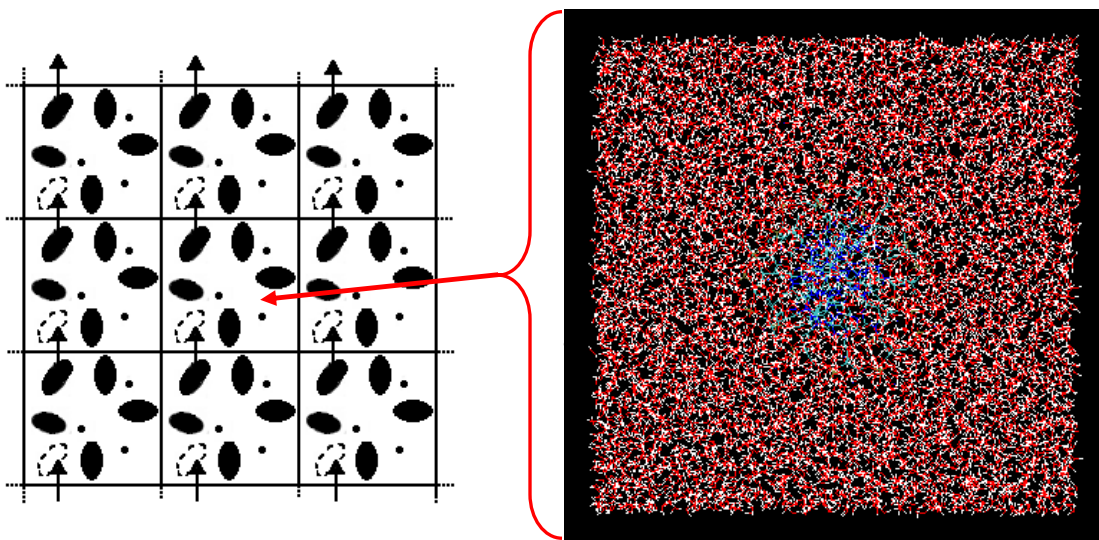
### 3.1.2. CONDIÇÕES PERIÓDICAS DE CONTORNO

Para obtermos propriedades macroscópicas a partir da simulação de um sistema molecular é necessário um número elevado de partículas, e uma das limitações da DM clássica é a menor dimensão do sistema simulado perante o sistema real, ou seja, temos um número pequeno de partículas na “caixa de simulação”, além dos efeitos de superfície. Uma técnica utilizada nestes casos é a chamada Condição Periódica de Contorno (PBC, “*Periodic Boundary Condition*”), que possibilita a realização de

simulações utilizando-se um número relativamente pequeno de partículas. Efeitos de superfície são eliminados, e as partículas que estariam “na superfície” sofrem o efeito das forças como se estivessem no interior de um sistema<sup>10</sup>.

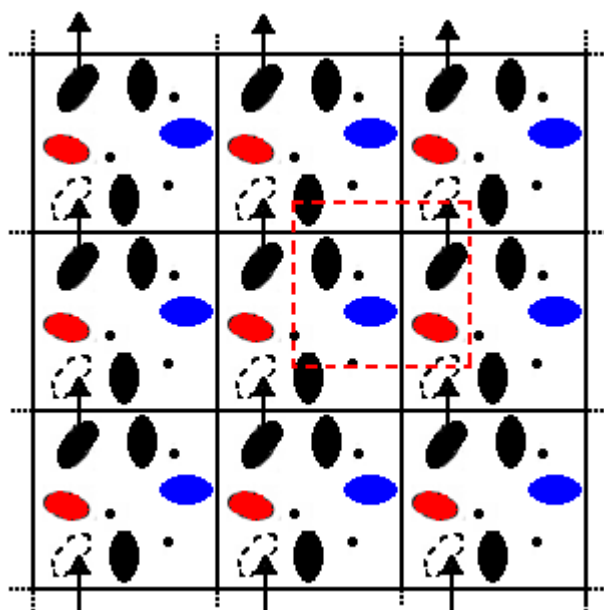
Utilizando PBC, os átomos são colocados em uma caixa (“box”), a qual é cercada por imagens da caixa original. Isto é equivalente a replicar periodicamente a caixa original em todas as direções do espaço, sem necessariamente definir as coordenadas para os átomos que estão nas caixas réplicas. No decorrer da simulação, quando um átomo se move na caixa original, sua imagem periódica, em cada uma das caixas imagens, move-se da mesma maneira. Quando um átomo sai da caixa original, atravessando uma das seis faces da caixa, uma de suas imagens periódica entra pela face oposta, com velocidade idêntica. Desta forma, o número total de átomos na caixa central e no sistema como um todo, é conservado.

Este método está representado de forma esquemática na figura 5.



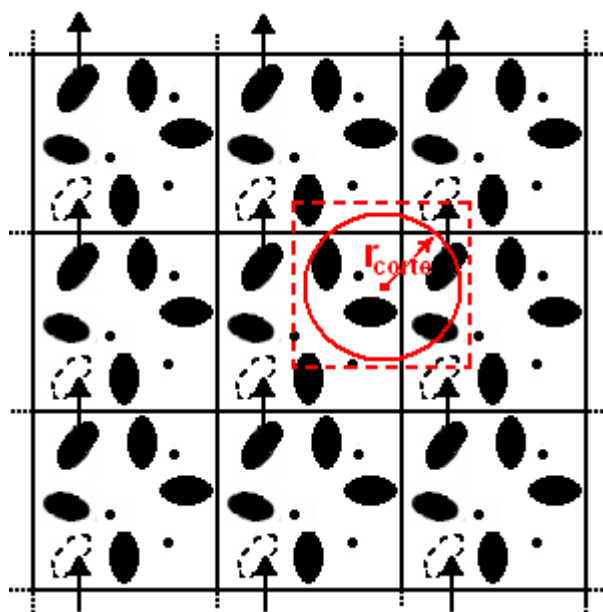
**Figura 5:** Replicação da caixa de simulação em duas dimensões em função da condição Periódica de Contorno (PBC) aplicada. A direita temos um exemplo de um Box de simulação contendo águas (vermelho/branco) envolta do DNA (azul).

Com o uso da técnica PBC, é obrigatório o uso da chamada Convenção da Imagem Mínima (“*Minimum Image Convention*”) e raio de corte, que tem um importante papel quando a distância entre duas partículas numa caixa é necessária. Neste exemplo, é considerado que a interação entre as partículas poderá ser entre as mesmas ou com sua imagem replicada, sempre contabilizando a que estiver na menor distância (Figura 6)<sup>12</sup>.



**Figura 6:** Aplicação da convenção da imagem mínima.

Entretanto, quando fizemos usos destas técnicas, geramos conseqüências sobre os potenciais de interação. Para o tratamento destas interações de curto alcance, usualmente é empregado o truncamento do potencial em um “raio de corte” esférico (“*Cutoff*”) representado na figura 7. Geralmente este raio de corte é na ordem de  $L/2$  ( $L$  é o comprimento da caixa de simulação) para evitar a interação da partícula com sua própria imagem ou com a mesma molécula duas vezes<sup>10</sup>. Assim, cada partícula interage com partículas reais ou imagens mais próximas. É importante uma escolha adequada da distância do “*cutoff*”, para se evitar gastos de recursos computacionais e cálculos de interações de partículas muito distantes e que não contribuiriam significativamente para a simulação<sup>9</sup>.



**Figura 7:** Raio de corte esférico e convenção da imagem mínima para um sistema periódico bidimensional.

### 3.1.3. INTERAÇÕES DE LONGO ALCANCE

Em decorrência do truncamento do potencial dentro de um raio de corte as interações eletrostáticas que são de longo alcance devem ser aproximadas de alguma forma. Esta aproximação e seu tratamento são importantes pelo fato de que o cálculo das interações não ligantes (van der Waals e eletrostáticas) são as etapas da simulação com maior demanda computacional, além de que aproximações feitas no tratamento destas interações afetam consideravelmente muitas propriedades simuladas<sup>14</sup>.

Nas simulações com solvente explícito são aplicadas PBC, convenção da imagem mínima e as interações de eletrostáticas podem ser calculadas de duas formas:

- truncando a interação eletrostática (Coulômbica), além do raio de corte definido;
- usando métodos baseados em somas de Ewald e campo de reação “*Reaction Field*”<sup>10</sup>.

A primeira forma produz efeitos que na maioria dos casos comprometem severamente os resultados obtidos na simulação. Em sistemas biológicos, por exemplo, este método é completamente ineficiente. De modo geral, os métodos baseados em soma de Ewald, tais como PME (“Particle Mesh Ewald”)<sup>15</sup>, SPME (“Smooth Particle-Mesh”)<sup>16</sup>, PPPM ou P<sup>3</sup>M (“Particle-Particle-Particle-Mesh”)<sup>15,17</sup> produzem trajetórias estáveis para situações onde métodos que empregam raio de corte falhariam



Uma boa descrição das interações eletrostáticas (com precisão e computacionalmente viável) eleva a metodologia de simulação molecular (DM)<sup>10,11</sup> numa ferramenta imprescindível no tratamento teórico e computacional, principalmente em sistemas biológicos<sup>18</sup>.

Os avanços relevantes de métodos de simulação deram origem a campos de força melhor parametrizados para ácidos nucleicos<sup>19,20</sup>, (por exemplo, GROMOS 53A6<sup>20</sup> implementado no pacote do GROMACS 3.3.1<sup>21</sup>) e métodos eficientes para controlar as interações eletrostáticas em simulações de DM, como o SPME (“*Smooth Particle-Mesh Ewald*”) tornam-se viáveis simulações estáveis de oligonucleotídeos na escala de tempo do nanosegundo (ns).

#### 3.1.4. CONSTRAINTS E RESTRAINTS: SHAKE E LINCS

No contexto da DM, as ligações covalentes são consideradas explicitamente por um potencial harmônico para cada ligação. As ligações com átomos leves, contudo, podem vibrar em frequências cujo tempo característico é inferior ao passo de integração, ocorrendo assim erros na propagação das posições e na conservação da energia, alterando significativamente a estrutura do sistema. Essas ligações devem ser corrigidas usando *constraints* para eliminar o efeito espúrio dos movimentos rápidos. Então, os algoritmos SHAKE<sup>22</sup>, RATTLE<sup>23</sup> e LINCS<sup>24</sup> são exemplos de alternativas empregadas para contornar esse problema.

O algoritmo SHAKE tem como rotina, por exemplo, um conjunto de distâncias (e ângulos) de referência  $\mathbf{r}$ , é empregada para alterar um conjunto de coordenadas  $\mathbf{r}'$ , gerando um novo conjunto  $\mathbf{r}''$ , o qual deve satisfazer os valores presentes em uma lista pré-definida de distâncias constringidas (*constraints bond lengths*).

$$\text{SHAKE} (\mathbf{r}' \rightarrow \mathbf{r}''; \mathbf{r}) \quad (24)$$

A partir da escolha de um valor de tolerância, de forma iterativa o algoritmo SHAKE corrige as coordenadas atômicas da lista de ligações constringidas até satisfazer o critério e tolerância relativa escolhido, para só então permitir que a simulação avance para o próximo passo.

Por sua vez, o algoritmo LINCS (*LINear Constraints Solver*) é utilizado para que as ligações retornem aos seus comprimentos corretos após uma atualização. O algoritmo LINCS é considerado mais estável e rápido que o algoritmo SHAKE.

Contudo, pode ser utilizado somente com ligações constringidas (*bond constraints*) e com ângulos isolados de ligação constringidos (*isolated angle constraints*).

### 3.1.5. TERMOSTATO E BAROSTATO

Para mantermos a temperatura e a pressão dentro de uma faixa de valores desejados durante nas simulações via DM, utilizamos o acoplamento de um termostato e de um barostato.

Por várias razões (flutuações durante a etapa de equilíbrio, flutuações no resultado do truncamento de forças e erros na integração, aquecimento devido a forças externas) faz-se necessário o controle da temperatura do sistema. Um método bastante utilizado acopla o sistema a um banho externo. Normalmente, o acoplamento térmico é realizado através do uso de um termostato de Berendsen<sup>22,25,26</sup>. O algoritmo de Berendsen imita o acoplamento de temperatura com uma cinética de primeira ordem, para um banho de calor externo com uma determinada temperatura  $T_0$ . O efeito deste algoritmo é uma divergência da temperatura do sistema de  $T_0$  é corrigida lentamente de acordo com

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (25)$$

o desvio da temperatura cai exponencialmente com um tempo de acoplamento  $\tau$ .

Este método de acoplar a temperatura tem a vantagem de que a força do acoplamento pode ser variada e pode ser adaptada à exigência do usuário: para propósitos de equilíbrio com tempo de acoplamento bastante curto (por exemplo, 0,01 ps), mas para dinâmicas com equilíbrio segura, pode ser elevado a um tempo maior (por exemplo, 0,5 ps) em qualquer caso há uma forte influência para que se conserve a dinâmica.

No mesmo espírito do acoplamento de temperatura, o sistema pode ser acoplado também a um “banho de pressão”, ou seja, a um barostato. Essa propriedade pode ser mantida constante de uma maneira similar através do ajuste do volume da caixa de simulação do sistema. Existem diversas formas de controlar a pressão do sistema durante a DM, dentre elas destaca-se o algoritmo de Berendsen<sup>26</sup>. O algoritmo de Berendsen reescala as coordenadas do sistema e os vetores da caixa de simulação para

cada passo com a matriz  $\mu$ , tem seu efeito numa relaxação de cinética de primeira ordem da pressão para uma determinada pressão de referência  $P_0$ .

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_p} \quad (26)$$

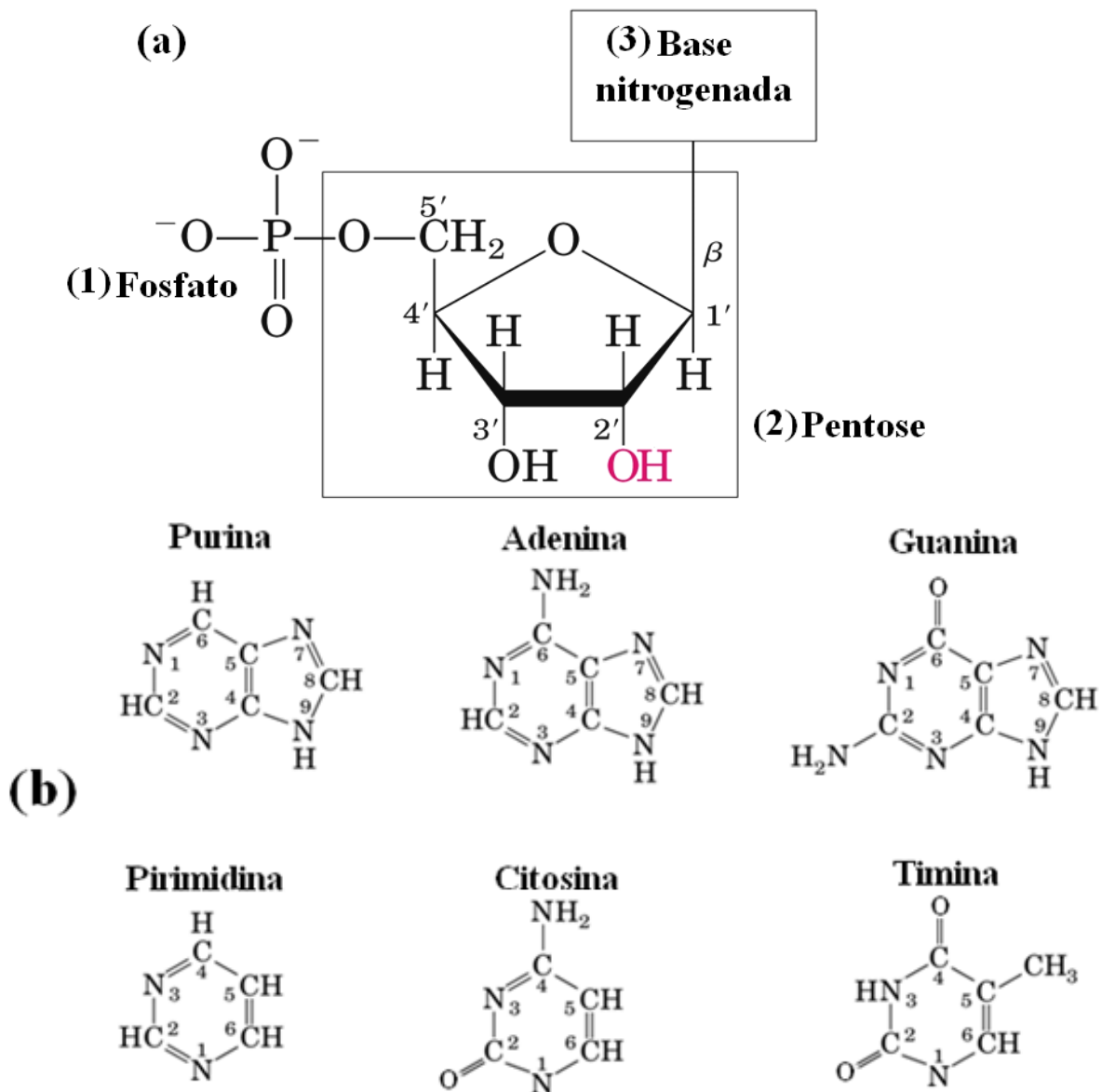
A matriz  $\mu$  é dada por

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{\Delta t}{3\tau_p} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij(t)}\} \quad (27)$$

onde  $\beta$  é a compressibilidade do sistema. Na maioria dos casos esta será uma matriz diagonal, com elementos iguais na diagonal, de valores geralmente conhecidos.

### 3.2. ÁCIDOS NUCLÉICOS

Os ácidos nucléicos são biopolímeros cujas unidades básicas, os nucleotídeos, consistem em um fosfato (1), uma pentose (2) e uma base nitrogenada (3). Em relação ao ácido desoxirribonucléico (DNA), o açúcar é uma  $\beta$ -2'-deoxi-D-ribose, ou seja, o grupamento hidroxila do carbono-2' presente na D-ribose é substituído por um hidrogênio. Já as bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos: a purina e a pirimidina, sendo as de principal ocorrência do DNA adenina e guanina (púricas) e timina e citosina (pirimídicas)<sup>27</sup>(Figura 8).

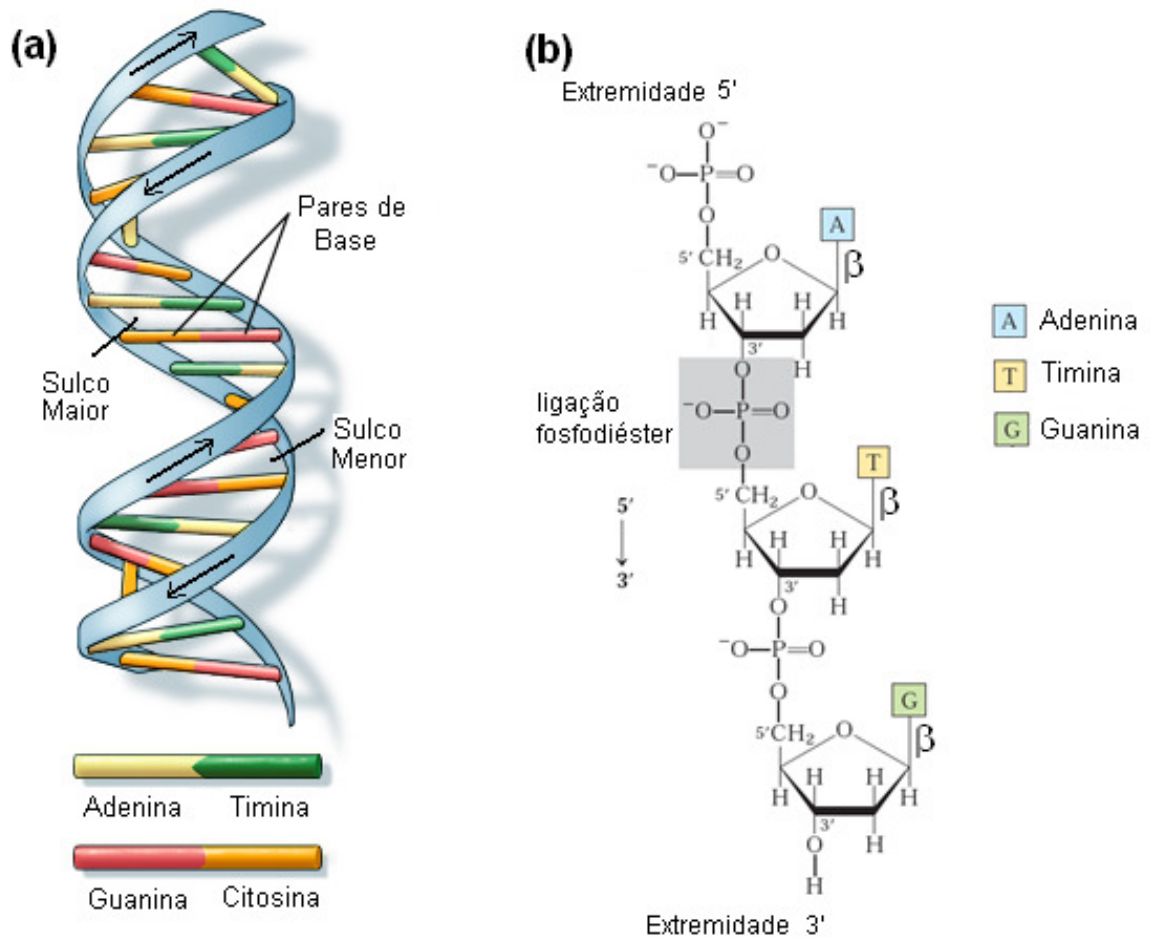


**Figura 8:** Composição do DNA: (a) estrutura geral de um desoxirribonucleotídeo, mostrando a convenção da numeração do anel D-Ribose. (b) Estrutura das bases nitrogenadas e dos compostos dos quais derivam, mostrando a convenção da numeração<sup>27</sup>.

A estrutura do DNA foi elucidada em 1953, por Watson e Crick, que propuseram um modelo de duas fitas em forma de hélice de mão direita, compartilhando do mesmo eixo central, porém orientadas em sentidos contrários, sendo antiparalelas (Figura 9a e 9b). Cada fita, ou cadeia, é formada por grupamentos fosfatos e açúcares alternados, unidos por ligações fosfodiéster, sempre no sentido da hidroxila ligada ao carbono C3' para a hidroxila ligada ao carbono C5' da (deoxi)ribose. As bases ocupam o centro da

hélice, e as cadeias de açúcar-fosfato estão dispostas na periferia, minimizando a repulsão entre os grupos fosfatos carregados. A superfície da dupla hélice forma dois sulcos de largura diferente: o sulco maior e o sulco menor.

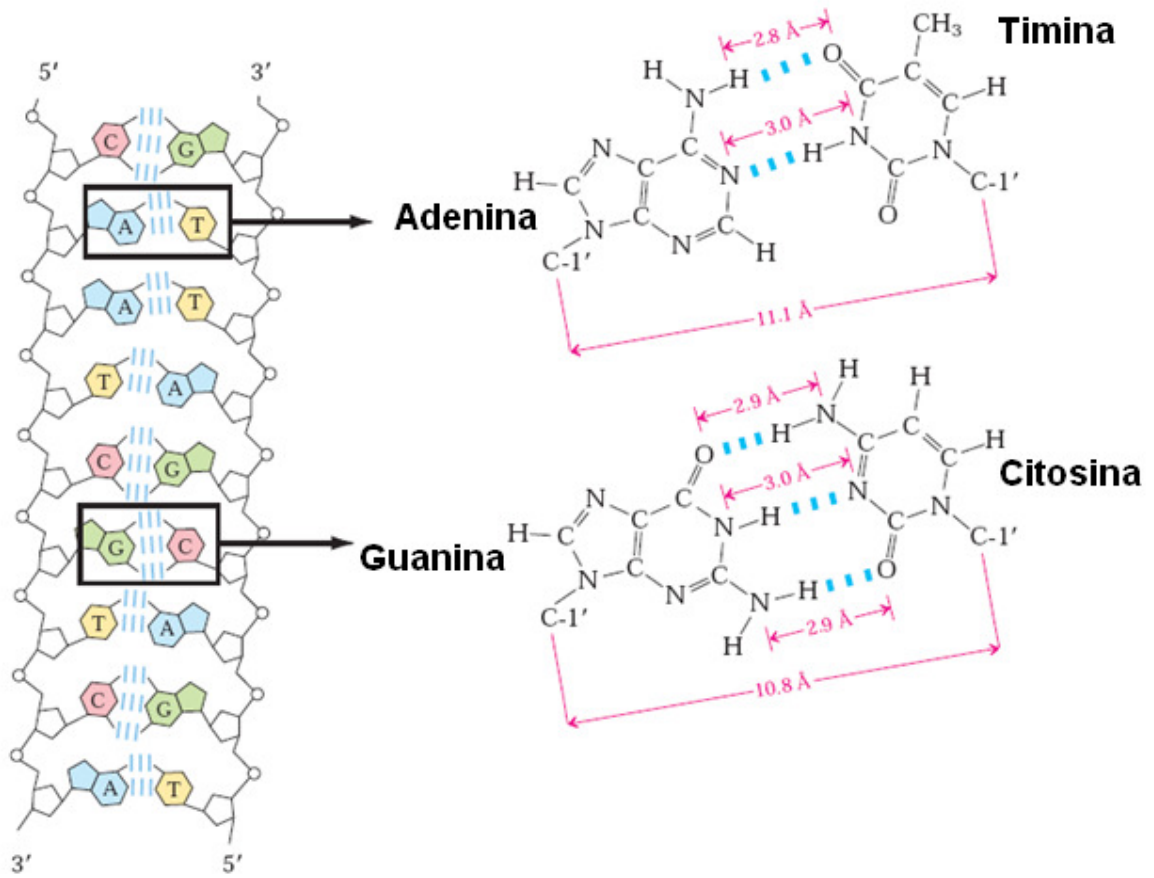
Cada (deoxi)ribose, por sua vez, encontra-se ligada a uma base nitrogenada através de uma ligação  $\beta$ -glicosídica entre o Carbono C1' do anel (deoxi)ribose e um dos nitrogênios das bases (N1 nas pirimídicas e N9 nas púricas) (Figura 9b).



**Figura 9:** Estrutura do DNA: (a) desenho esquemático do modelo de dupla fita proposto por Watson e Crick em 1953<sup>28</sup>. (b) Ligação fosfodiéster entre a (deoxi)ribose e o fosfato na cadeia principal e ligações  $\beta$ -glicosídica entre (deoxi)riboses e bases nitrogenadas<sup>27</sup>.

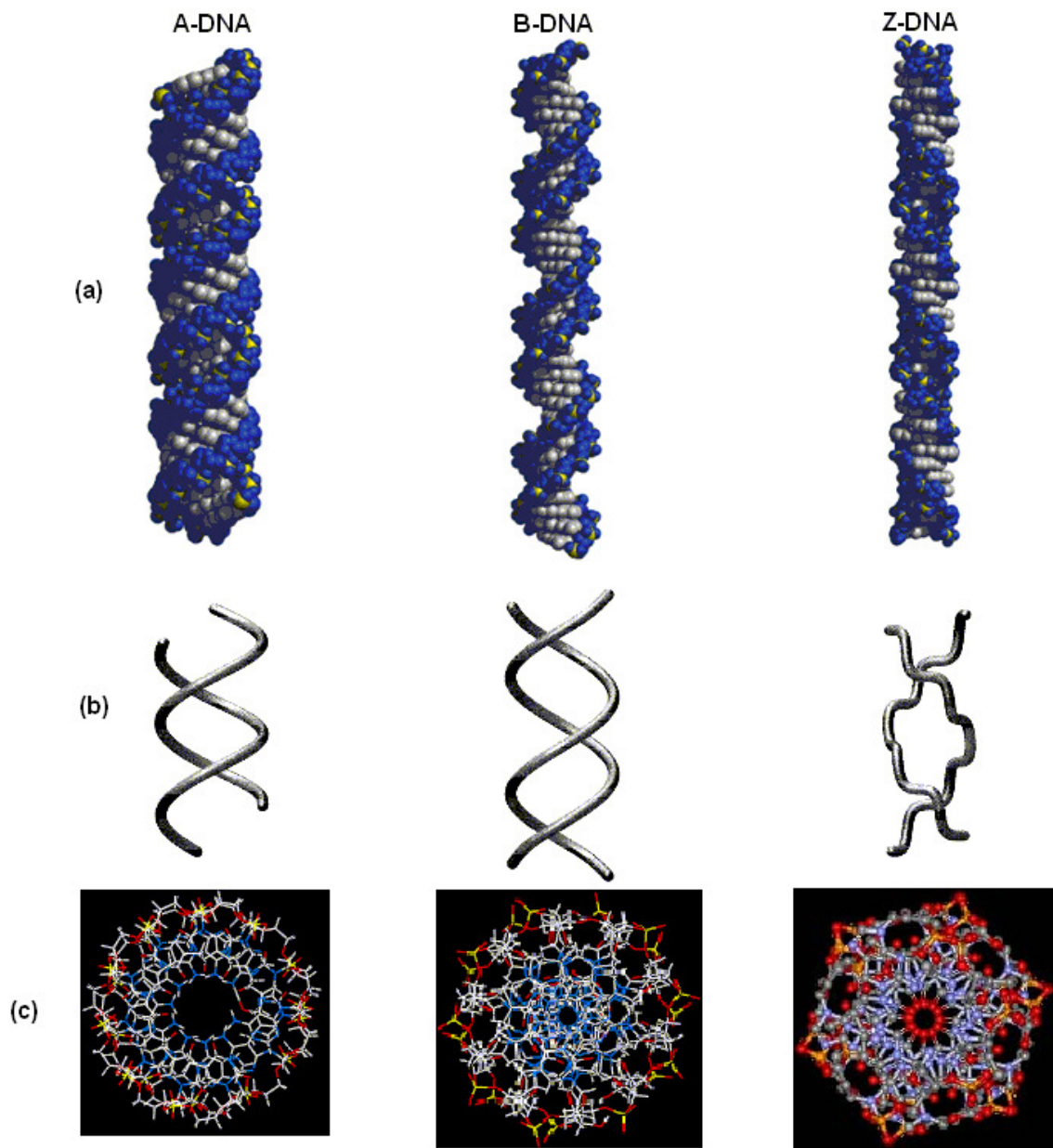
Os fosfatos e açúcares localizam-se na parte externa da hélice, enquanto as bases nitrogenadas se projetam para a parte interna. Este arranjo possibilita que as bases da cadeia complementar, mantendo as duas hélices unidas. Considerando-se que os pares são sempre formados por uma base púrica e outra pirimídica, a área ocupada por cada par se mantém aproximadamente a mesma independentemente da seqüência,

garantindo diâmetro constante ao longo do DNA. Além disso, as pontes de hidrogênio entre as bases são complementares, permitindo apenas um tipo de pareamento: adenina com timina ou guanina com citosina, mostrado na figura 10<sup>28</sup>.



**Figura 10:** Padrões das ligações de hidrogênio: as ligações de hidrogênio estão representadas por conjuntos de linhas azuis e em rosa está mostrando o comprimento médio das ligações de hidrogênio<sup>27</sup>.

Devido ao fato de possuir uma estrutura trançada, rica em ligações de hidrogênio e grupamentos carregados negativamente, o DNA é considerado uma molécula com alta polaridade e rigidez<sup>29</sup>. Porém, o DNA é também uma molécula capaz de assumir uma variedade de conformações, a figura 11, mostra as três conformações canônicas mais estudadas: A-, B- e Z-DNA.



**Figura 11:** Três diferentes representações 3D da estrutura do DNA. (a) vista perpendicular ao eixo da hélice. Modelo de preenchimento espacial o açúcar-fosfato está destacado por uma fita azul, e as bases estão em cinza. (b) representação em tiras cilíndricas. (c) Vista superior da hélice.

A forma biológica mais comum do DNA é conhecida como B-DNA e possui as características estruturais descritas por Watson e Crick<sup>28</sup>. A dupla hélice do DNA pode assumir várias estruturas distintas, dependendo da composição do solvente e da sequência de bases. As principais variantes são A-DNA e Z-DNA. As geometrias dessas moléculas estão resumidas na tabela 1.

**Tabela 1:** Características estruturais das isoformas ideais (A, B e Z) do DNA<sup>27</sup>.

	<b>A-DNA</b>	<b>B-DNA</b>	<b>Z-DNA</b>
<b>Sentido da hélice</b>	À direita	À direita	À esquerda
<b>Diâmetro</b>	~26Å	~20Å	~18Å
<b>Pares de base por volta helicoidal</b>	11	10	12
<b>Torção da hélice por pares de base</b>	33°	36°	60°
<b>Passo da hélice (elevação por volta)</b>	28Å	34Å	45Å
<b>Inclinação da base perpendicular ao eixo da hélice</b>	20°	6°	7°
<b>Sulco maior</b>	Estreita e profunda	Larga e profunda	Achatada
<b>Sulco menor</b>	Larga e rasa	Estreita e profunda	Estreita e profunda

Em condições desidratantes, o B-DNA sofre uma alteração conformacional reversível para A-DNA, que forma uma hélice também orientada para a direita, mas é mais larga e achatada, orientada para a direita, do que o B-DNA. O A-DNA possui 11 pares de bases por volta e um passo de 28 Å, o que lhe confere um espaço axial oco (Figura 11c e Tabela 1).

A característica mais interessante do A-DNA, contudo, é que os planos dos pares de bases estão inclinados 20° em relação ao eixo da hélice. Uma vez que o eixo não atravessa os pares de bases, o A-DNA possui uma cavidade maior mais profunda e uma cavidade menor muito rasa: assim, o A-DNA pode ser descrito como uma fita chata enrolada em torno de uma cavidade cilíndrica de 6 Å de diâmetro (Figura 9b e Tabela 1)<sup>30</sup>.

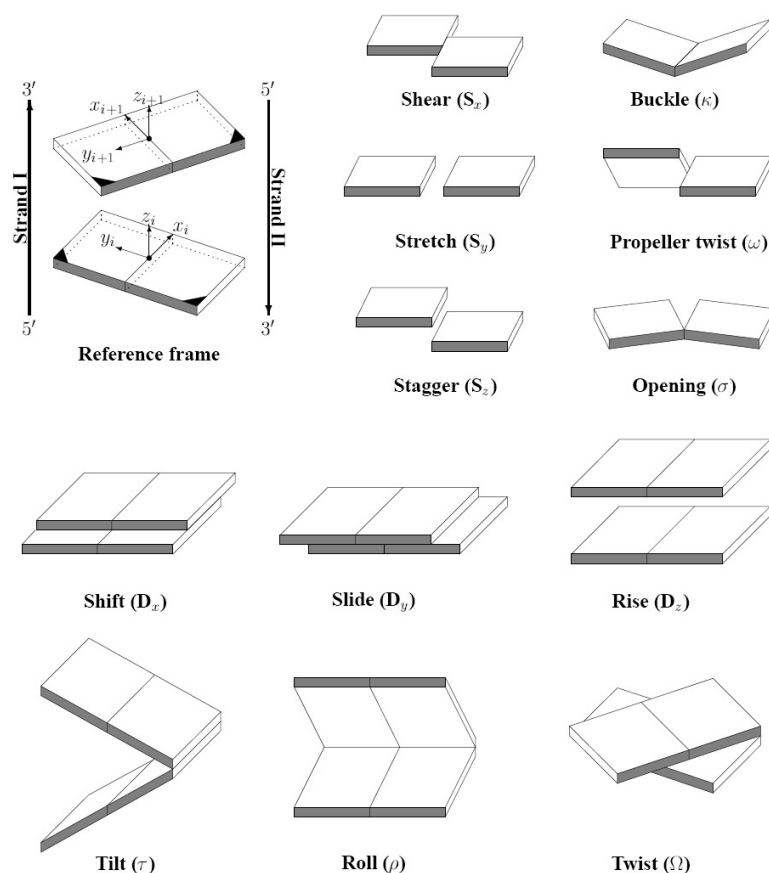
Em contrapartida, o Z-DNA, forma uma hélice orientada à esquerda. A estrutura denominada Z-DNA, possui 12 pares de bases de Watson e Crick por volta, um passo de 45 Å, uma cavidade menor mais profunda e uma cavidade maior não-distinguível.



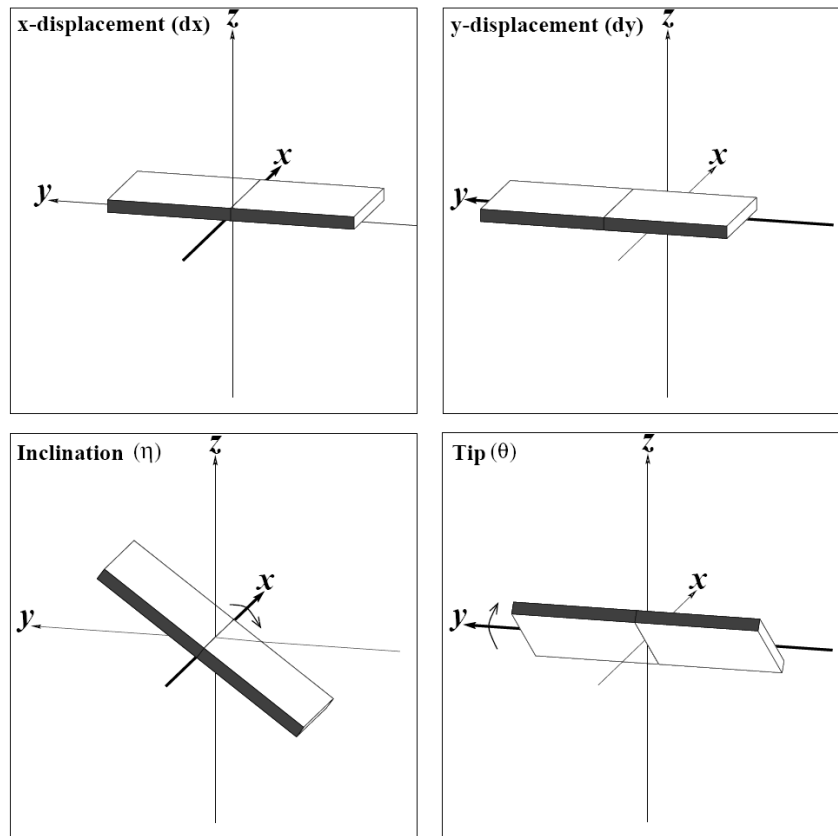
O Z-DNA, portanto, assemelha-se a uma broca torcida para a direita (Figura 11c e Tabela1).

Sendo assim, torna-se muito evidente as isoformas que o DNA pode assumir. A análise destes fatores via DM<sup>31</sup> não é trivial, primeiramente porque temos que restringir a seqüências curtas, que costumam variar de 10 a 12 pares de bases. Sem contar, que no caso de transições conformacionais induzidas pela ligação ou interação de outras moléculas, por exemplo, proteínas ou fármacos, a transição deve ocorrer no local da interação e eventualmente se propagar por pares de bases da cadeia do DNA. De modo geral, a análise conformacional do DNA não é óbvia, e tentar determinar em que conformação encontra-se um segmento de DNA é uma tarefa árdua e que exige o conhecimento dos parâmetros úteis na análise, além de uma minuciosa interpretação por parte do pesquisador.

Para a tentativa de identificação da forma do DNA<sup>29</sup> temos que considerar uma ampla gama de parâmetros (Figura 12 e 13) para a caracterização e quantificação das deformações em relação a geometria local dos pares de bases, bem como da geometria global.



**Figura 12:** Parâmetros da geometria das bases para caracterização conformacional de ácidos nucleicos<sup>31,32</sup>.



**Figura 13:** Parâmetros da geometria das bases para caracterização conformacional de ácidos nucleicos<sup>31,32</sup>.

Os parâmetros seguintes estão relacionados a translações dos pares de bases: *Shear*, *Stretch*, *Stagger*, *Shift*, *Slide*, *Rise*, *x-displacement*, *y-displacement*. Os outros parâmetros: *Opening*, *Propeller*, *Buckle*, *Twist*, *Roll*, *Tilt*, *Tip* e *Inclination*, estão relacionados a rotação dos pares de bases<sup>30</sup>.

A combinação dos movimentos destes parâmetros confere ao DNA as formas A, B e Z (Figura 10), por exemplo: variações do parâmetro *x-displacement*, está relacionado com o tamanho da cavidade interna do DNA na vista axial, já o parâmetro translacional *Rise*, que representa a distância entre duas bases consecutivas ao longo do eixo Z, pode ser relacionado com o comportamento da hélice, enquanto o parâmetro *Slide* influencia no diâmetro da dupla hélice, já o parâmetro *Twist*, é utilizado para calcular o número de pares de bases por volta de hélice.

Algumas relações podem ser feitas a partir dos parâmetros, por exemplo, valores positivos de *Roll* favorecem em largura a fenda menor, enquanto que valores negativos do mesmo favorecem a fenda maior, em outras palavras, valores positivos de *Roll* (A-DNA), tendem a tornar as duas fendas mais parecidas em largura. Já valores negativos

de *x-displacement* correspondem a uma fenda menor mais rasa e uma fenda maior mais profunda, como ocorre no A-DNA. Valores nulos de *x-displacement* tornam as duas fendas semelhantes em profundidade, como notamos no B-DNA<sup>32</sup> (Figura 14).

Ainda existem alguns parâmetros que não se correlacionam significativamente com as propriedades conformacionais, tais como, *Tip* e *Opening*. Outros parâmetros estão mais relacionados com a seqüência e não com a conformação, como *Propeller* e *Twist*. Entre todos os parâmetros, podemos citar como os mais relacionados a conformação estrutural são: *Slide*, *Roll*, *Inclination*, *Twist*, *Rise*. Embora alguns podendo se mostrar fracos indicadores.

Quanto à forma Z, a sua identificação pode ser feita através de alguns dos parâmetros de base, como *Inclination* e *Twist*, cujos valores negativos indicam o sentido contrário das hélices em relação às formas A e B.

Como já foi mencionado anteriormente o DNA, constitui um sistema complexo e com uma forte carga aniônica. Estes fatores aliados à limitação computacional do trabalho com grandes biomoléculas, o mesmo será modelado na forma de dodecâmeros, ou seja, oligonucleotídeos contendo 12 pares de bases.

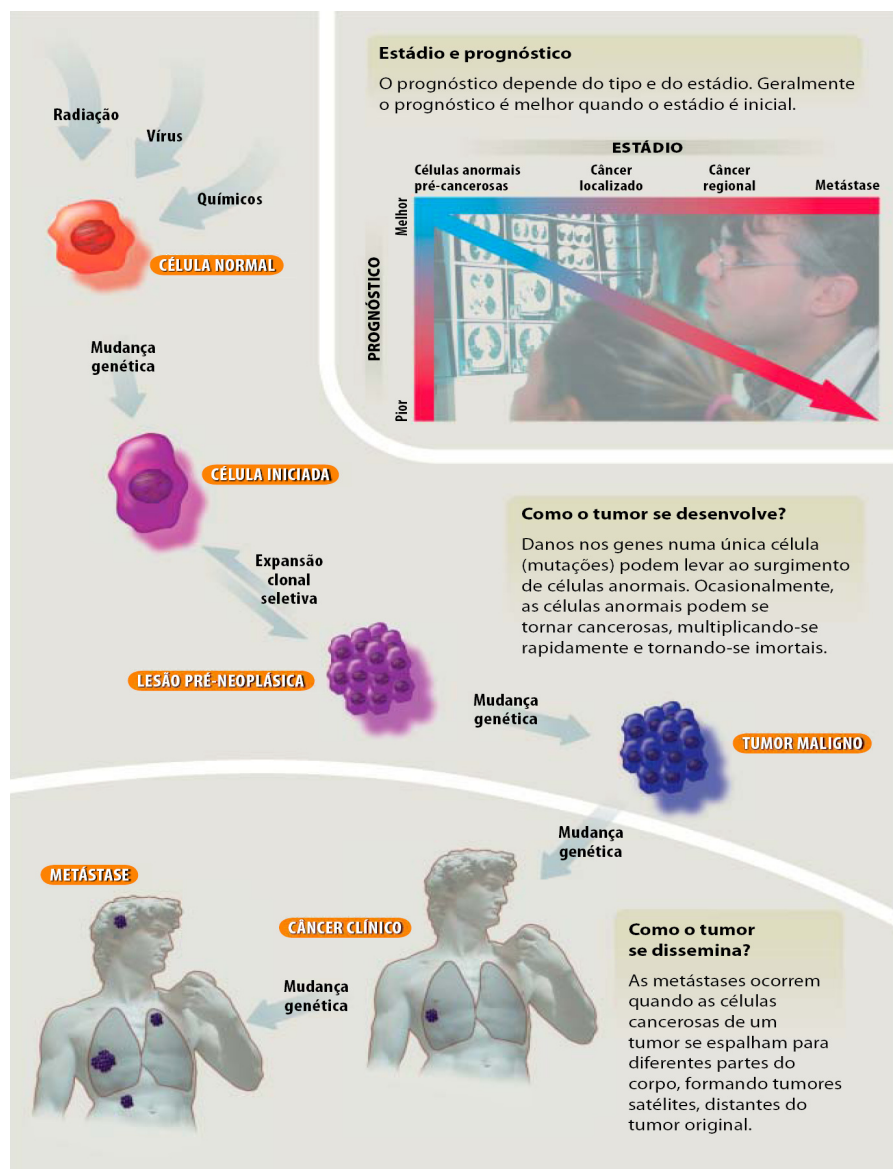
Atualmente, com o avanço computacional, campos de forças melhor parametrizados para ácidos nucléicos, softwares com excelentes desempenhos e exatidão para sistemas biológicos, nos possibilitam o estudo e a investigação do comportamento do DNA no ambiente (água, íons e fármacos), estudos esses que são difíceis de ver ou interpretar experimentalmente<sup>29</sup>.

### **3.3. O FÁRMACO ANTITUMORAL ECTEINASCIDINA**

O corpo humano é todo formado por células que se organizam em tecidos e órgãos. As células normais se dividem, amadurecem e morrem, renovando-se a cada ciclo. O câncer se desenvolve quando células anormais deixam de seguir esse processo natural, sofrendo mutação que pode provocar danos em um ou mais genes de uma única célula<sup>33</sup>.

Os genes são segmentos do DNA, que controlam as funções normais das células. Quando danificada, a célula se divide descontroladamente e produz novas células anormais. Se falham os sistemas de reparo e imunológico na tarefa de destruir e limitar essas células anormais, as novas vão se tornando cada vez mais anormais, eventualmente produzindo células cancerosas.

As células cancerosas se dividem mais rapidamente do que as normais e geralmente são bem desorganizadas. Com o tempo, podem se empilhar umas sobre as outras, formando uma massa de tecido chamada tumor. Todo esse processo, em que uma célula normal se torna um tumor maligno ou câncer, pode levar muitos anos. O termo “estádio”<sup>40</sup> é usado para descrever a extensão ou a gravidade do câncer. No estágio inicial, a pessoa tem apenas um pequeno tumor maligno. No avançado, o tumor, maior, já pode ter se espalhado para as áreas próximas (linfonodos) ou outras partes do corpo (metástases)<sup>1</sup> (Figura 14)



**Figura 14:** Desenho representativo dos estágios de formação da metástase em células normais<sup>1</sup>.

Para determinar a chance de cura do câncer (prognóstico), os médicos consideram vários fatores, inclusive o tipo e o estágio do câncer.

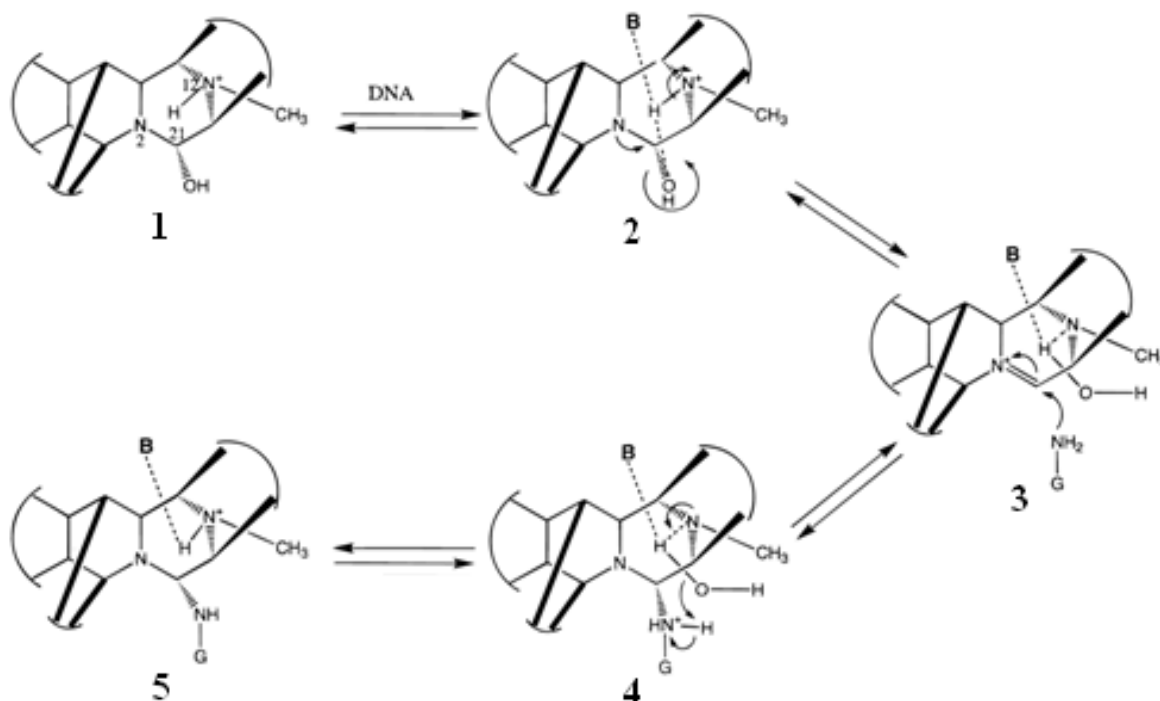
Estatisticamente, em pesquisa realizada pela Organização Mundial da Saúde, o câncer é a principal causa de óbitos no mundo com 12%, cerca de 6,0 milhões de pessoas por ano<sup>34</sup>. Além de ser uma das doenças que mais causam temor na sociedade, tornou-se um estigma de mortalidade e dor.

Uma fonte promissora para combater estes altos percentuais são os oceanos, pois nos últimos anos um número considerável de produtos naturais marinhos são candidatos a novos fármacos antitumorais<sup>35</sup>. A maioria destes produtos ainda estão em testes clínicos e outros já circulam no mercado ou são previstos para logo circularem, como é o caso da ecteinascidina (ET743). A sua citotoxicidade devido a interação com o DNA está relacionada à cura de sarcomas<sup>3,36</sup>, ou seja, de cânceres de tecidos de suporte em vez dos de revestimento, tais como ossos, tecidos gordurosos, músculos e tecidos fibrosos de reforço, encontrados na maior parte do corpo<sup>34</sup>. A metade dos sarcomas se desenvolve nos membros, 40% no tronco, com permanência na cabeça e pescoço. Sarcomas em tecidos moles incluem fibrosarcomas, liposarcomas, neurofibrosarcomas, além de poderem ocorrer em qualquer idade, porém com maior probabilidade em pessoas acima de 30 anos. Exposição a algumas substâncias químicas, por exemplo, cloreto de vinila, alguns herbicidas e dioxinas, é provável o desenvolvimento de sarcomas<sup>3</sup>.

A ecteinascidina (ET743) (Trabectidina ou Yondelis<sup>TM</sup>) é a primeira de uma nova classe de fármaco anticancerígeno, é registrado nos Estado Unidos para o tratamento de adultos com sarcoma de tecido moles em estado avançado e que fármacos como antracilinas, ifosfamida falham ou quando o paciente não pode receber antracilinas/ifosfamida. O fármaco é ministrado com uma infusão de 1,5mg/m<sup>2</sup> a cada 24 horas por 3 semanas. Os testes clínicos envolvem voluntários humanos e são conduzidos sob restritas normas éticas de procedimento de forma a proteger as pessoas envolvidas. Cada teste clínico deve ser aprovado e monitorizado por uma Comissão de Revisão Institucional para assegurar que os riscos são os mais baixos possíveis e que podem ter potenciais benefícios. Os testes clínicos começam depois de um medicamento ou outra terapia passar pelo laboratório e pelos testes em animais. Podem incluir voluntários saudáveis, ou pessoas que tenham a doença para a qual o estudo do medicamento ou tratamento foi desenvolvido<sup>3,8</sup>.

Os testes clínicos são divididos em três fases, na fase I, um novo medicamento ou tratamento é testado num pequeno grupo de pessoas (20-80) pela primeira vez para avaliar a sua segurança, determinar a dosagem e identificar os efeitos secundários. Além de estabelecer características farmacocinéticas e tolerabilidade. A fase II, o medicamento ou tratamento é dado a um grupo maior de pessoas (100-300) para avaliar melhor a sua segurança, eficácia e doses do medicamento. Já na fase III, o medicamento é dado a uma quantidade maior de pessoas (1.000-3.000) para reunir uma vasta gama de informação, incluindo a confirmação da eficácia do medicamento, monitorando qualquer efeito secundário, e comparando o seu desempenho a tratamentos utilizados habitualmente. Na última fase dos testes clínicos, o medicamento continua a ser monitorado depois de ser comercializado para o público em geral.

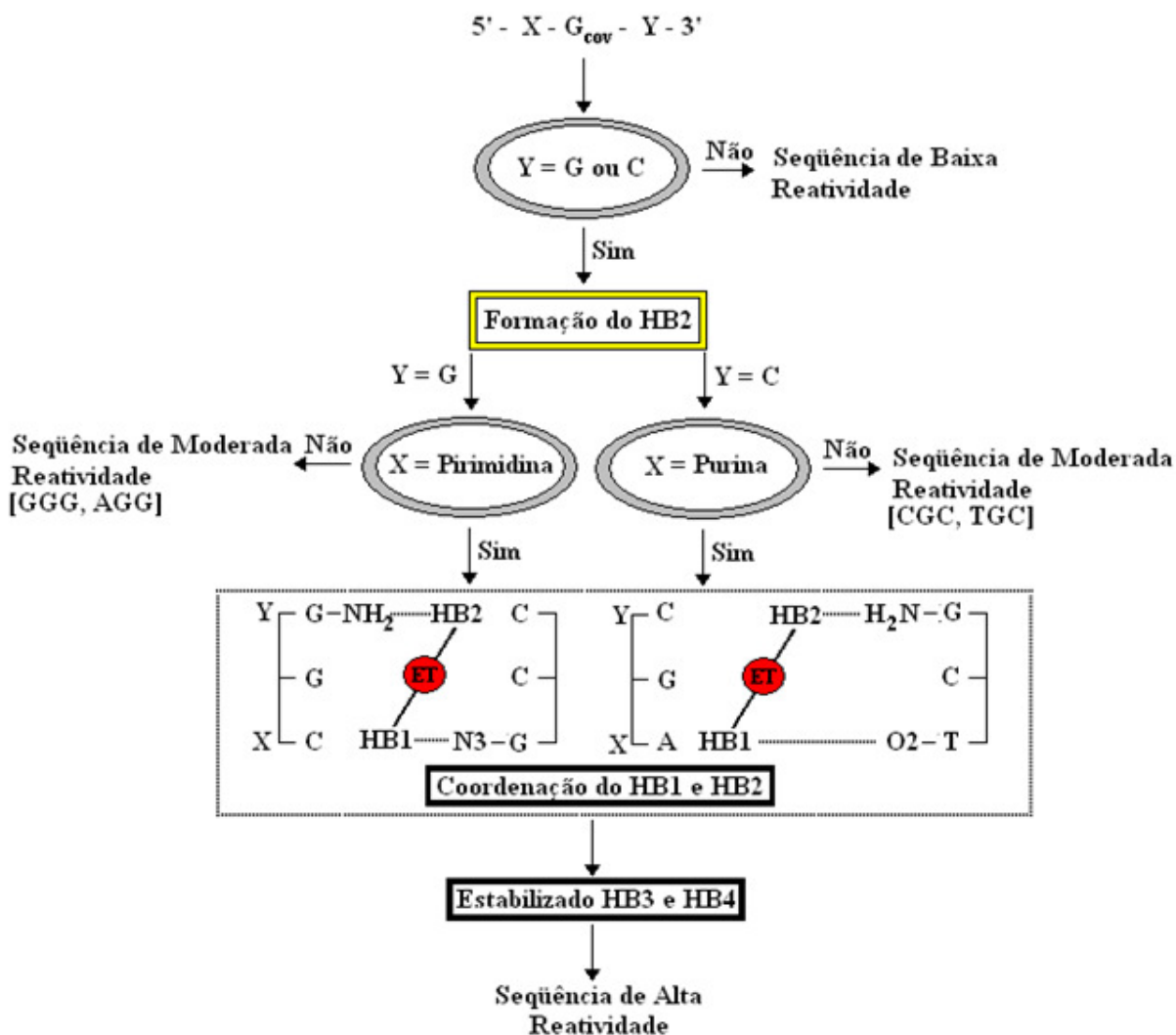
O mecanismo de ação da ET743 envolve interações com o DNA: o fármaco liga-se no sulco menor do DNA<sup>38</sup>, alquilando uma guanina na posição N2 e promovendo uma dobradura do DNA em direção ao sulco maior<sup>39</sup>. Acredita-se que com esta alquilação impede a ação do sistema de reparo celular, levando a morte da célula. Esta alquilação pode ser revertida mediante desnaturação do DNA<sup>39</sup> como mostra a figura 15.



**Figura 15:** Mecanismo da reação reversível de ET743 com o DNA para formar o aduto ET743-N2-guanina-DNA. O “B” corresponde a base do DNA aceptora da ligação de hidrogênio. O 21NH da carbinolamina (2) catalisa a desidratação do C21 retendo o íon imínio (3). Ataque nucleofílico do GN2 na (3) resulta na expulsão de uma água que contém um próton que se liberou da guanina N2 (4). O aduto resultante (5) retém o próton do N12<sup>8</sup>.

Na interação com o DNA, as unidades “A” e “B” da ET743 encontram-se posicionadas no sulco menor nos lados 5’ e 3’ do nucleotídeo alquilado, respectivamente. A unidade “C” encontra-se localizada perpendicularmente acima do sulco menor e interage apenas fracamente com o DNA. Sabe-se também que modificações na subunidade “C” afetam a potência, podendo causar redução na citotoxicidade deste composto.

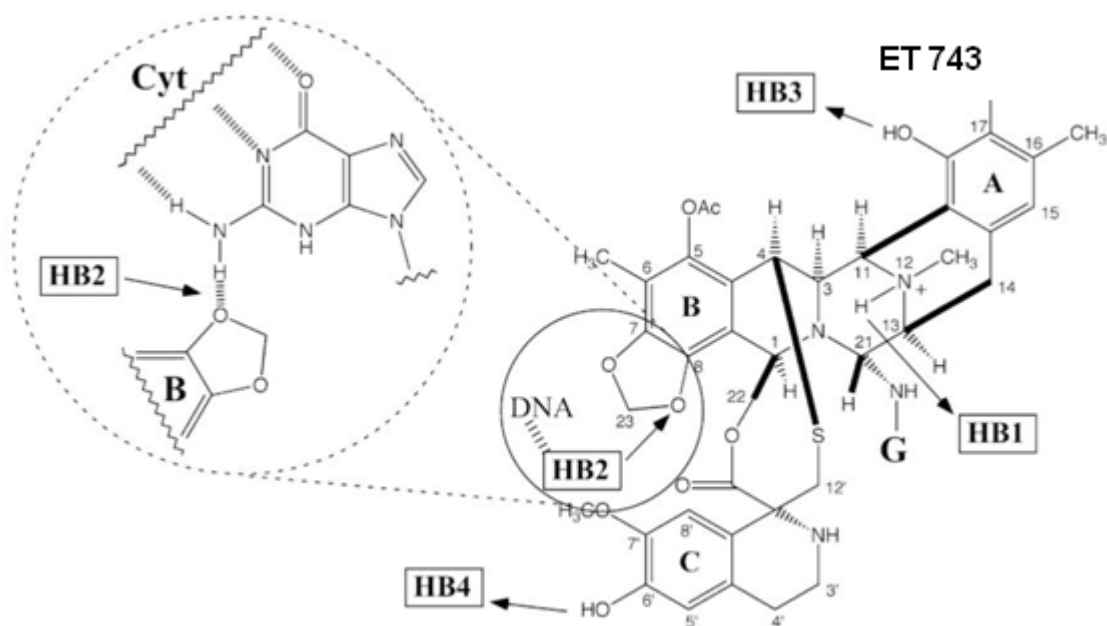
A alquilação é fortemente dependente da seqüência das bases que flanqueiam a guanina central. A ET743 liga-se preferencialmente as guaninas seguidas de uma guanina ou uma citosina<sup>39</sup>. No caso de uma guanina na posição 3’ do sítio alquilado, a ligação é favorecida se a base no lado 5’ for uma base pirimídica (C ou T) e, no caso da citosina na posição 3’, a preferência de ligação na posição 5’ é de uma base purínica (A ou G). Esta seletividade está sendo representada no esquema da (Figura 16).



**Figura 16:** Fluxograma de reatividade de seqüências específicas de três bases de seqüência 5'-XG<sub>cov</sub>Y, mostra que Y deve ser G ou C, e dependendo da base que ocupar Y, o X deve ser o tipo de sistema oposto. A relação entre as regras destas seqüências e a ligação de hidrogênio entre DNA-fármaco é mostrada no fluxograma que conduz no final à meta da reatividade mais alta<sup>8</sup>.

A especificidade de interação da ET743 com a seqüência está relacionada às interações de ligações de hidrogênio entre o fármaco e as bases nitrogenadas do DNA, sendo importante a tríade de pares de base em torno da guanina alquilada<sup>31</sup>, como mostrou a figura 16. Assim, um aspecto importante na compreensão do mecanismo de ação reside na caracterização microscópica detalhada das interações de hidrogênio entre a ET743 e diferentes sítios de ligação. A figura 17 mostra o esquema de ligações de hidrogênio da ET743 com a tríade de pares de base com a qual ela interage. Dependendo da seqüência com a qual a Ecteinasidina interage, algumas ligações de hidrogênio podem eventualmente estar ausentes ou apresentar-se numa geometria diferente.





**Figura 17:** Estrutura da ET743 e sítios de interação de ligações de hidrogênio (HBs) entre ET743 e DNA (numeração das ligações no complexo covalente)<sup>40</sup>.

Na figura 17 está representada a numeração das ligações no complexo covalente. No complexo não covalente há cinco ligações de hidrogênio. A ligação HB4, porém, desaparece quando há a alquilação da guanina.

Na Tabela 2 estão listadas as ligações de hidrogênio (HB) entre os oligonucleotídeos e a ET743, conforme descrito na literatura<sup>41</sup>.

**Tabela 2:** Grupos doadores e aceptores das ligações de hidrogênio dos complexos não-covalentes entre ET743 e oligonucleotídeos.

Ligações de Hidrogênio	d(CGATAGTATCCG)		d(CGATAGGATCCG)		d(CGATCGGATCCG)	
	Doador	Aceptor	Doador	Aceptor	Doador	Aceptor
HB1	ET (N42)	T20 (O2)	ET (N42)	T20 (O2)	ET (N42)	G20 (N3)
HB2	-	-	G7 (N2)	ET (O5)	G7 (N2)	ET (O5)
HB3	ET (O47)	T20 (O3')	ET (O47)	T20 (O3')	ET (O47)	G20 (O3')
HB4	G6 (N2)	ET (O55)	G6 (N2)	ET (O55)	G6 (N2)	ET (O55)
HB5	ET (O34)	T9 (O1P)	ET (O34)	T9 (O1P)	ET (O34)	T9 (O1P)

As seqüências de oligonucleotídeos escolhida para este trabalho foram escolhidas de acordo com o critério de terem diferentes reatividades frente ao fármaco antitumoral ET743, por exemplo, d(CGATAGTATCCG) apresenta baixa reatividade (Figura 16) em sua interação com o fármaco, a seqüência d(CGATAGGATCCG) apresenta moderada reatividade (Figura 16) frente a ET743, já a seqüência d(CGATCGGATCCG) apresenta alta reatividade perante a ET743. Outro fator importante, na escolha dos oligonucleotídeos, foram os dados registrados na literatura<sup>41</sup>, sobre os sítios de interação e distância das ligações.

#### 4. METODOLOGIA

Os estudos da estrutura de ET743 e dos oligonucleotídeos (fragmentos de DNA) sob a forma de dodecâmeros foram realizados utilizando-se a metodologia da dinâmica molecular visando observar as propriedades conformacionais em condições próximas das fisiológicas (e.g. solvente e íons considerados explicitamente). Todas as simulações envolvem o campo de força GROMOS<sup>21</sup>, na sua versão 53A6<sup>20</sup> e o pacote GROMACS 3.3.1<sup>21</sup>. A escolha do campo de força envolveu uma extensa fase de testes preliminares, pois é sabido que, por ser rico em ligações de hidrogênio e em grupamentos carregados, o DNA é difícil de ser simulado computacionalmente, exigindo escolha criteriosa do campo de força utilizado. Com a implementação do campo de força GROMOS, na sua versão 53A6 do pacote GROMACS 3.3.1, que mostrava-se melhor parametrizado para ácidos nucleicos, as simulações foram refeitas.

A estrutura inicial da ET743 foi gerada mediante construção com o programa GAUSSVIEW<sup>42</sup>, com subsequente minimização usando cálculos *ab-initio* na base 6-31G\*\* utilizando-se o programa GAUSSIAN<sup>42</sup>. Este cálculo também forneceu as cargas atômicas parciais de Mulliken da ET743, necessárias para a simulação. A estrutura obtida foi submetida ao programa PRODRG para a geração da topologia e estimativa dos parâmetros ligantes e não-ligantes (van der Waals) do campo de força.

Após, a estrutura da ET743 foi solvatada em condições fisiológicas (concentração de NaCl = 0,154 mol.L<sup>-1</sup>) com o modelo de água SPC<sup>25</sup> com aplicação de condições de periódicas de contorno. A estrutura foi então submetida a procedimentos de minimização de energia empregando-se o método *steepest descent* e também o método dos *gradientes conjugados*. Posteriormente, foi submetida a um período curto de dinâmica molecular com aplicação de *position restraints* sobre as estruturas dos solutos. As velocidades iniciais foram calculadas de acordo com a distribuição de Maxwell. Posteriormente, as simulações foram rodadas a temperatura (310K) e pressão (1atm) constantes (*ensemble* NpT com o termostato e o barostato de Berendsen) e com emprego de passos de integração de 2fs.

As distâncias das ligações foram mantidas constantes com o uso do algoritmo SHAKE. Para fins de análise, as trajetórias foram consideradas somente após a convergência das principais propriedades termodinâmicas e estruturais dos sistemas. A estrutura final foi utilizada para a simulação dos complexos com os oligonucleotídeos, como será descrito posteriormente.

Foram escolhidos 5 oligonucleotídeos modelos cujas tríades centrais exibem alta reatividade d(CGATAGCATCCG) e d(CGATCGGATCCG), média reatividade d(CGATAGGATCCG) e baixa reatividade d(CGATCGAATCCG) e d(CGATAGTATCCG) frente à ET743. As estruturas dos oligonucleotídeos foram geradas com o módulo *fiber* do programa X3DNA<sup>31,32</sup> na forma canônica B, que é a forma mais estável em condições fisiológicas. Logo após, a estrutura foi submetida ao módulo *pdb2gmx* do pacote GROMACS.

As estruturas dos oligonucleotídeos foram posteriormente solvatadas em condições fisiológicas e submetidas a protocolos de simulação similares aos da ET743. A colocação dos íons nos oligonucleotídeos, devido às suas cargas, procedeu de modo não aleatório (*no random*), mediante cálculo do potencial eletrostático. A caracterização das estruturas iniciais, bem como a evolução destas estruturas, fez uso dos parâmetros de geometria de pares de base do programa X3DNA, mostrados nas figuras 12 e 13.

Na simulação dos complexos não covalentes entre a Ecteinasclidina e os oligonucleotídeos, foi necessário o posicionamento cuidadoso entre o fármaco e o sítio de possível interação no DNA. Como não foram usados programas de docking para DNA, este posicionamento foi feito manualmente no programa Swiss Pdb-Viewer<sup>44</sup> e complementado usando o método do “pulling”, isto é, aproximando grupos com uma velocidade constante ao longo da simulação (dinâmica forçada), embora a obtenção de resultados satisfatórios por este método seja computacionalmente dispendiosa. Além de ser muito dependente do procedimento manual de docking, é importante salientar que a própria “dinâmica forçada” envolve várias etapas de tentativa e erro até o estabelecimento de um protocolo confiável de simulação.

Após a aproximação, procedeu-se a simulações do tipo dinâmica molecular sem restrições por 500ps para cada sistema, com o intuito de amostrar as características estruturais, dinâmicas e termodinâmicas.

As alterações estruturais no DNA, induzidas pela proximidade e interação com a ET743 foram caracterizadas usando o programa X3DNA, com parâmetros análogos aos usados na caracterização dos oligonucleotídeos puros, visando separar as alterações induzidas pelo fármaco das flutuações naturais da estrutura. Também analisamos os padrões de ligações de hidrogênio (HBs) entre a ET743 e os nucleotídeos dos sítios de interação (Tabela 2), comparando-os com a literatura.

Após geração dos resultados dos complexos não covalentes, foi mapeado e escolhido o complexo não covalente mais estável (melhor posicionamento da ET743 nos sítios de interação), e a partir de sua estrutura realizamos afastamentos do fármaco de seus sítios no oligonucleotídeos. Estes afastamentos foram feitos por uma série de “pullings” dinâmicas forçadas, visando a análise das energias e monitorando os diversos termos energéticos até a convergência, além do cálculo de características estruturais.

Desenvolvemos também uma metodologia para construção dos complexos covalentes entre a ET743-DNA. A formação deste complexo ocorre através da alquilação do N2 da guanina, com a formação de uma ligação C-N e perda da água. Assim, foi necessário a exclusões nas geometrias e nas topologias de alguns átomos, bem como uma redefinição de alguns graus de liberdade do sistema nos arquivos de topologia, o que foi realizado usando o script *reorder.pl* do programa GROMACS.

#### 4.1. ANÁLISES REALIZADAS

As ferramentas usuais de caracterização dos resultados de dinâmica molecular em sistemas biológicos consistiram na análise energética através do comando (*g\_energy*) que calcula os componentes da energia do sistema. A análise do desvio quadrático médio da estrutura (RMSD) em relação à estrutura de referência (*g\_rms*), na análise da mobilidade relativa dos segmentos (RMSF) com o *g\_rmsf*, monitoramento das ligações através do comando *g\_bond* que mede a distância das ligações de hidrogênio (HBs) entre a ET743 e os sítios de interação nos oligonucleotídeos, os ângulos pelo comando (*g\_angle*) que calcula a flutuação dos ângulos de curvatura na estrutura do oligonucleotídeo, formados entre **2G – 6G – 14G** e entre **2G – 7G – 11C**, a mínima distância pelo comando (*g\_mindist*) para monitorar a flutuação entre a ET743 e as bases: **5C, 6G, 7G, 20G, 21A** na aproximação forçada da ET743 dos sítios de interação, o *fit* entre as estruturas pelo comando (*g\_confrms*), o qual computa o RMSD de duas estruturas e sobrepõem as mesmas (a segunda em relação a primeira). Além do uso de ferramentas de visualização, como os programas RasMol<sup>46</sup>, VMD<sup>43</sup> e SPDBV<sup>44</sup> para a análise das ligações de hidrogênio e as modificações na estrutura dos oligonucleotídeos ao longo da dinâmica ou de análise estrutural mais específica, com o uso do programa X3DNA<sup>31,32</sup> para parâmetros geométricos de bases dos nucleotídeos.

A Tabela 3 indica quais destas análises citadas acima foram feitas para cada um dos sistemas simulados.

**Tabela 3:** Análises realizadas durante as simulações, via dinâmica molecular.

<b>Sistemas</b>	<b>RMSD</b>	<b>RMSF</b>	<b>g_hbond</b>	<b>g_energy</b>	<b>g_confrms</b>	<b>g_mindist</b>	<b>g_angle</b>	<b>VMD</b>	<b>X3DNA</b>
ET743	X	X		X					
DNA	X	X						X	X
Complexos Não									
Covalentes (ET743+DNA)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Complexos									
Covalentes (ET743+DNA)	X	X			X			X	X

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

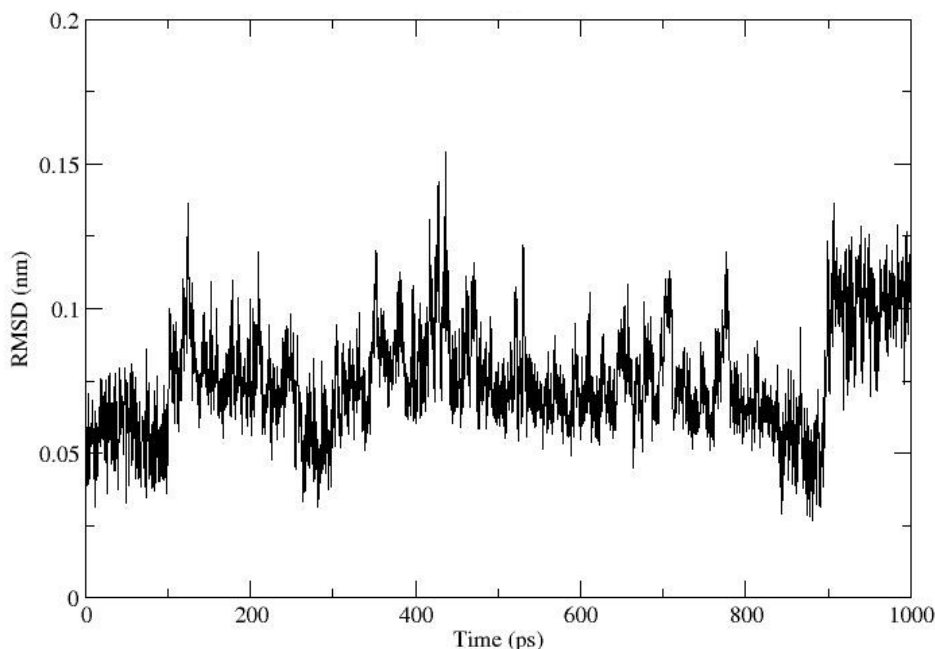
### 5.1. RESULTADOS DA ET743

O cálculo das cargas parciais da ET743, foi realizado com o programa GAUSSIAN com a otimização usando cálculo *ab-initio* na base 6-31G\*\*, a qual também forneceu suporte para o programa PRODRG para a geração da topologia inicial abaixo descrita.

[ atoms ]

nr	type	resnr	resid	atom	cgnr	charge	mass	
1	CH3	1	ECT	C18	1	0.110	15.0350	; 0.127
2	C	1	ECT	C16	1	0.832	12.0110	; 0.441
3	O	1	ECT	O17	1	-0.574	15.9994	; -0.572
4	OA	1	ECT	O15	1	-0.771	15.9994	; -0.152
5	C	1	ECT	C14	1	0.406	12.0110	; 0.156
6	C	1	ECT	C9	2	-0.061	12.0110	; -0.029
7	CH3	1	ECT	C10	2	0.164	15.0350	; 0.079
8	C	1	ECT	C8	2	0.342	12.0110	; 0.117
9	OA	1	ECT	O7	2	-0.697	15.9994	; -0.202
10	CH1	1	ECT	C6	2	0.716	14.0270	; 0.237
11	OA	1	ECT	O5	2	-0.712	15.9994	; -0.202
12	C	1	ECT	C4	3	0.385	12.0110	; 0.082
13	C	1	ECT	C3	3	-0.034	12.0110	; -0.041
14	C	1	ECT	C19	3	-0.063	12.0110	; -0.041
15	CH2	1	ECT	C20	4	-0.317	13.0190	; 0.000
16	S	1	ECT	S	5	0.417	32.0600	; 0.057
17	CH1	1	ECT	C23	5	-0.034	14.0270	; 0.093
18	CH1	1	ECT	C21	5	0.295	13.0190	; 0.131
19	CH2	1	ECT	C44	5	0.136	13.0190	; 0.130
20	NL	1	ECT	N42	5	-0.802	14.0067	; 0.594
21	H	1	ECT	H42	5	0.403	1.0080	; -0.005
22	CH3	1	ECT	C43	6	0.462	15.0350	; 0.039
23	C	1	ECT	C45	6	-0.096	12.0110	; -0.039
24	C	1	ECT	C46	7	0.410	12.0110	; 0.130
25	OA	1	ECT	O47	7	-0.722	15.9994	; -0.190
26	H	1	ECT	H47	7	0.389	1.0080	; 0.042
27	C	1	ECT	C47	7	0.371	12.0110	; 0.130
28	OA	1	ECT	O48	7	-0.710	15.9994	; -0.182
29	CH3	1	ECT	C49	7	0.384	15.0350	; 0.096
30	C	1	ECT	C50	7	-0.064	12.0110	; -0.026
31	CH3	1	ECT	C51	8	0.147	15.0350	; 0.041
32	CR1	1	ECT	C52	8	-0.219	12.0110	; -0.019
33	HC	1	ECT	H52	8	0.258	1.0080	; 0.014
34	C	1	ECT	C53	8	0.034	12.0110	; -0.038
35	CH2	1	ECT	C54	8	0.138	14.0270	; 0.059
36	CH1	1	ECT	C41	8	0.216	13.0190	; 0.094
37	CH1	1	ECT	C40	8	0.577	13.0190	; 0.095
38	OA	1	ECT	O55	8	-0.633	15.9994	; -0.275
39	H	1	ECT	H55	8	0.359	1.0080	; 0.029
40	NL	1	ECT	N22	9	-0.682	14.0067	; -0.247
41	CH2	1	ECT	C2	9	0.201	13.0190	; 0.164
42	CH1	1	ECT	C1	9	0.487	14.0270	; 0.297
43	OA	1	ECT	O27	9	-0.704	15.9994	; -0.165
44	C	1	ECT	C25	9	0.948	12.0110	; 0.403
45	O	1	ECT	O26	9	-0.612	15.9994	; -0.626
46	CH2	1	ECT	C24	9	-0.103	12.0110	; 0.174
47	C	1	ECT	C28	10	0.002	12.0110	; -0.019
48	CR1	1	ECT	C29	10	-0.225	12.0110	; -0.009
49	HC	1	ECT	H29	10	0.257	1.0080	; 0.028
50	C	1	ECT	C30	11	0.356	12.0110	; 0.126
51	OA	1	ECT	O31	11	-0.759	15.9994	; -0.188
52	CH3	1	ECT	C32	11	0.383	15.0350	; 0.091
53	C	1	ECT	C33	11	0.382	12.0110	; 0.126
54	OA	1	ECT	O34	11	-0.738	15.9994	; -0.196
55	H	1	ECT	H34	11	0.411	1.0080	; 0.041
56	CR1	1	ECT	C35	12	-0.233	12.0110	; -0.012
57	HC	1	ECT	H35	12	0.269	1.0080	; 0.022
58	C	1	ECT	C36	12	-0.023	12.0110	; -0.023
59	CH2	1	ECT	C37	12	0.058	14.0270	; 0.128
60	CH1	1	ECT	C38	12	0.221	14.0270	; 0.128
61	NL	1	ECT	N39	12	-0.672	14.0067	; -0.239
62	H	1	ECT	H7F	12	0.334	1.0080	; -0.004

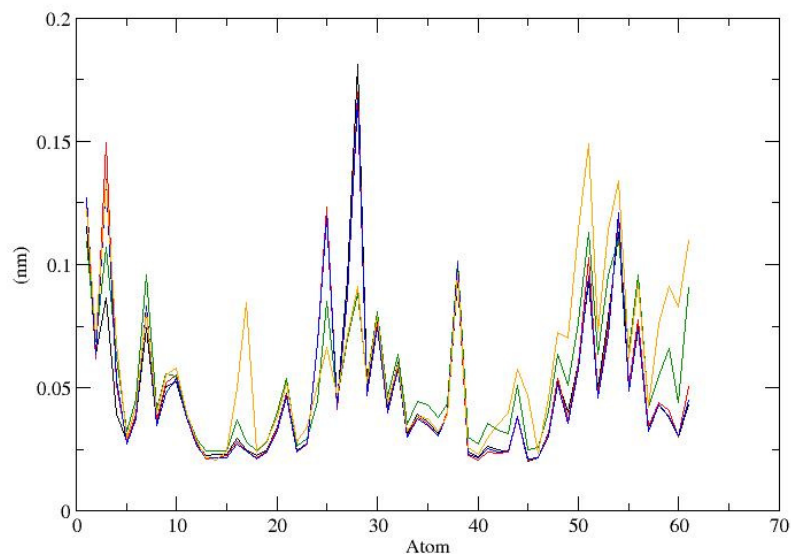
Após minimização de energia, solvatação e *position restraints*, a simulação da ET743 mostrou que esta molécula sofreu apenas um pequeno desvio de sua estrutura inicial ao longo da dinâmica como podemos observar na figura 18, que mostra o RMSD para a estrutura da ET743.



**Figura 18:** RMSD de todos os átomos da estrutura da ET743 após 1,0ns.

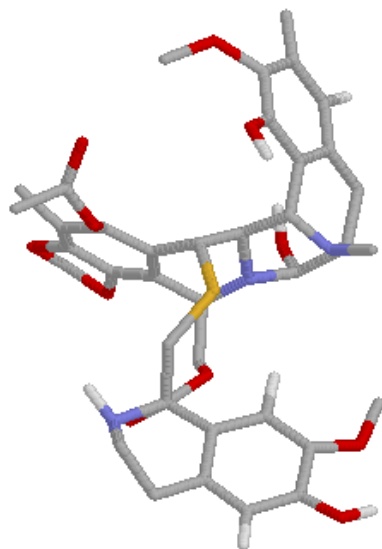
Pela figura 18 notamos que a ET743 já está em equilíbrio, uma vez que o valor do RMSD é bastante baixo e há não tendência de aumentar. Além de observarmos que a flutuação da estrutura é pequena, ou seja, o RMSD mostra apenas a flutuação normal da ET743. O monitoramento da energia potencial da ET743 (não mostrado) também confere estabilidade. Pela figura 19 que mede o RMSF, podemos notar que há picos de flutuações de alguns átomos da estrutura, mas concordando com o resultado do RMSD, as flutuações mostram valores muito baixos.





**Figura 19:** RMSF de todos os átomos da estrutura da ET743. As diferentes cores se referem a diferentes escala de tempo.

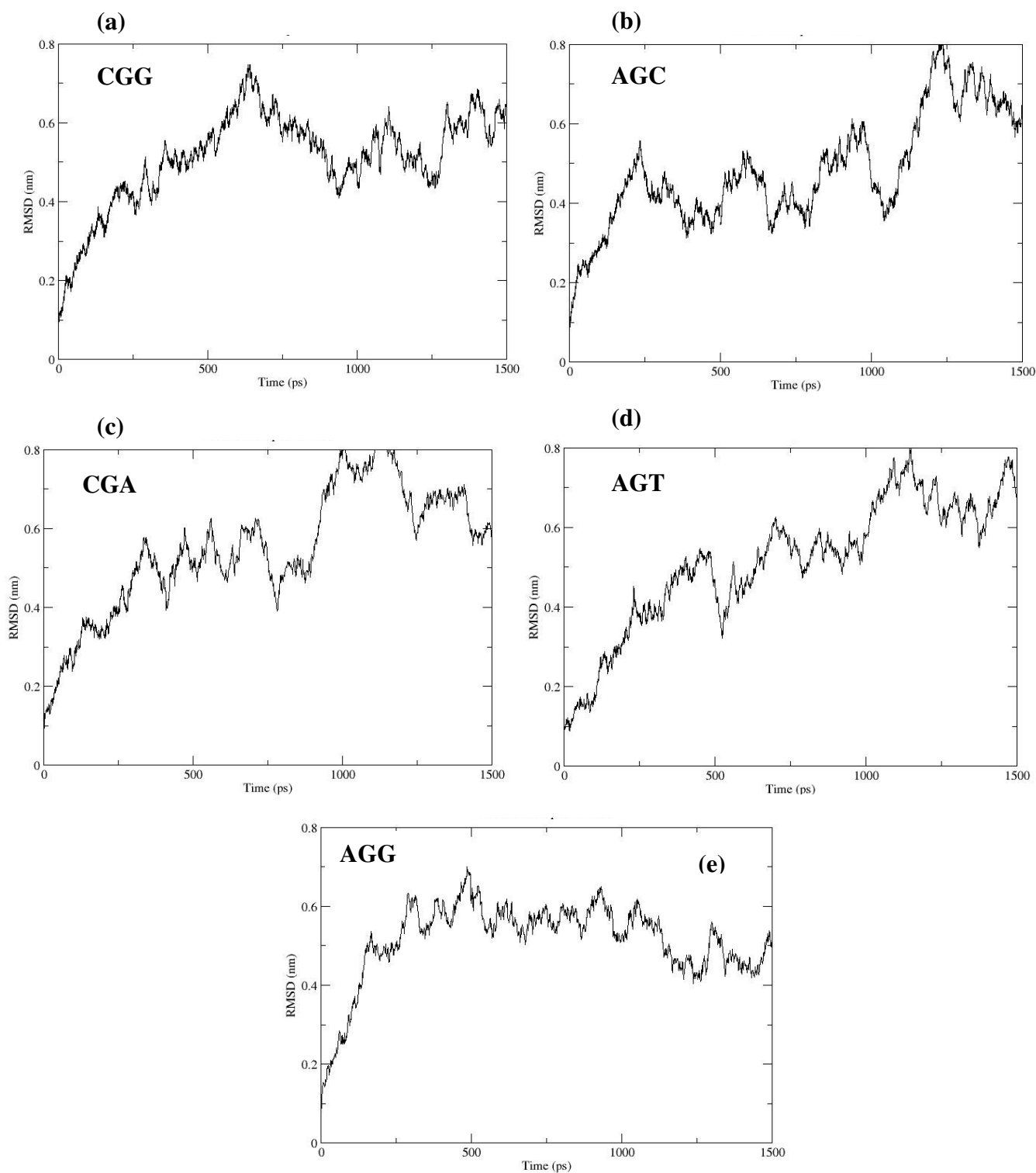
Na figura 20, temos a representação da estrutura da ET743 ao final de 1,0 ns de simulação via dinâmica molecular, podemos observar que a estrutura está bem conservada.



**Figura 20:** Representação 3D do fármaco antitumoral ET743 após 1,0ns. Átomos hidrogênio (branco), oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul), carbono (cinza), enxofre (amarelo).

## 5.2. RESULTADOS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS EM SOLUÇÃO

Os oligonucleotídeos de modo geral apresentaram desvios de sua estrutura em relação à inicial, apresentando assim uma grande mobilidade estrutural (Figura 21).



**Figura 21:** RMSD de todos os átomos das seqüências de oligonucleotídeos após 1,5 ns de dinâmica. (a) CGG, (b) AGC, (c) CGG, (d) AGT e (e) AGG.

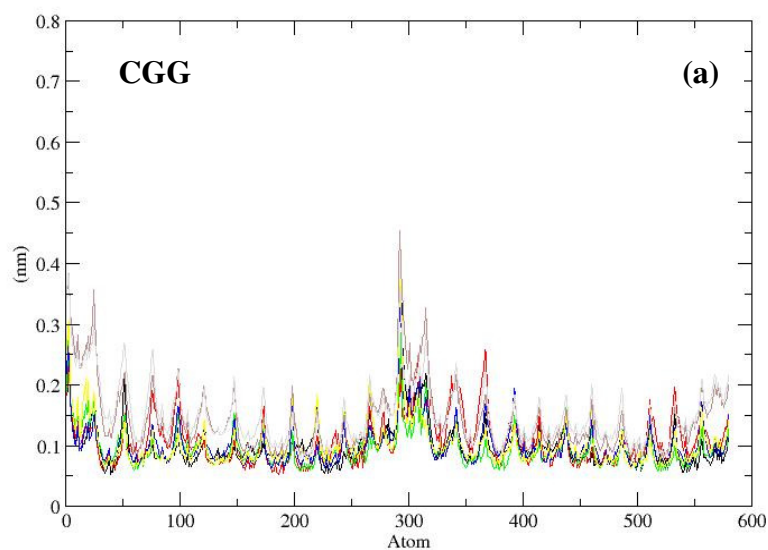
Como os RMSD das seqüências de oligonucleotídeos foram feitos contabilizando todos os átomos temos uma grande variação da estrutural devido a mobilidade das extremidades dos oligonucleotídeos.

Pela figura 21 podemos observar que algumas seqüências de oligonucleotídeos já alcançaram o equilíbrio de sua estrutura, por exemplo, CGG e AGG, após 900 ps e 600 ps respectivamente. Além disso, as duas seqüências, também apresentam pouca flutuação da estrutura ao longo da simulação como mostra a figura 22a e 22e. Esta estabilidade também é visível pela conservação das ligações de hidrogênio entre os pares de base destas seqüências através da figura 24 e figura 27.

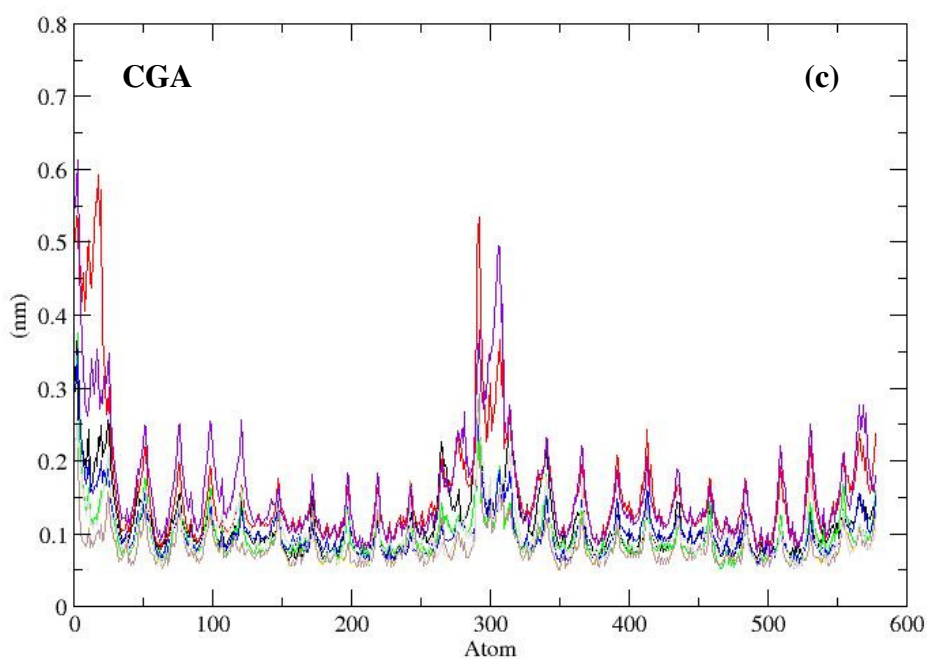
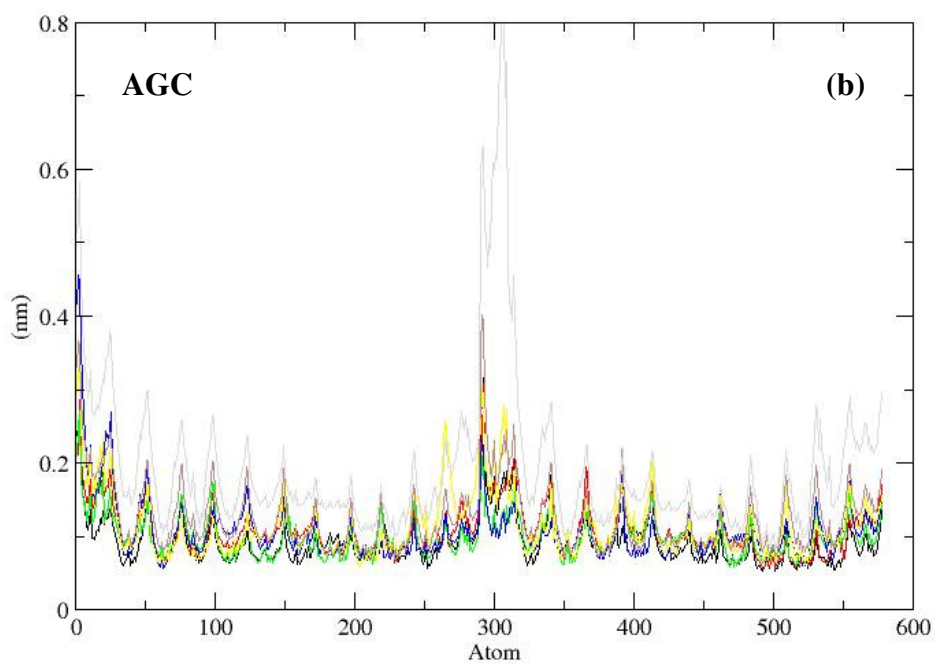
Porém, a seqüência CGA precisa de uma escala de tempo um pouco maior para tentarmos visualizar sua estabilização (Figura 21c), que aparentemente nos 200 ps finais se mostra entrando em estabilização. Mas, ao analisarmos a seqüência CGA pela Figura 25 notamos que nos 200 ps finais um dos pares de base da extremidade se afastam, um fator que pode indicar a ocorrência do “efeito zíper” (quebra seqüencial das ligações de hidrogênio entre as bases) na estrutura se deixarmos uma dinâmica com um tempo maior de simulação.

Já as seqüências AGC e AGT, estão ainda afastadas da estabilização estrutural até os decorridos 1,5 ns (Figura 21).

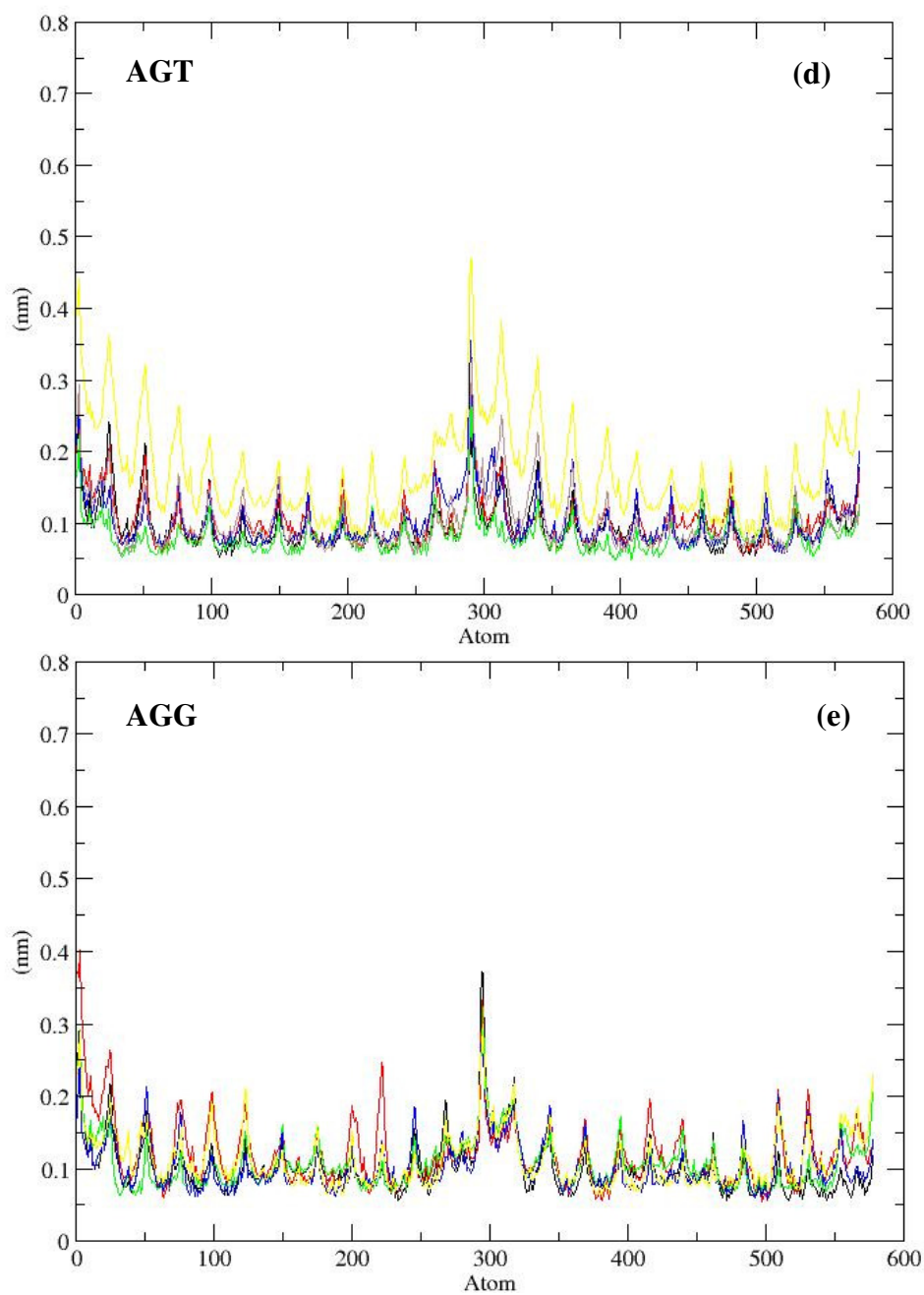
Além dos desvios de estrutura, podemos notar pela (Figura 22) que mostra a flutuação dos segmentos da estrutura, mobilidade nos segmentos iniciais e finais dos oligonucleotídeos.



**Figura 22:** RMSF de todos os átomos das seqüências de oligonucleotídeos. (a) CGG, (b) AGC, (c) CGG, (d) AGT e (e) AGG. As diferentes cores se referem a diferentes escala de tempo.



**Figura 22:** Continuação. RMSF de todos os átomos das seqüências de oligonucleotídeos. (a) CGG, (b) AGC, (c) CGG, (d) AGT e (e) AGG. As diferentes cores se referem a diferentes escala de tempo.



**Figura 22:** Continuação. RMSF de todos os átomos das seqüências de oligonucleotídeos. (a) CGG, (b) AGC, (c) CGG, (d) AGT e (e) AGG. As diferentes cores se referem a diferentes escala de tempo.

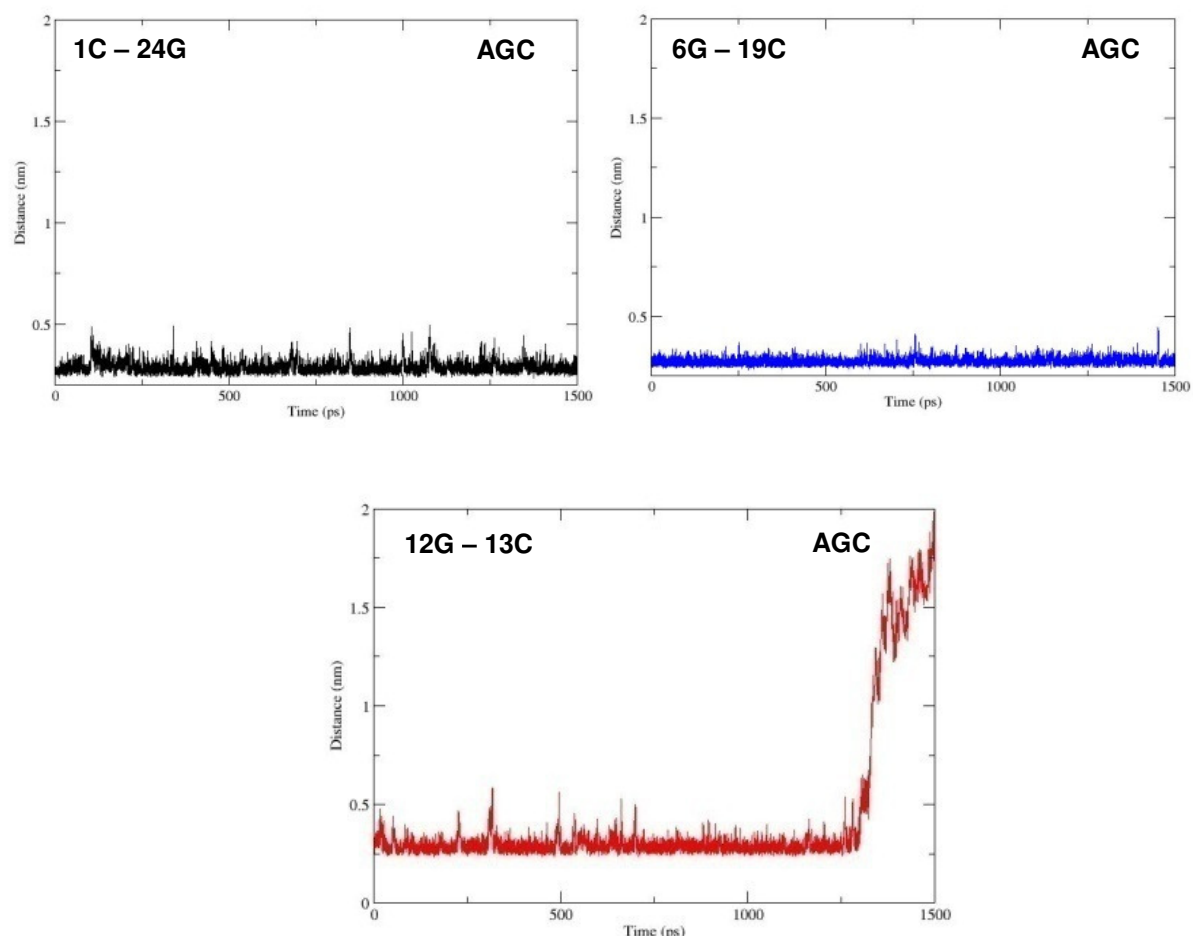
A figura 22 pode ser entendida da seguinte forma, temos vinte quatro (24) picos, cada um deles corresponde a um segmento dos oligonucleotídeos, ou seja, um par de base, ponto mais alto do pico corresponde a um dos oxigênios do grupo fosfato, porque tem uma maior mobilidade do que os pares de base. Do átomo 0 até aproximadamente o 300 temos a primeira fita do oligonucleotídeo e do 300 até aproximadamente o 600 temos a fita complementar do oligonucleotídeo, ou seja, a parte inicial, central e final dos diagramas RMSF correspondem as extremidades dos oligonucleotídeos e os pares de bases centrais da estrutura se localizam entre 100-200 e 400-500 dos diagramas.

Assim, pela figura 22b e 22c notamos que as seqüências AGC e CGA são as que apresentam maior flutuação nas extremidades dos oligonucleotídeos, ocorrendo o rompimento das ligações de hidrogênio dos pares de base das extremidades (1C-24G e 12G-13C), podendo levar ao “efeito zíper”.

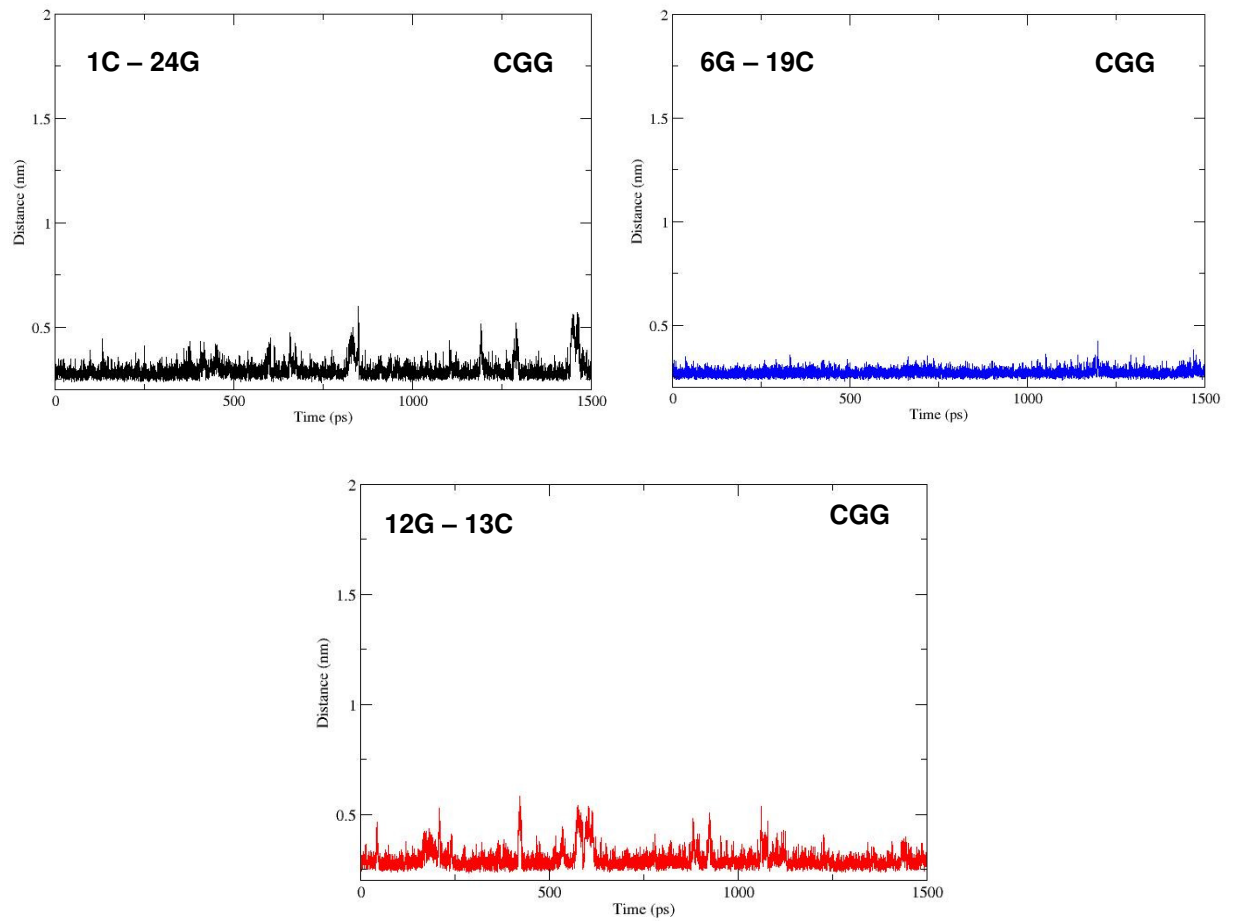
Em contrapartida em todas as seqüências ocorre pouca flutuação dos pares de bases centrais, ou seja, são conservadas as ligações de hidrogênio entre eles. Podemos complementar esta análise monitorando as distâncias dos pares de bases centrais e das extremidades das seqüências de oligonucleotídeos.

As figuras 23, 24, 25, 26 e 27 mostram a distância das ligações de hidrogênio entre os pares de bases das extremidades (1C-24G), (12G-13C) e central (6G-19C). Notamos que, a distância das ligações dos pares de bases centrais se mantém conservada na maioria das seqüências analisadas, sendo as com menor variação ocorre com a AGG (Figura 27) e AGT (Figura 26). Nas seqüências AGC (Figura 23) e CGA (Figura 25) constatamos o rompimento das ligações dos pares de bases das extremidades.

Não foi encontrada nenhuma correlação entre a reatividade das seqüências de nucleotídeos frente à ecteinascidina (AGC e CGG alta reatividade, AGG média reatividade e AGA e AGT baixa reatividade) e a estabilidade dos oligonucleotídeos isolados.

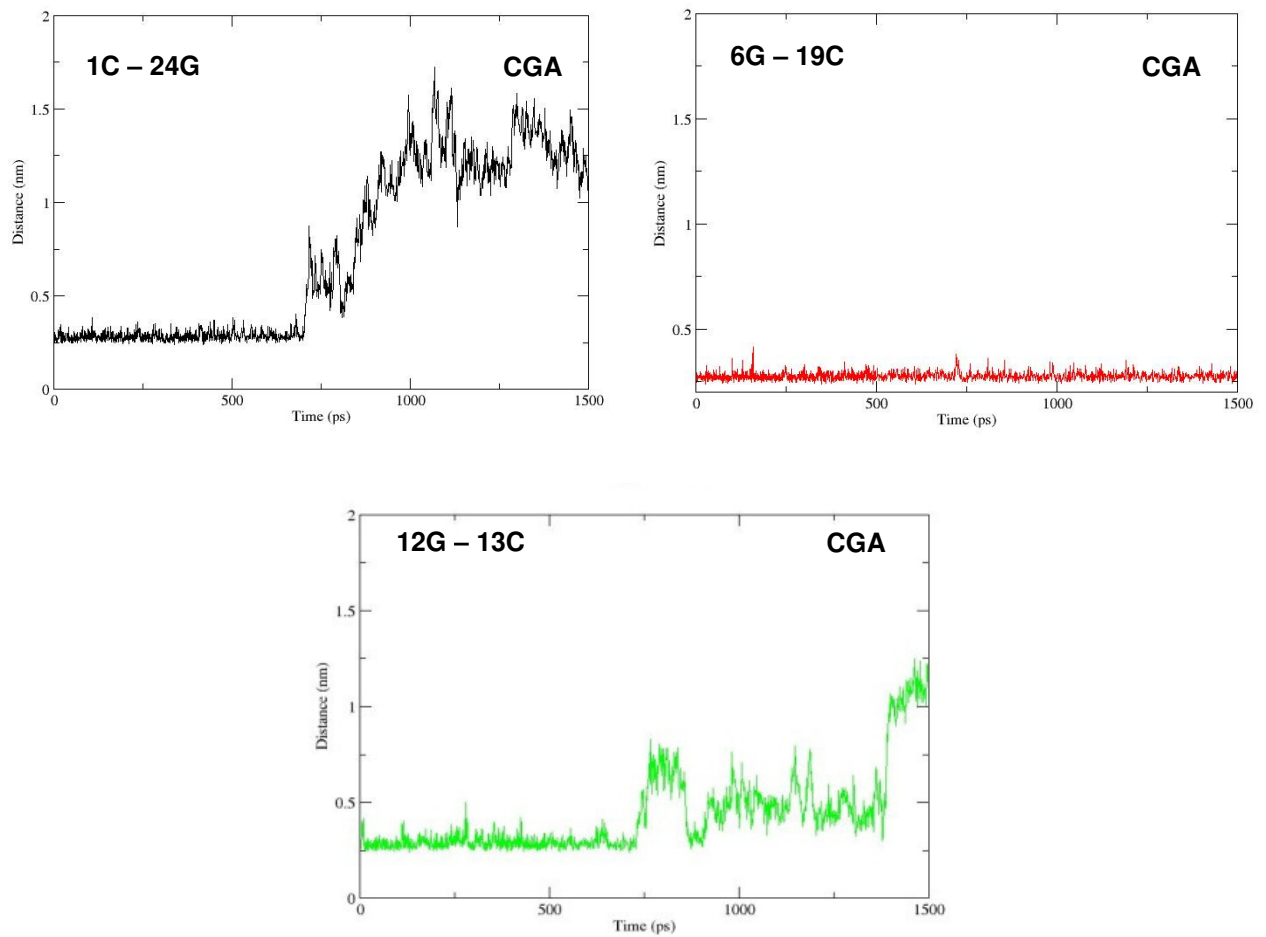


**Figura 23:** Distâncias médias do pares de bases após 1,5ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATAGCATCCG). Linha preta (1C-24G) e vermelha (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha azul (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo.

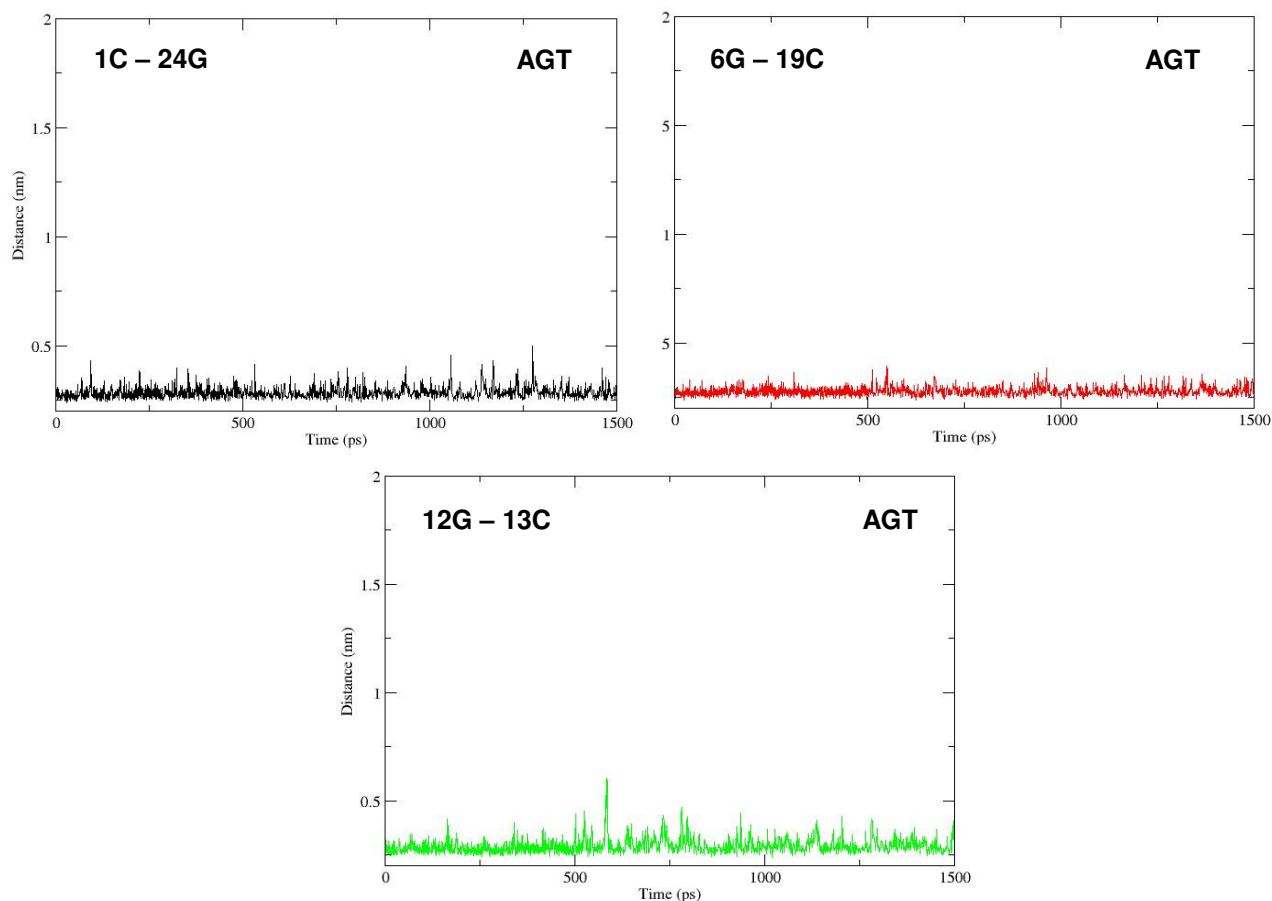


**Figura 24:** Distâncias médias do pares de bases após 1,5ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATCGGATCCG). Linha preta (1C-24G) e vermelha (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha azul (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo.

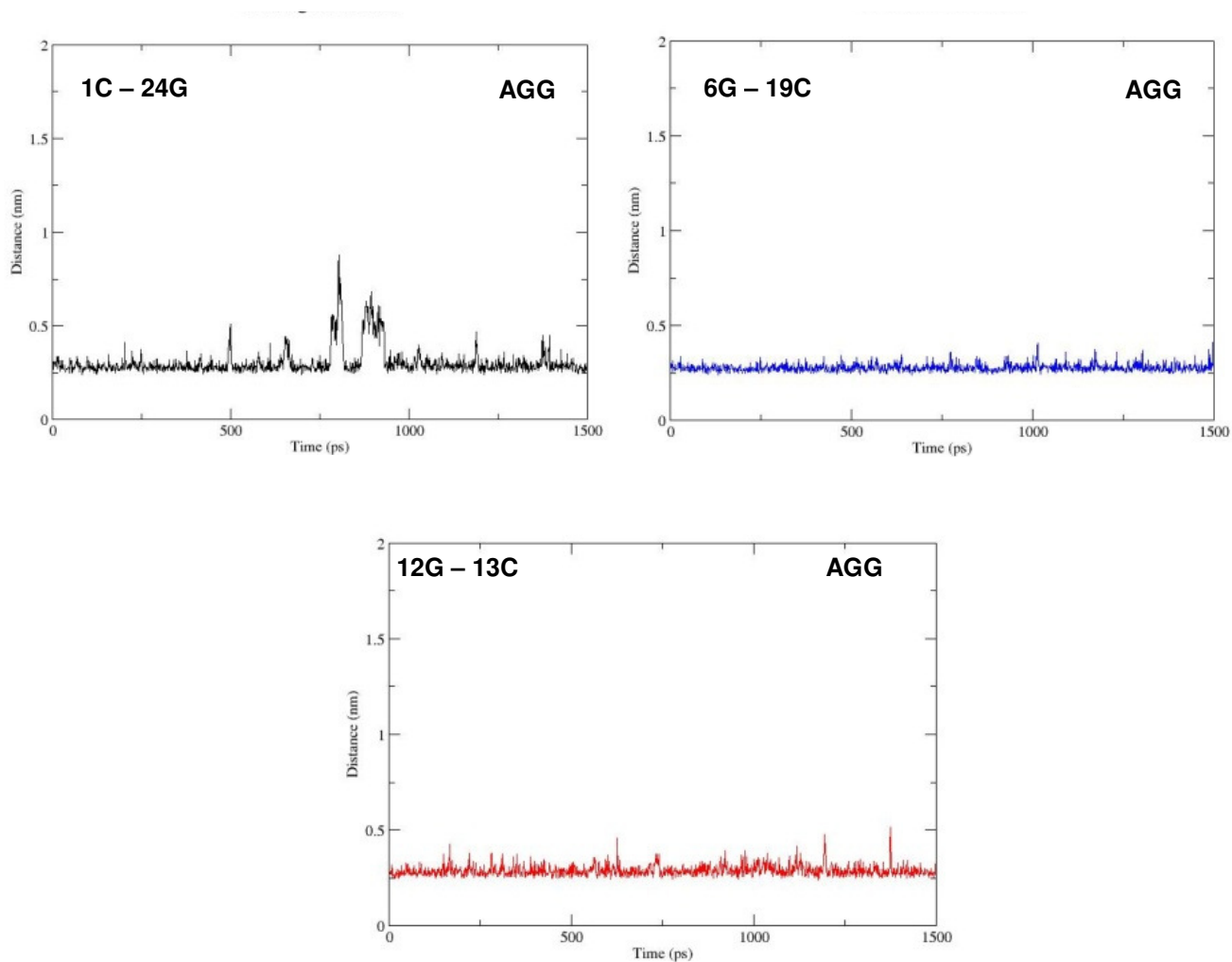




**Figura 25:** Distâncias médias do pares de bases após 1,5 ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATCGAATCCG). Linha preta (1C-24G) e verde (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha vermelha (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo.

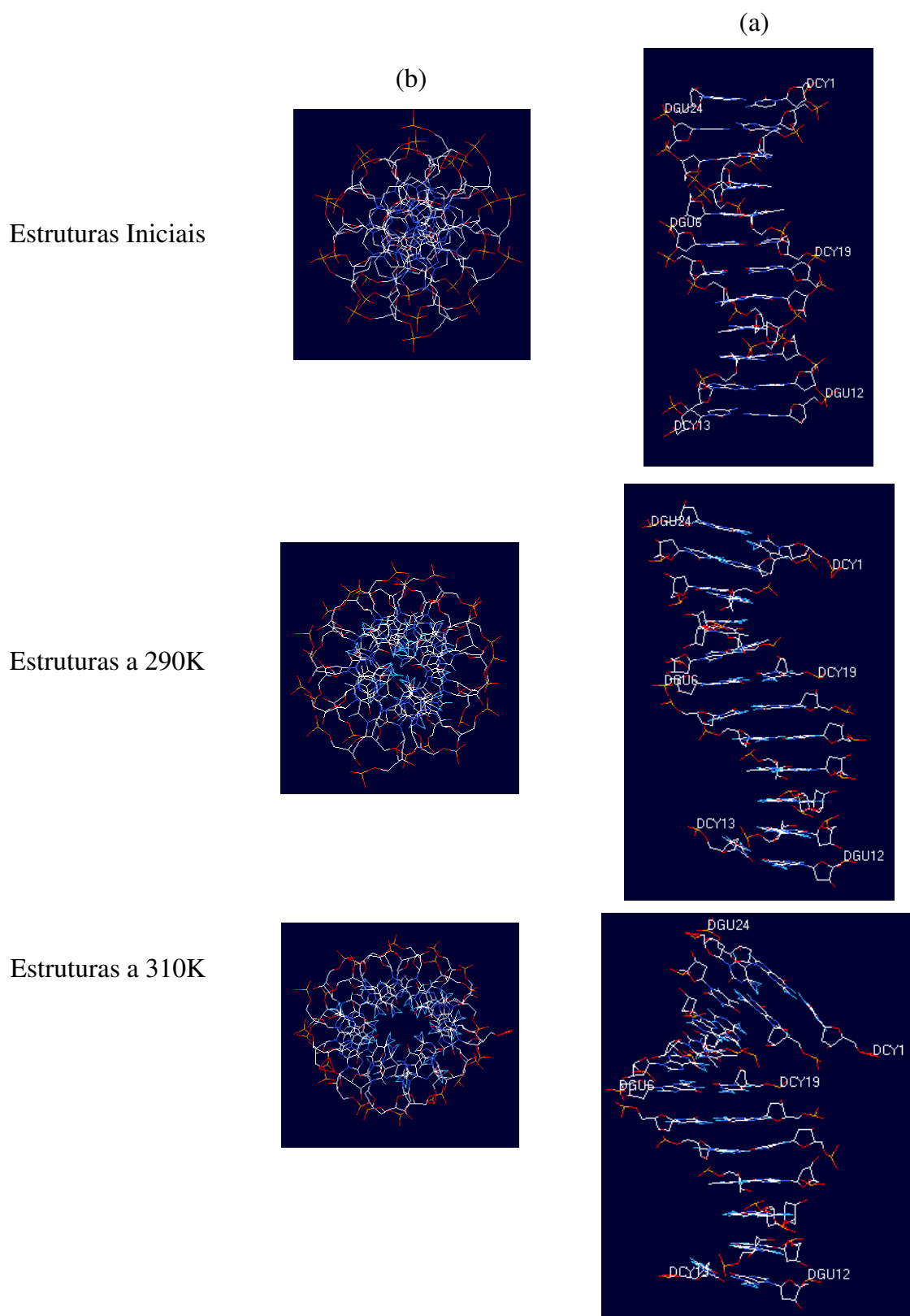


**Figura 26:** Distâncias médias do pares de bases após 1,5ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATAGTATCCG). Linha preta (1C-24G) e vermelha (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha azul (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo.



**Figura 27:** Distâncias médias do pares de bases após 1,5ns de simulação do oligonucleotídeo d(CGATAGGATCCG). Linha preta (1C-24G) e vermelha (12G-13C) correspondem as extremidades do DNA. A linha azul (6G-19C) é o par de base central do oligonucleotídeo.

Devido ao número de análises e oligonucleotídeos simulados, iremos restringir algumas análises a uma das seqüências simuladas. Na figura 27b podemos observar que, após aquecimento, o oligonucleotídeo com a seqüência central AGC mostra uma distorção de sua forma inicial. Também podemos observar na figura 27a uma crescente abertura dos pares de base no eixo-z “visão superior” do oligonucleotídeo, além de notarmos uma inclinação dos pares de base vinculada à curvatura da estrutura com o passar do tempo (Figura 27b).



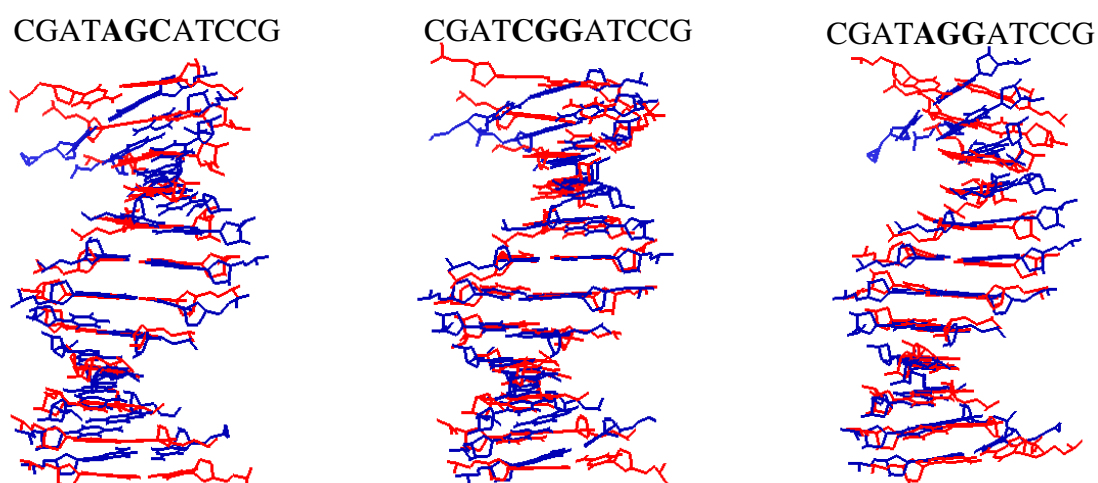
**Figura 28:** Estruturas médias geradas pelo X3DNA e SPDBV do oligonucleotídeo CGATAGCATCCG. Representação da visão superior (do eixo Z) e visão frontal respectivamente.

A tabela 4 mostra alguns parâmetros estruturais do oligonucleotídeo CGATAGCATCCG, restrito somente para o segmento central (AGC). Apesar de notarmos um aumento nos parâmetros *Inclination* e *Roll*, e diminuição do *Slide*, não notamos uma transição local da classificação da estrutura, ou seja, ela se mantém no sítio de interação com a ET743 na forma B-DNA, além de não apresentar variação significativa dos parâmetros *Twist* e *Rise*.

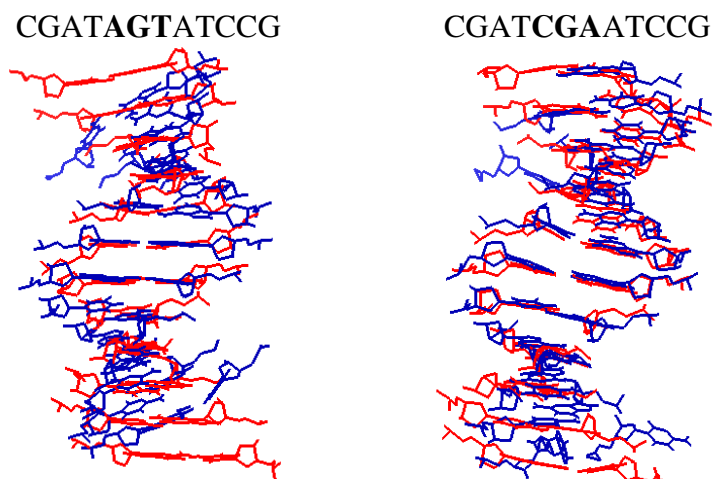
**Tabela 4:** Parâmetros estruturais monitorados no oligonucleotídeo CGATAGCATCCG, do tríade central.

Parâmetros	Inicial	290K	310K
Slide	0,46	-1,36	-1,36
Roll	1,71	4,72	4,12
Rise	3,36	3,57	3,69
Twist	35,78	31,03	31,87
Inclination	2,78	8,85	7,27
Classificação da Estrutura	B-DNA	B-DNA	B-DNA

As demais seqüências de oligonucleotídeos (CGG, AGG, AGT e CGA) simulados se comportaram de modo semelhante, tanto nos parâmetros estruturais, como nos pares de bases centrais. Na figura 29 temos a sobreposição das estruturas iniciais com as finais de todos os oligonucleotídeos, podemos constatar que os pares de bases centrais têm pouca alteração ao término da simulação, tanto da posição inicial, como da sua classificação da estrutura (Tabela 4).



**Figura 29:** Sobreposição da estrutura inicial e final dos oligonucleotídeos de tríades centrais (AGC, CGG e AGG). Estrutura inicial em vermelho e estrutura final em azul.



**Figura 29:** Continuação. Sobreposição da estrutura inicial e final dos oligonucleotídeos de tríades centrais (AGT e CGA). Estrutura inicial em vermelho e estrutura final em azul.

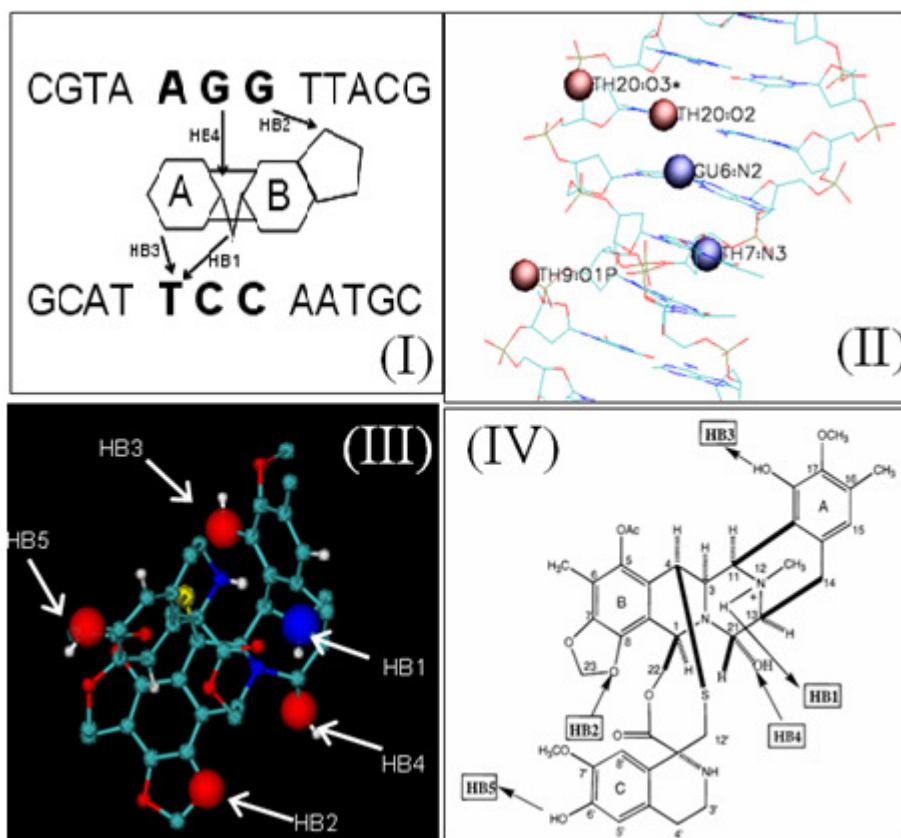
Apesar do aumento da curvatura global da estrutura e mobilidade dos pares de bases das extremidades dos oligonucleotídeos, os tríades centrais mantiveram-se estáveis (local onde ocorre a interação com o fármaco). O campo de força escolhido GROMOS, na sua versão 53A6 mostrou-se estável para as dinâmicas com oligonucleotídeos. Além disso, a forma do DNA no local de interação é a forma B-DNA.

### 5.3. RESULTADOS PARA OS COMPLEXOS NÃO-COVALENTES NA APROXIMAÇÃO

As simulações dos complexos não covalentes dos oligonucleotídeos (CGG, AGC, AGG, AGT, CGA) com a ET743 foram realizadas, após a aproximação da ET743 aos sítios de interação com os oligonucleotídeos “doadores e aceptores” (Tabela 2) e (Figura 30), baseados em dados da literatura<sup>8</sup>, através do programa *Swiss PDB Viewer*.

Através de diversas simulações dinâmicas curtas, de 5 a 10ps, com *pullings* ajustaram-se as distâncias dos sítios de interação ET743-DNA. Cada um dos sistemas foi tratado peculiarmente, ou seja, com número diferente de tentativas para aproximação do fármaco do sitio de interação, isso se deve ao fato de que cada seqüência se comportou de maneira diferente em relação à ET743.

Durante as simulações de dinâmica molecular, realizamos o monitoramento das distâncias entre as ligações de hidrogênio (HBs) nos sítios de interação da ET743 com DNA descritos pela literatura<sup>8</sup> (Tabela 2) e entre as bases que competem esses sítios, além de observar a formação de novas HBs alternativas.



**Figura 30:** Sítios de interação entre a ET743 e os oligonucleotídeos. (I) esquema da ligação ET743 e oligonucleotídeo (AGG), (II) oligonucleotídeo (AGT) e sítios de interação com a ET743. (III) e (IV) ET743 e seus sítios de interação<sup>8,45</sup>.

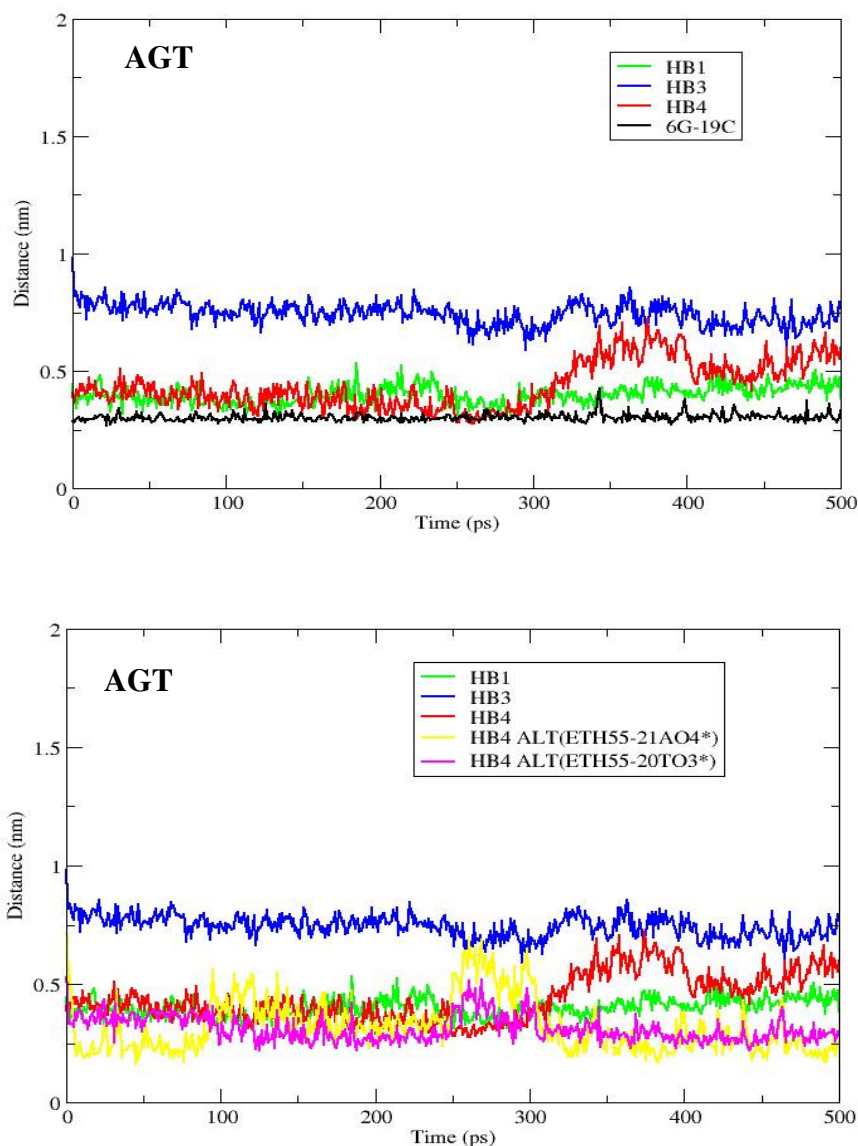
Em relação ao oligonucleotídeo (CGATAGTATCCG) de baixa interação com a ET743, não há ocorrência da HB2 (devido que na posição Y-3' temos uma Adenina-Figura 16), já a HB1 e HB4 mostram-se presentes dentro de uma faixa aceitável para ligações de hidrogênio na maior parte do tempo da dinâmica, porém o HB3 está numa distância fora da faixa de interação. Além de evidenciarmos HBs alternativas em relação ao HB4 descrito na literatura, estes HBs alternativos se mostram mais estáveis que os originais, como mostra a figura 31 e a tabela 2.

No oligonucleotídeo (CGATAGGATCCG) de média interação com a ET743, evidenciamos que nenhum dos HBs descritos pela literatura (HB1, HB2, HB3 e HB4) se formam, mas evidenciamos a formação de HBs alternativos (do HB3 e HB4) mais estáveis que os descritos pela literatura, ambos podem ser vistos na figura 33 e na tabela 5 a suas distâncias médias. Um dado interessante é que nesta seqüência também observamos a migração da ET743 para a forma 5'-GGA (que tem maior reatividade

que 5'-AGG<sup>31</sup>), ou seja, a ET743 tende a interagir com a guanina 7 no lugar da guanina 6.

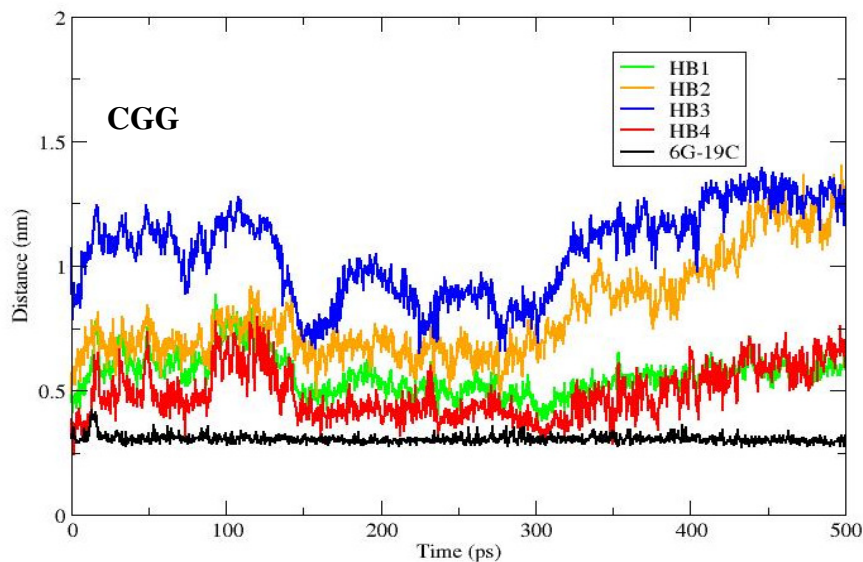
Em nenhum dos complexos não covalentes modelados ocorreu formação do HB5, que provavelmente somente será evidenciado na forma covalente do complexo ET-DNA

Na seqüência mais favorecida (CGATCGGATCCG) evidencia-se a ocorrência da HB1 e HB4 apenas por alguns instantes de simulação, mas não observamos a formação das HBs alternativas, como mostrado na figura 32.

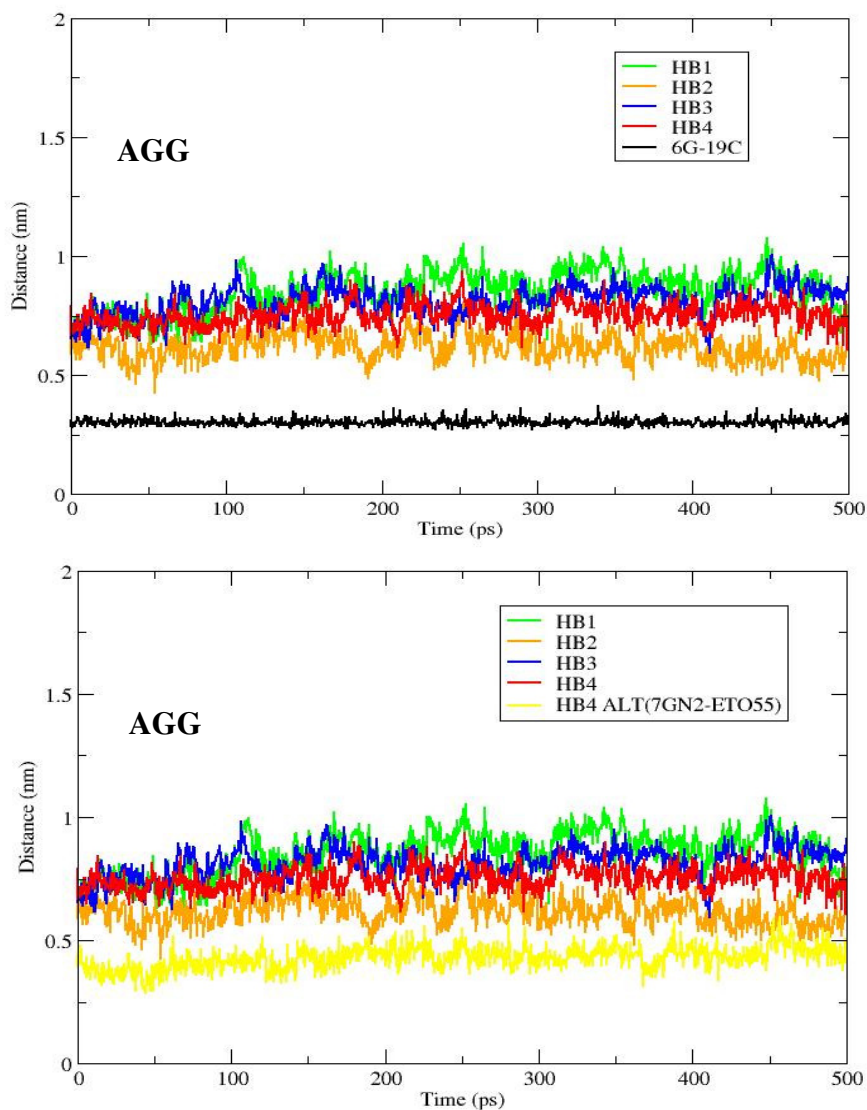


**Figura 31:** Distâncias das ligações de hidrogênio (HBs) entre os átomos doadores e aceptores da seqüência AGT com a ET743.

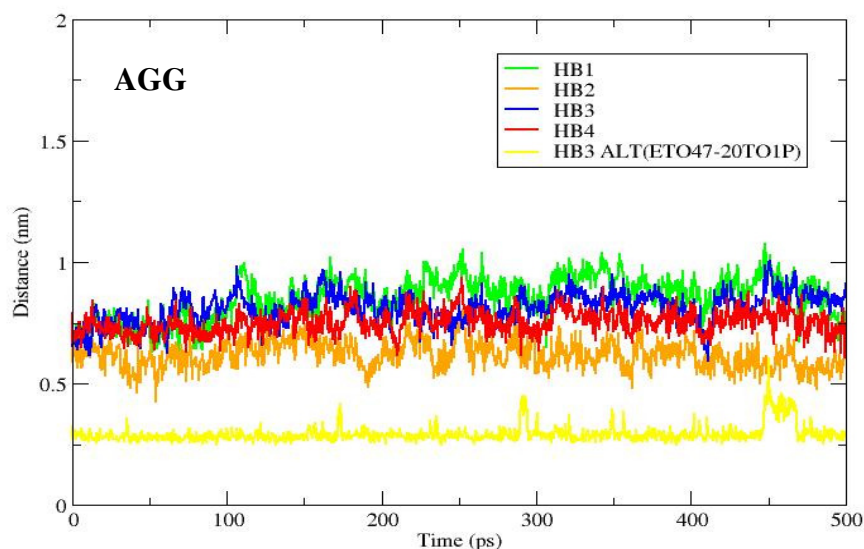




**Figura 32:** Distâncias das ligações de hidrogênio (HBs) entre os átomos doadores e aceptores da seqüência CGG com a ET743.



**Figura 33:** Distâncias das ligações de hidrogênio (HBs) entre os átomos doadores e aceptores da seqüência AGG com a ET743.



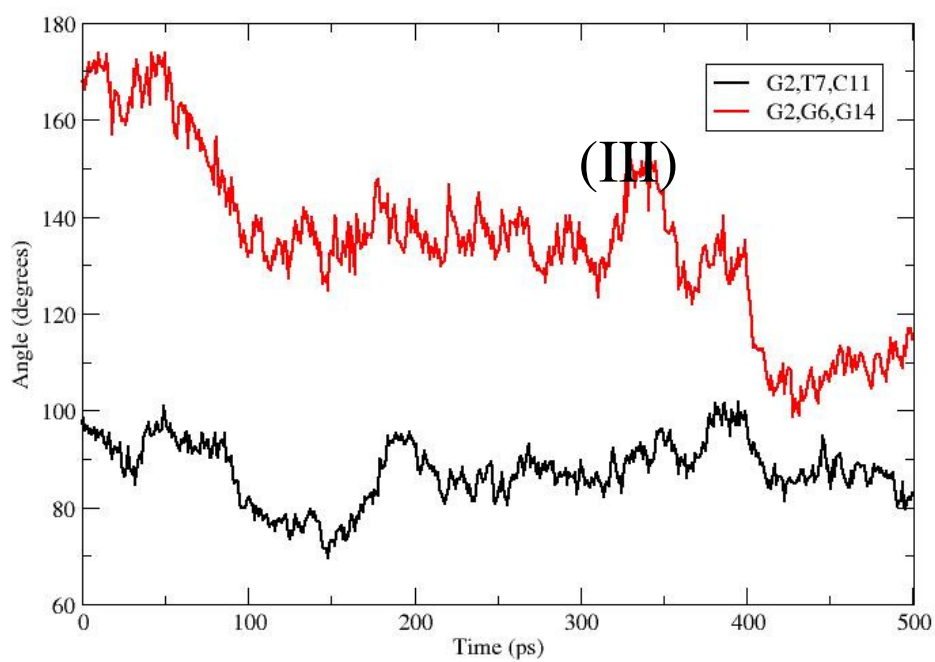
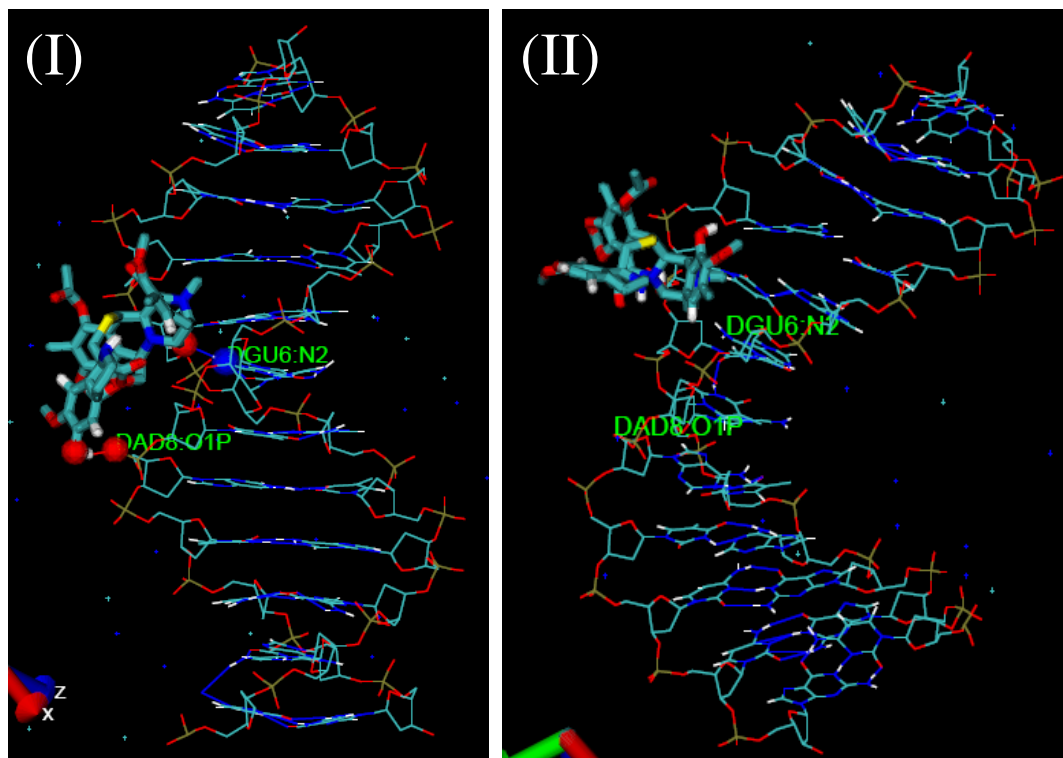
**Figura 33:** Continuação. Distâncias das ligações de hidrogênio (HBs) entre os átomos doadores e aceptores da seqüência AGG com a ET743.

**Tabela 5:** Doadores e aceptores descritos pela literatura com sua distância média de ligação, comparados com as distâncias das ligações de hidrogênio alternativas dos complexos não-covalentes entre ET743 e oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeos	HBs (literatura)	HBs (alternativo)
AGG (HB3)	(ETO47-20TO3') 0,789nm	(ETO47-20TO1P) 0,283nm
AGG (HB4)	(6GN2-ETO55) 0,722nm	(7GN2-ETO55) 0,309nm
AGT (HB4)	(6GN2-ETO55) 0,438nm	(ETH55-20TO3') 0,310nm
AGT (HB4)	(6GN2-ETO55) 0,438nm	(ETH55-21AO2) 0,320nm

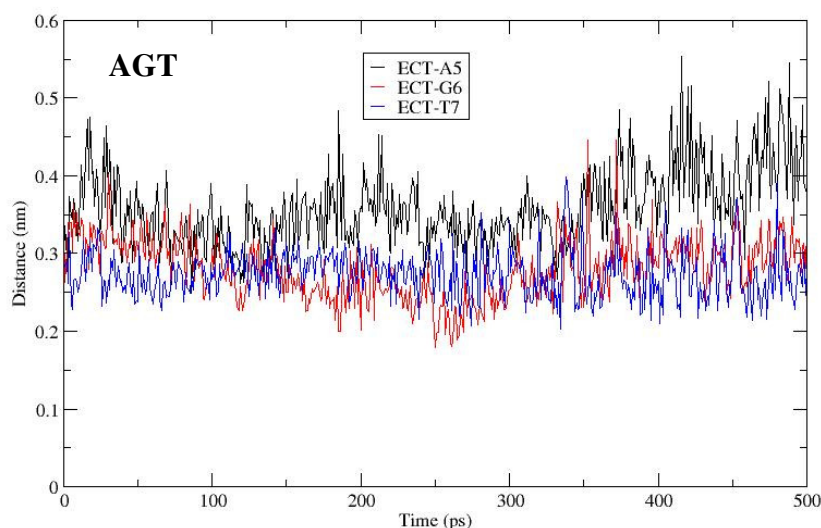
Todas as estruturas apresentam uma diminuição no ângulo do sulco maior dos oligonucleotídeos (por isso só apresentaremos o resultado para uma das seqüências), resultante da interação da ET743 com o menor sulco (Figura 34 (I) e (II)), como observado na literatura.

Na figura 34III ainda podemos notar através dos ângulos entre (2G–6G–14G) e (2G– 7G–11C) a diminuição do ângulo do oligonucleotídeo ao longo da simulação na aproximação do fármaco no sítio de interação. Comprovando assim uma das observações da literatura resultante da aproximação de ET743 da N2 da guanina central.



**Figura 34:** Dobramento da estrutura do DNA para a maior cavidade. (I) Oligonucleotídeo 5'-AGT inicial. (II) oligonucleotídeo 5'-AGT estado final. (III) gráfico dos ângulos monitorados durante a simulação.

Na aproximação do fármaco dos sítios de interação com os oligonucleotídeos através dos pullings, fez-se necessário, o acompanhamento da evolução da distância de aproximação ao longo da dinâmica, bem como a estabilidade de alguns pares de base dos oligonucleotídeos. Como esta análise foi utilizada somente para o acompanhamento da aproximação iremos apresentar para um dos oligonucleotídeos, como é mostrado na figura 35.



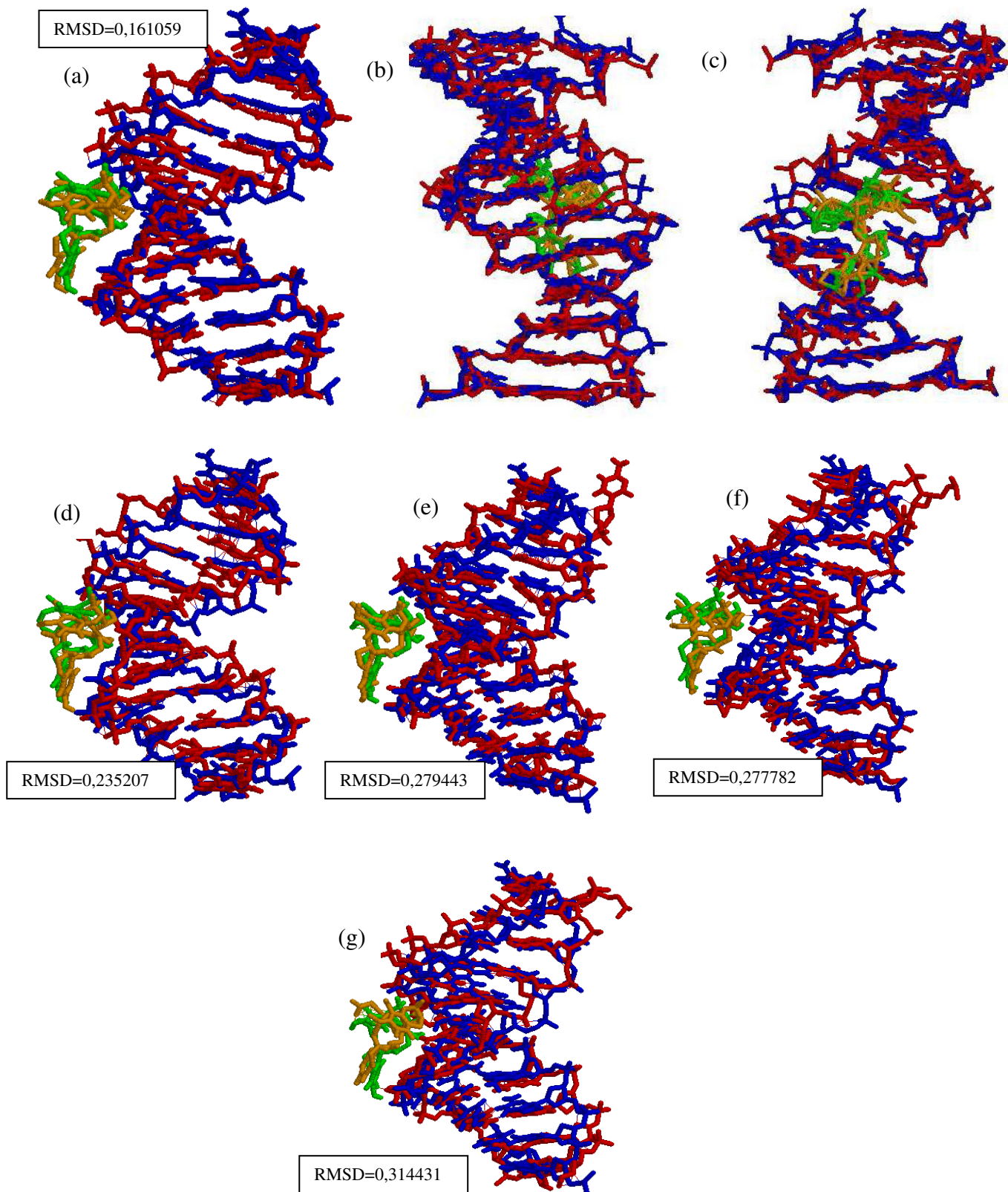
**Figura 35:** Monitoramento da mínima distância entre a ET743 e regiões do oligonucleotídeo AGT após 500 ps de simulação.

Pela Figura 35, podemos observar que no decorrer de 500 ps a distância entre a ET743 (representada no gráfico como ECT) permanece muito próxima da guanina 6 (G6) que é justamente onde deve ocorrer a alquilação.

Como forma de quantificar as possíveis mudanças estruturais no decorrer da “dinâmica forçada” de aproximação da ET743 nos sítios de interação com os oligonucleotídeos, realizou-se a sobreposição das estruturas (*fits*) no decorrer da dinâmica de aproximação com a estrutura inicial de partida. Os resultados para estas sobreposições serão comentadas para duas seqüências de oligonucleotídeos.

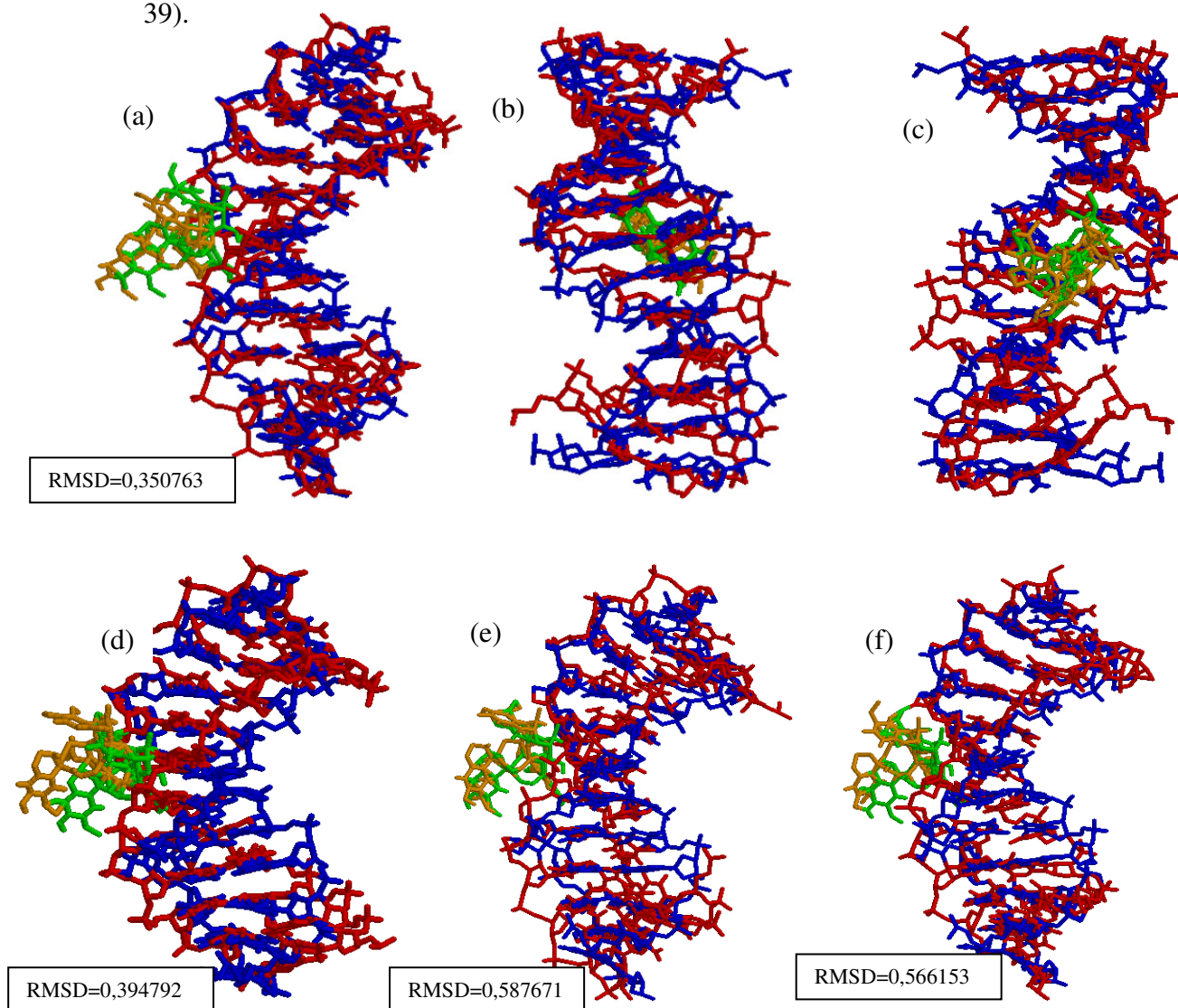
Na figura 36 podemos observar a crescente aproximação e permanência da ET743 na região central do oligonucleotídeo AGC (de alta reatividade com o fármaco), ou seja, no sulco menor, mostrando assim a eficácia das “dinâmicas forçadas”, além de observarmos a flutuação das extremidades dos oligonucleotídeos. Ao analisarmos o RMSD das sobreposições das estruturas, notamos o aumento do mesmo, devido a aproximação da ET743 do sítio de interação, onde o mesmo perturba a estrutura do oligonucleotídeo.



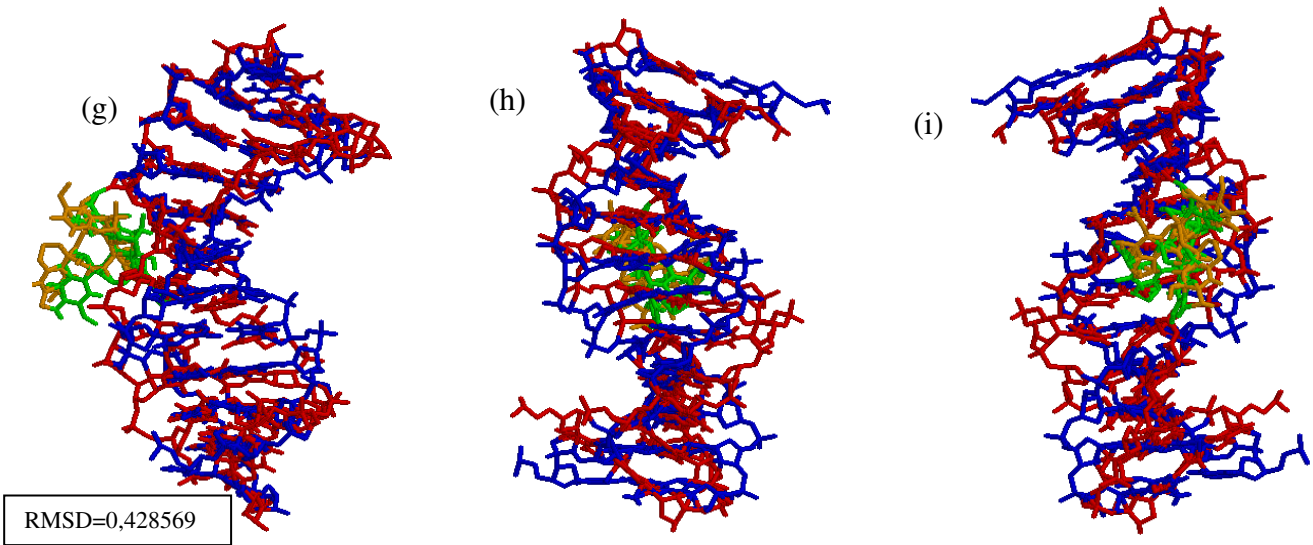


**Figura 36:** Sobreposição dos complexos não covalente ET-AGC na **aproximação** do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g) visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGC inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC final), Laranja (ET final).

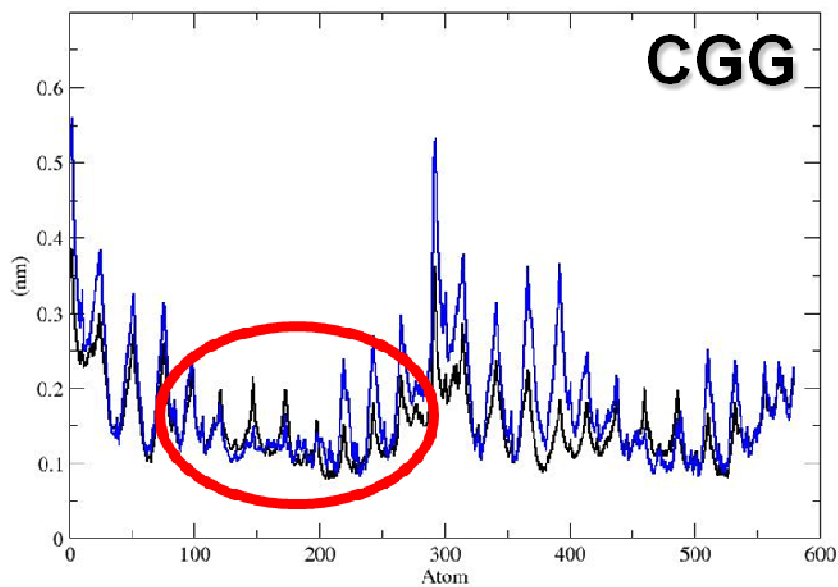
Na figura 37 também podemos observar a tentativa de aproximação da ET743 na região central do oligonucleotídeo CGG (de alta reatividade com o fármaco), mas percebemos que a estrutura da ET743 não se aproxima muito do sítio de interação. Além de mostrar o RMSD das sobreposições das estruturas com maior variação, mostrando que aproximação da ET743 do oligonucleotídeo perturba fortemente a sua estrutura. Porém, com a aproximação forçada da ET743 aos sítios de interação nota-se a diminuição da flutuação na região dos tríades centrais (CGG) das estruturas como mostrado na figura 38. Particularmente, nas seqüências CGG e CGA, há uma diminuição da flutuação global da estrutura com a aproximação da ET743 (Figura 38 e 39).



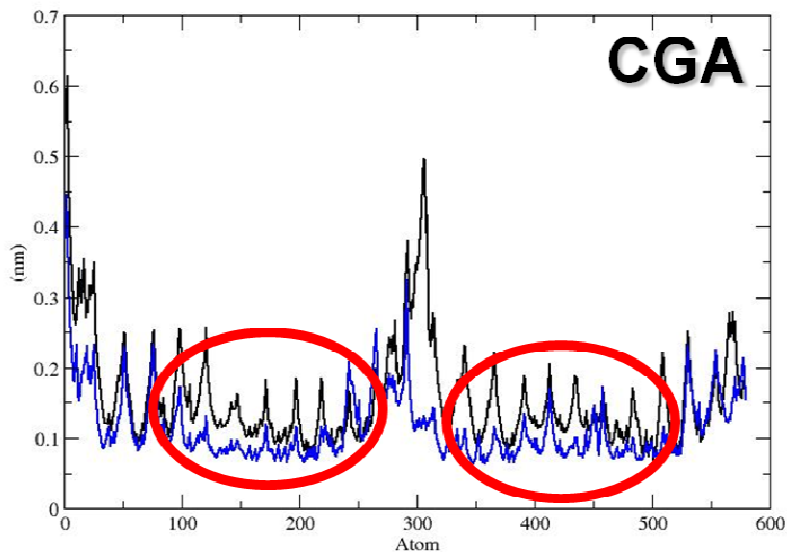
**Figura 37:** Sobreposição dos complexos não covalente ET-CGG na **aproximação** do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g), visão lateral. (b) e (h) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (CGG inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (CGG final), Laranja (ET final).



**Figura 37:** Continuação. Sobreposição dos complexos não covalente ET-CGG na **aproximação** do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g), visão lateral. (b) e (h) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (CGG inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (CGG final), Laranja (ET final).



**Figura 38:** RMSF de todos os átomos do DNA, perante aproximação da ET743. Preto (DNA inicial), Azul (após aproximação da ET743). Circulo em vermelho indica menos flutuação da estrutura.



**Figura 39:** RMSF de todos os átomos do DNA, perante aproximação da ET743. Preto (DNA inicial), Azul (após aproximação da ET743). Circulo em vermelho indica menos flutuação da estrutura.

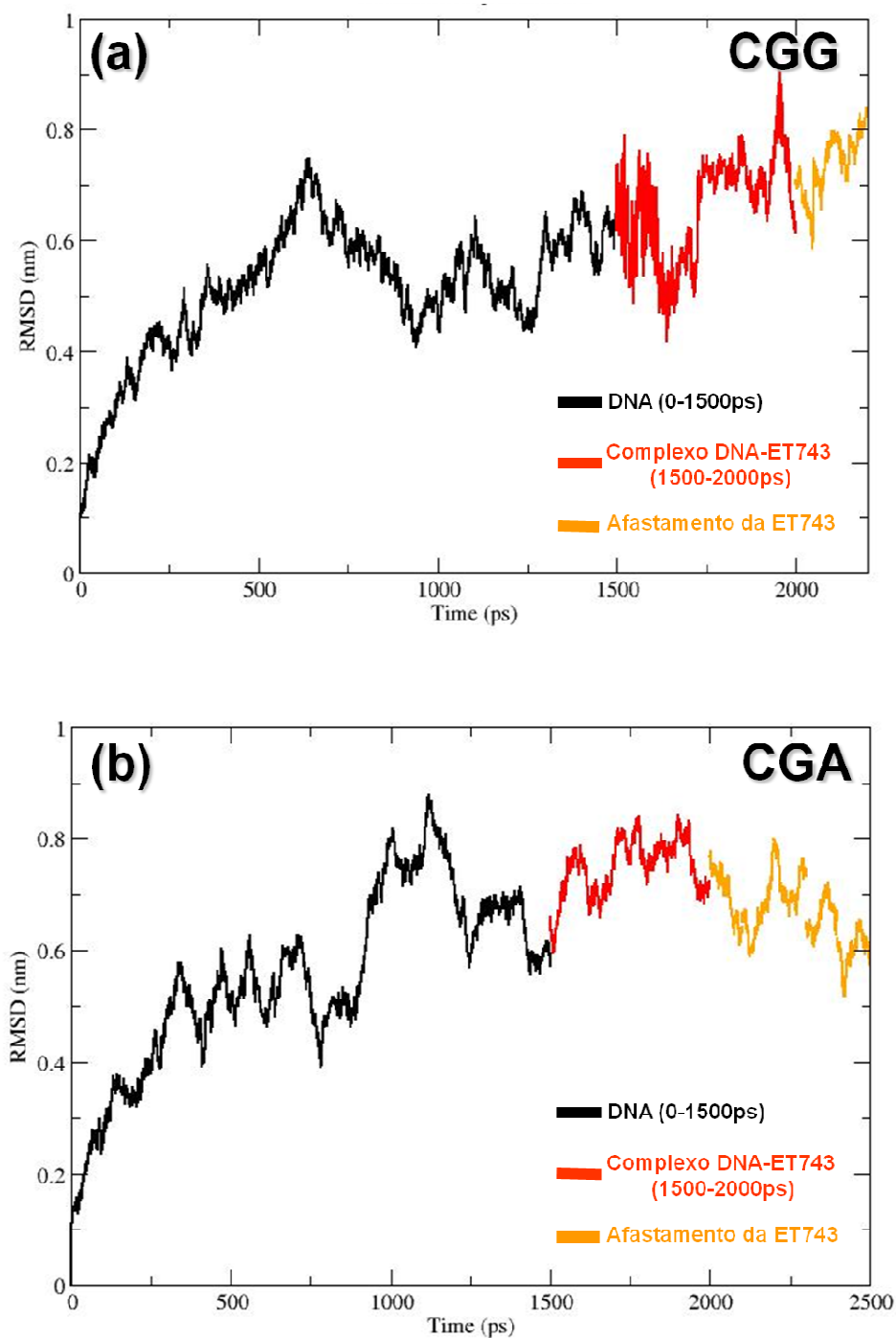
#### 5.4. RESULTADOS PARA OS COMPLEXOS NÃO-COVALENTES NO AFASTAMENTO

As simulações dos complexos não covalentes dos oligonucleotídeos (CGG, AGC, AGG, AGT, CGA) visando o afastamento da ET743 foram realizadas, após a aproximação da ET743 aos sítios de interação. Os complexos covalentes mais estáveis da etapa de aproximação da ET743 foram usados para iniciar as dinâmicas de afastamento.

Para estes complexos foi realizada análise termodinâmica calculando-se as energias de interação em complexos não-covalentes e, após, afastando gradualmente os mesmos em relação ao DNA e monitorando-se os diversos termos energéticos até a convergência, além perturbações estruturais dos oligonucleotídios com o afastamento do fármaco. Bem como as observações quantitativas da mudança estrutural pela sobreposição dos complexos.

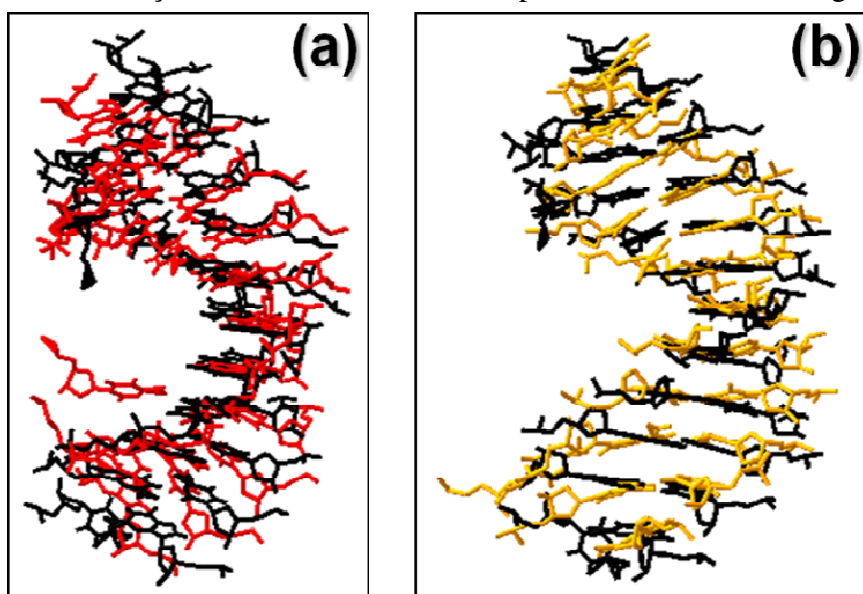


Com o *pulling* de afastamento da ET743, podemos analisar o quanto a estrutura do oligonucleotídeo é alterada pela presença do fármaco. Como nos mostra a figura 40.



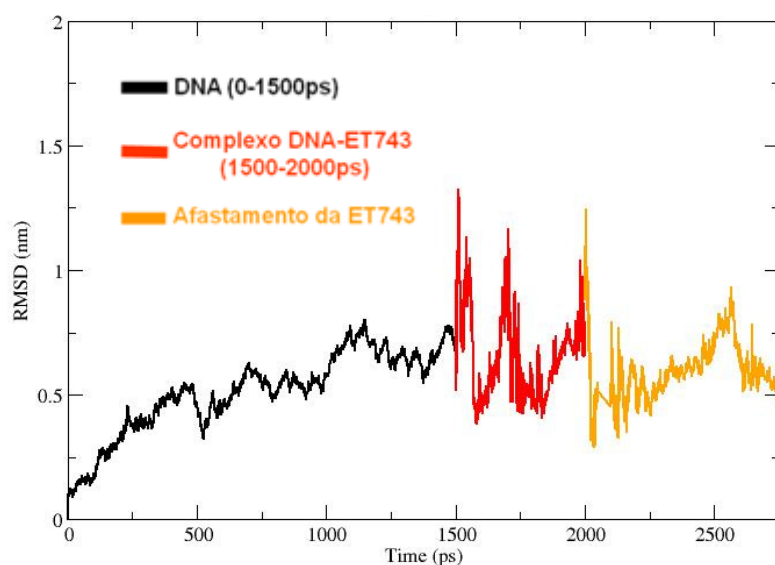
**Figura 40:** RMSD de todos os átomos do DNA, Complexo Não-Covalente, aproximação e afastamento da ET743 após 2,5 ns de simulação. (a) RMSD de todos os átomos da seqüência CGG. (b) RMSD de todos os átomos da seqüência CGA.

Pela Figura 40a observamos que a aproximação da ET743 em relação ao DNA (CGG) (seqüência com alta interação) apresenta uma flutuação leve, que podemos considerar dentro da faixa de variação estrutural sofrida pelo DNA a 310K, porém com o afastamento do fármaco não observamos o retorno do oligonucleotídeo a sua estrutural isolada. Isso pode ser confirmado pela figura 48, onde temos o *fit* do complexo não covalente inicial e final (afastamento). Já na figura 39b podemos notar que com o afastamento da ET743 o DNA (CGA) (seqüência com baixa interação) retorna a sua conformação estrutural isolada, como pode ser observado na figura 41.

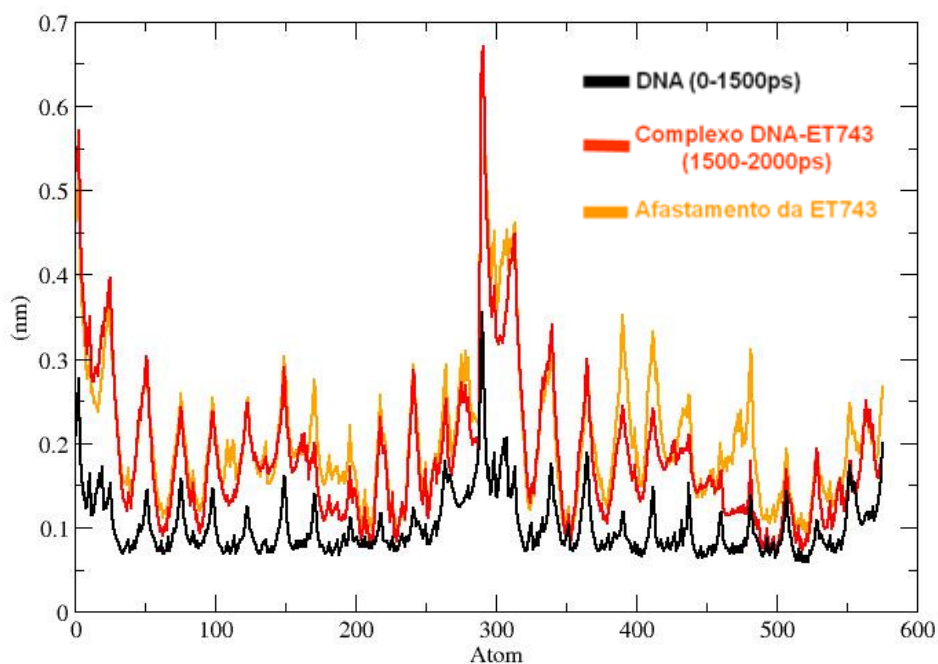


**Figura 41:** Sobreposição das estruturas iniciais e finais da seqüência CGA (a) inicial – aproximação; (b) inicial – afastamento.

Para o oligonucleotídeo AGT (Figura 42 e 43) (seqüência de baixa interação) notamos que tanto na aproximação como no afastamento da ET743, ocorre uma perturbação estrutural moderada do oligonucleotídeo, além da observação do *fit* (pouco diferença nas sobreposições) e RMSD (variações pequenas) na figura 51.

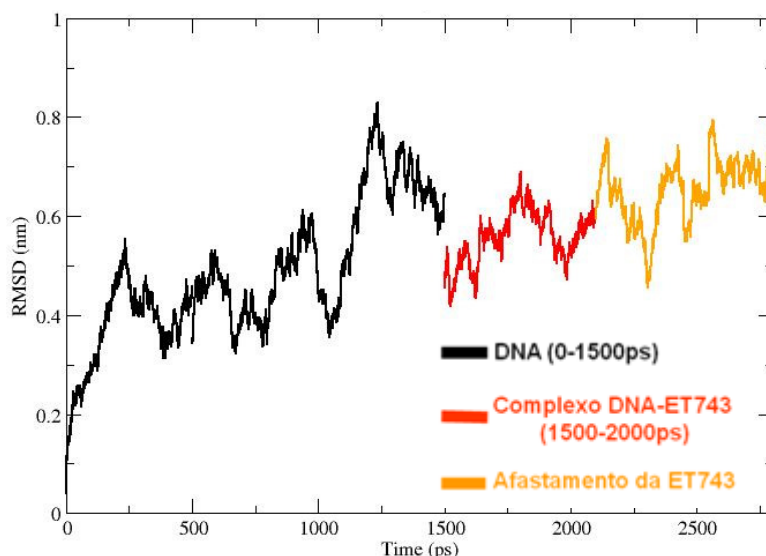


**Figura 42:** RMSD de todos os átomos da seqüência AGT, Complexo Não-Covalente, aproximação e afastamento da ET743 após 2,75 ns de simulação.

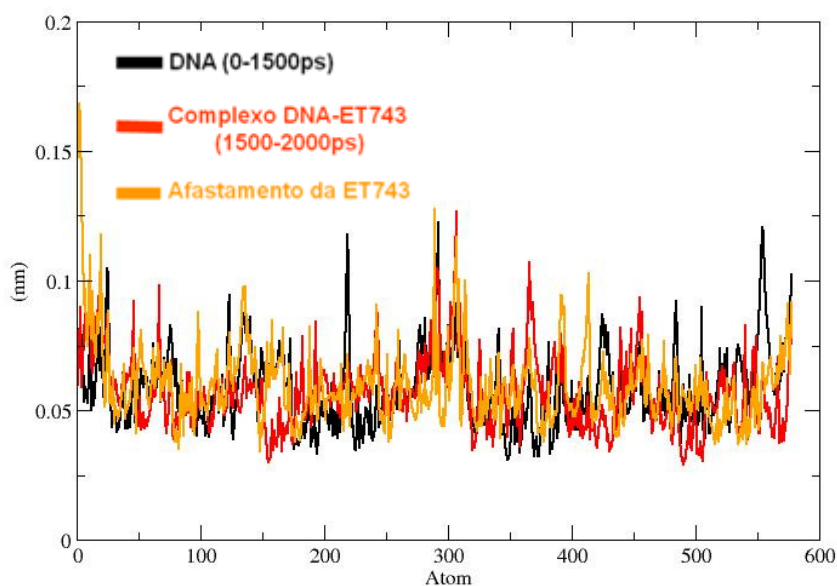


**Figura 43:** RMSF de todos os átomos da seqüência AGT, perante aproximação da ET743. Preto (DNA inicial), vermelho (após aproximação da ET743). Amarelo (após o afastamento da ET743).

Já para a seqüência AGC (seqüência com alta interação) a aproximação, seguido do afastamento do fármaco do sítio de interação (Figura 44 e 45) observamos que a estrutura do DNA não sofre alteração estrutural significativa, embora o RMSD das sobreposições das estruturas (Figura 49) aumentem no decorrer do afastamento.

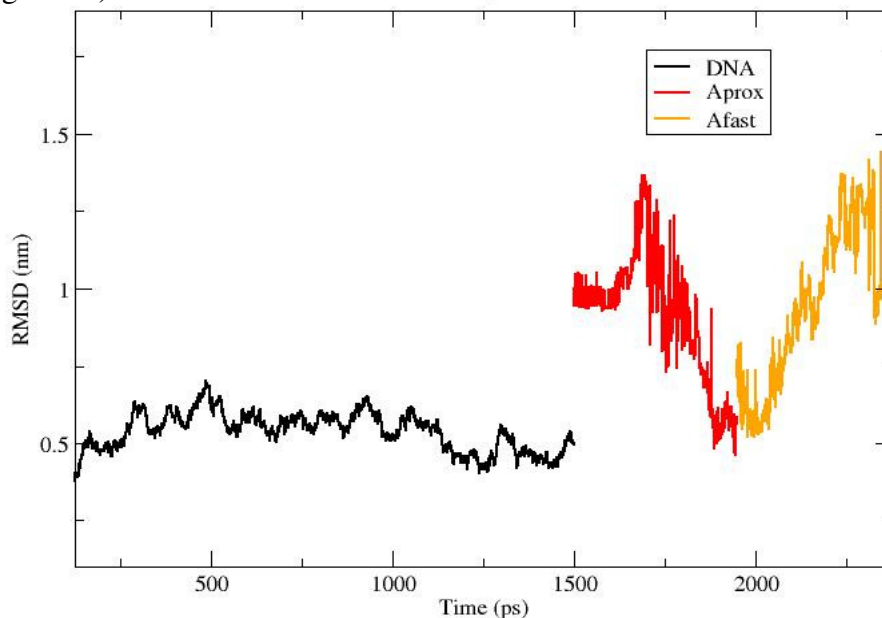


**Figura 44:** RMSD de todos os átomos da seqüência AGC, Complexo Não-Covalente, aproximação e afastamento da ET743.

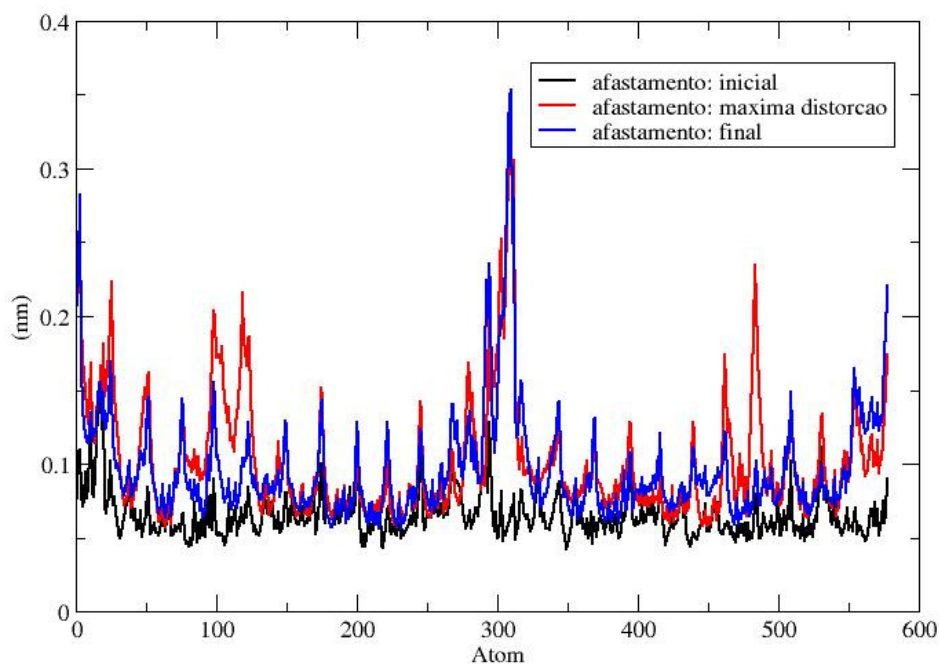


**Figura 45:** RMSF de todos os átomos da seqüência AGC, perante aproximação da ET743 após 600 ps de simulação. Preto (DNA inicial), vermelho (após aproximação da ET743). Amarelo (após o afastamento da ET743).

A sobreposição das estruturas (*fit*) para a seqüência AGG (seqüência de média interação) (Figura 50) e a análise do RMSD indica que no decorrer do afastamento da ET743 a estrutura do DNA sofre alterações, mas no final retorna a um estado equilibrado. O que também podemos notar pelos resultados do RMSF (Figura 47) e RMSD (Figura 46).

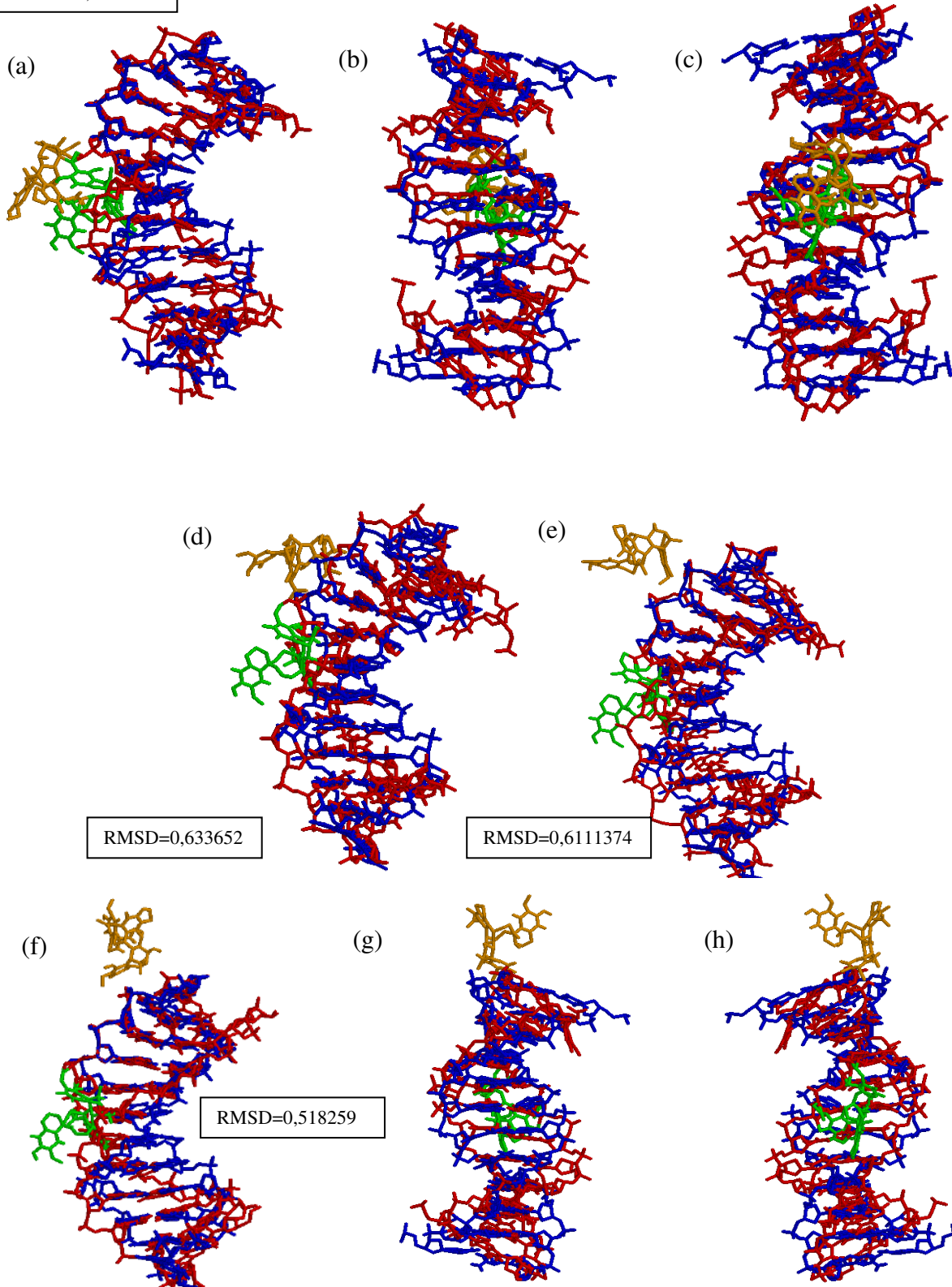


**Figura 46:** RMSD de todos os átomos da seqüência AGG, Complexo Não-Covalente e afastamento da ET743 após 1,5 ns de simulação.



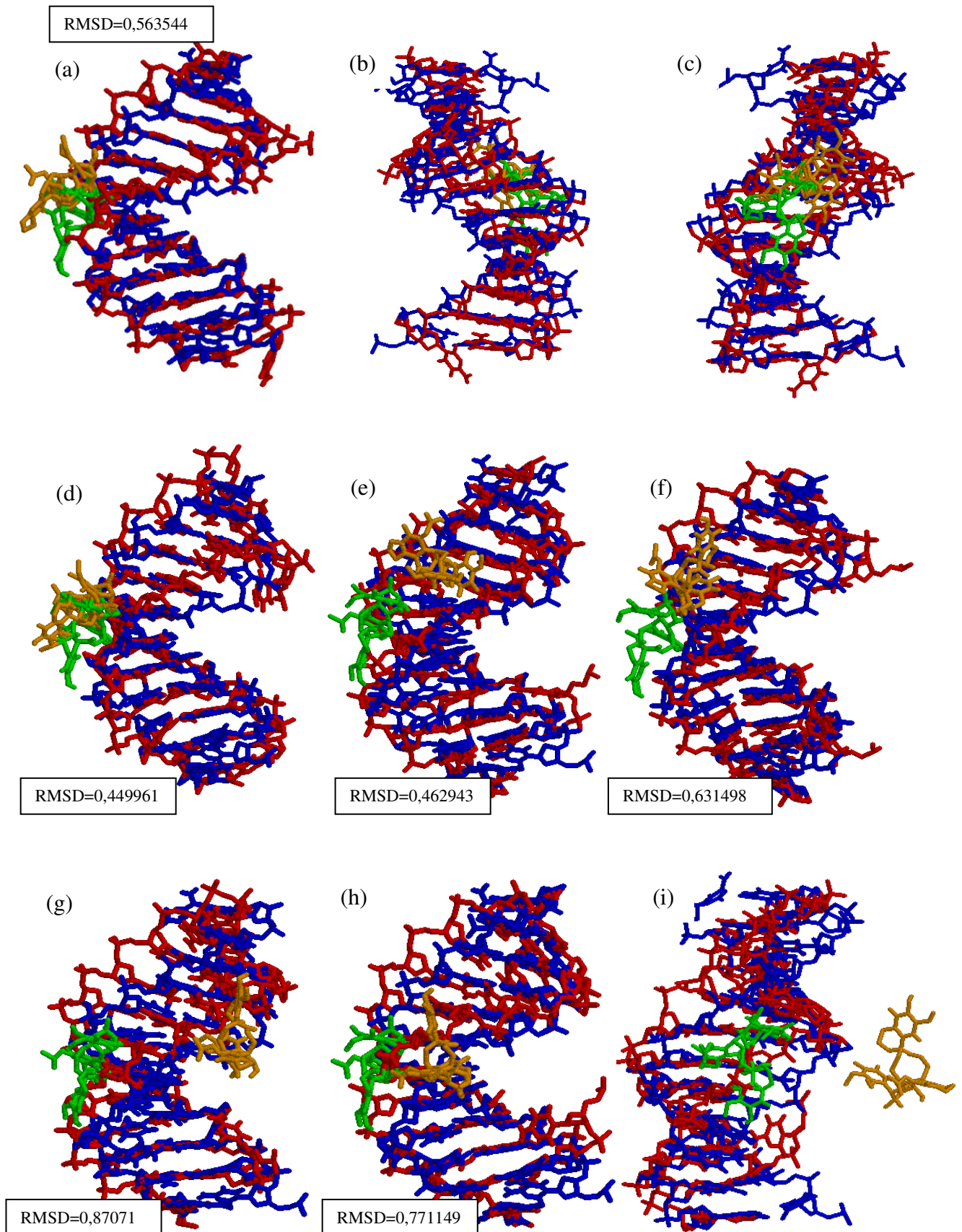
**Figura 47:** RMSF de todos os átomos da seqüência AGG, perante aproximação da ET743. Preto (DNA inicial), vermelho (maior RMSD da estrutura). Azul (afastamento final).

RMSD=0,472071

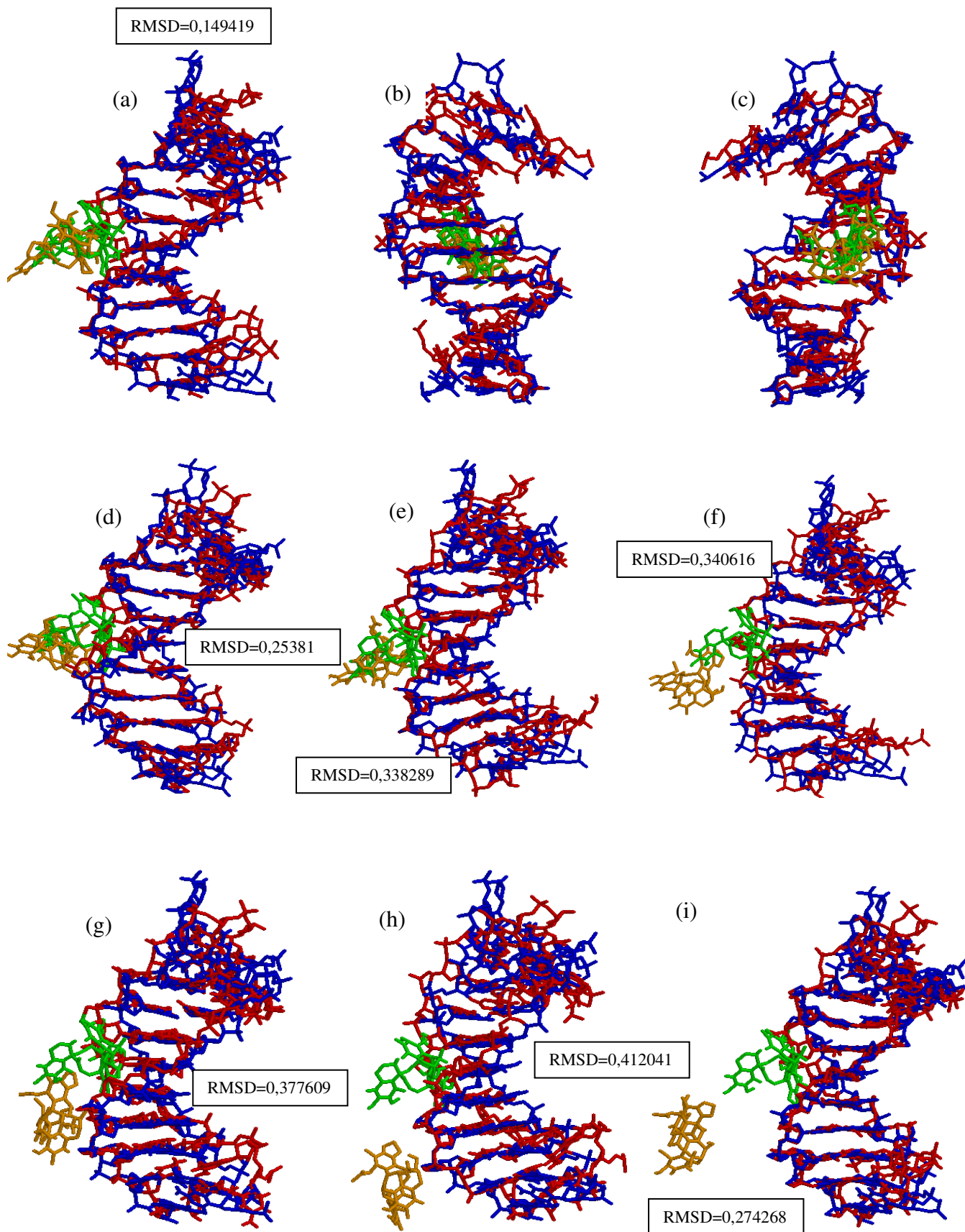


**Figura 48:** Sobreposição dos complexos não covalente ET-CGG no **afastamento** do fármaco. (a), (d), (e), (f), visão lateral. (b) e (g) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (h) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGC inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC final), Laranja (ET final).



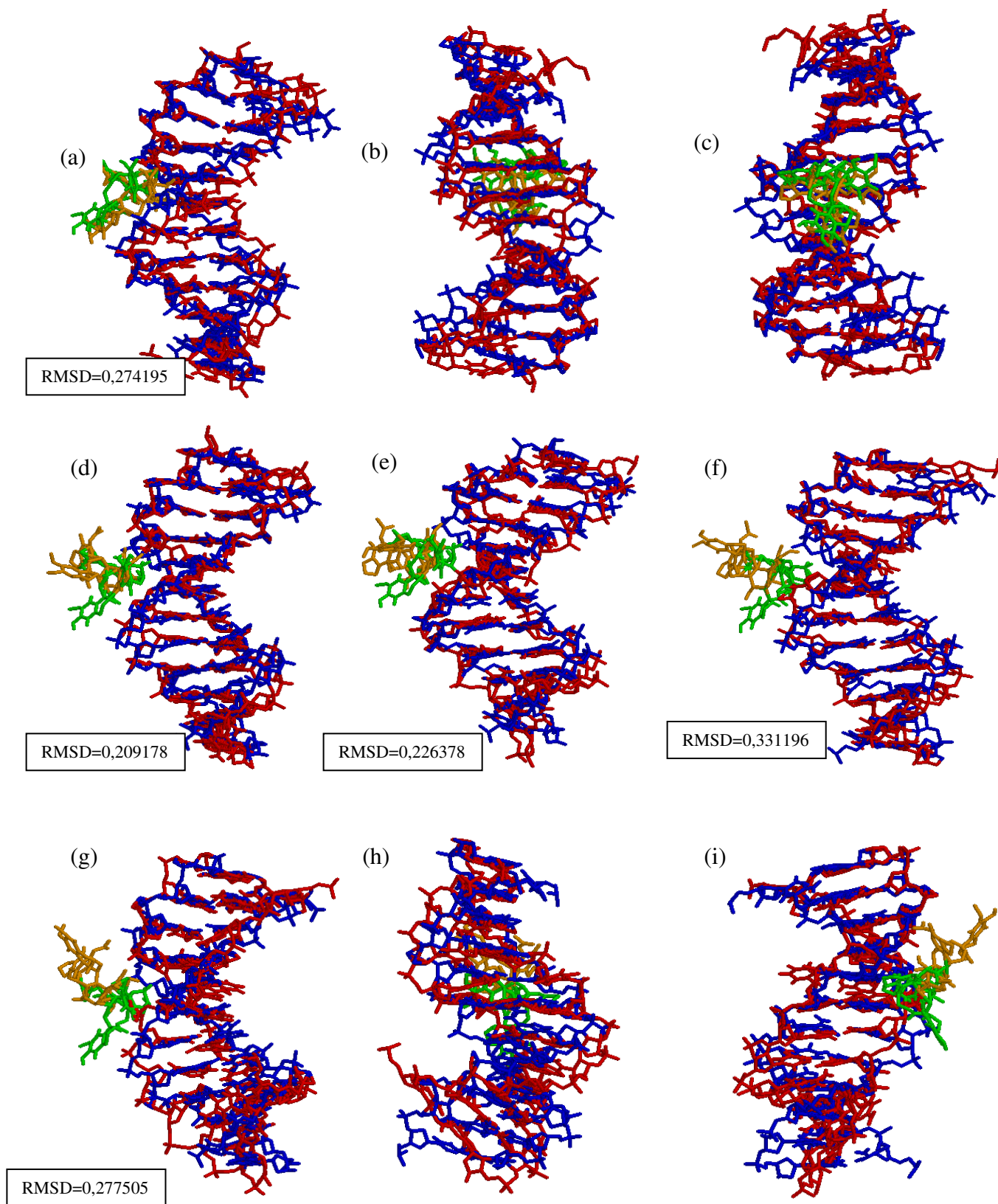


**Figura 49:** Sobreposição dos complexos não covalente ET-AGC no **afastamento** do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g), (h), visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGC inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC final), Laranja (ET final).



**Figura 50:** Sobreposição dos complexos não covalente ET-AGG no **afastamento** do fármaco. (a), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGG inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGG final), Laranja (ET final).





**Figura 51:** Sobreposição dos complexos não covalente ET-AGT no **afastamento** do fármaco. (a), (d), (e), (f) e (g) visão lateral. (b) e (h) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGT inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGT final), Laranja (ET final).

A partir do afastamento do fármaco do seu sítio ativo, queremos determinar a energia de interação. O monitorando os diversos termos energéticos até a convergência, ou seja, até a interação entre a ET-DNA chegar a zero, foi método usado para o cálculo. Nas tabelas abaixo, estão listados os termos energéticos monitorados para algumas seqüências. A energia total ( $\Delta H$ ) é obtida com a soma dos seguintes termos DNA-DNA; DNA-ET; DNA-SOL-ÍON; ET-ET, ET-SOL-ÍON.

Constatamos que o valor entálpico foi positivo para a formação dos complexos não covalentes, caracterizando um processo endotérmico, por exemplo, a seqüência AGC de alta interação ( $\Delta H = 196,96 \text{ kJmol}^{-1}$ ) como consta na tabela 6, para a seqüência CGG de alta interação ( $\Delta H = 81,06 \text{ kJmol}^{-1}$ ) como consta na tabela 7 e a seqüência AGG de moderada interação ( $\Delta H = 136,00 \text{ kJmol}^{-1}$ ) como consta na tabela 8.

A seqüência CGG de alta reatividade interage de modo energeticamente menos desfavorável.

**Tabela 6:** Energias calculadas com o afastamento do fármaco de seu sítio de interação da seqüência AGC.

	<b>AGC</b> (+próx)	<b>AGC</b> (+afast)
DNA-DNA	-4781,17	-4780,09
DNA-ET	-185,79	-0,240
DNA-SOL-ÍON	-7006,37	-7243,00
ET-ET	2031,82	2044,24
ET-SOL-ÍON	-436,32	-595,70
SOL-SOL	-350270,00	-349748,70
SOL-ÍON	-374964,00	-374985,00
HTotal	-10377,80	-10574,79
<b>Delta H</b>	<b>196,96 kJ.mol<sup>-1</sup></b>	

**Tabela 7:** Energias calculadas com o afastamento do fármaco de seu sítio de interação da seqüência CGG.

	<b>CGG</b> (+próx)	<b>CGG</b> (+afast)
DNA-DNA	-5676,96	5649,04
DNA-ET	-124,37	0,78
DNA-SOL-ÍON	-6351,93	6478,48
ET-ET	2112,03	2078,97
ET-SOL-ÍON	-484,12	557,08
SOL-SOL	-309979	310060,80
SOL-ÍON	-330328,00	330579,10
HTotal	-10525,35	-10606,41
<b>Delta H</b>	<b>81,06 kJ.mol<sup>-1</sup></b>	

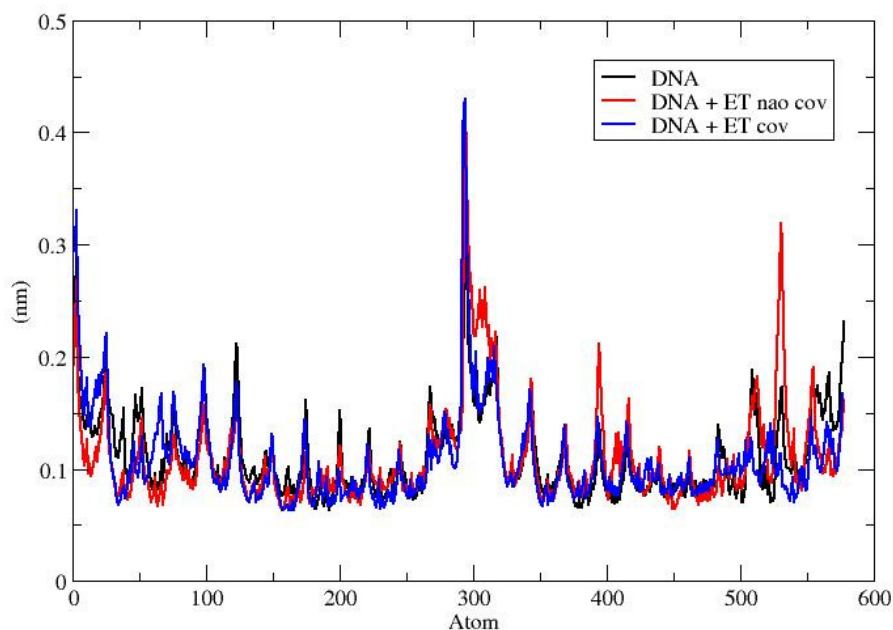
**Tabela 8:** Energias calculadas com o afastamento do fármaco de seu sítio de interação da seqüência AGG.

	<b>AGG</b> (+próx)	<b>AGG</b> (+afast)
DNA-DNA	-5241,00	-5212,00
DNA-ET	-172,00	-0,03
DNA-SOL-ÍON	-6986,00	-7231,00
ET-ET	2082,00	2021,00
ET-SOL-ÍON	-550,00	-581,00
SOL-ÍON	-466842,00	-466844,00
HTotal	-10867,00	-11003,00
<b>Delta H</b>	<b>136 kJ.mol<sup>-1</sup></b>	

## 5.5. RESULTADOS PARA OS COMPLEXOS COVALENTES

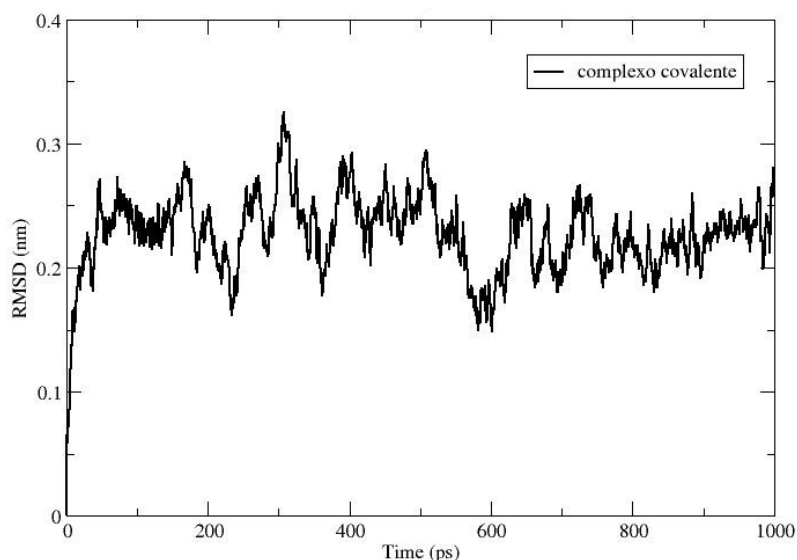
As simulações dos complexos covalentes dos oligonucleotídeos (CGG, AGC, AGG, AGT, CGA) visam analisar o comportamento do fármaco, porque o mesmo neste momento está ligado covalentemente, ou seja, simulando a ocorrência da alquilação no N2 da guanina central. Os complexos covalentes mais estáveis da etapa de aproximação da ET743 foram usados para estruturas iniciais para a construção dos complexos. A construção destes complexos irá nos permitir estudos dos sítios de interação descritos pela literatura, bem como a ocorrência dos HBs.

Na seqüência AGG com a ET743 nota-se a diminuição da flutuação na região dos tríades centrais das estruturas, tanto nos complexos não covalentes e covalentes (Figura 52) durante a dinâmica, mostrando que o complexo covalente desta seqüência é mais estável na forma covalente do que o complexo não covalente e o oligonucleotídeo isolado.



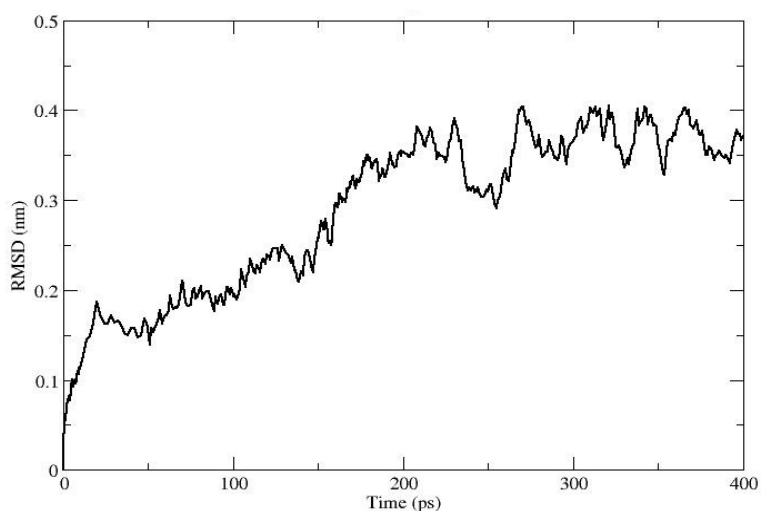
**Figura 52:** RMSF de todos os átomos da seqüência AGG, perante aproximação da ET743 na dinâmica molecular. Linha vermelha AGG-ET743 complexo não covalente, linha preta AGG isolado e linha azul AGG-ET743 complexo covalente.

Além da menor flutuação para a seqüência AGG de moderada interação com o fármaco, o seu complexo apresenta boa estabilidade durante todo o período da dinâmica, como observamos na figura 52. Os valores baixos do RMSD (Figura 53) e (Figura 55) a observação de conservação da estrutura confirma que o complexo covalente é bem estável.

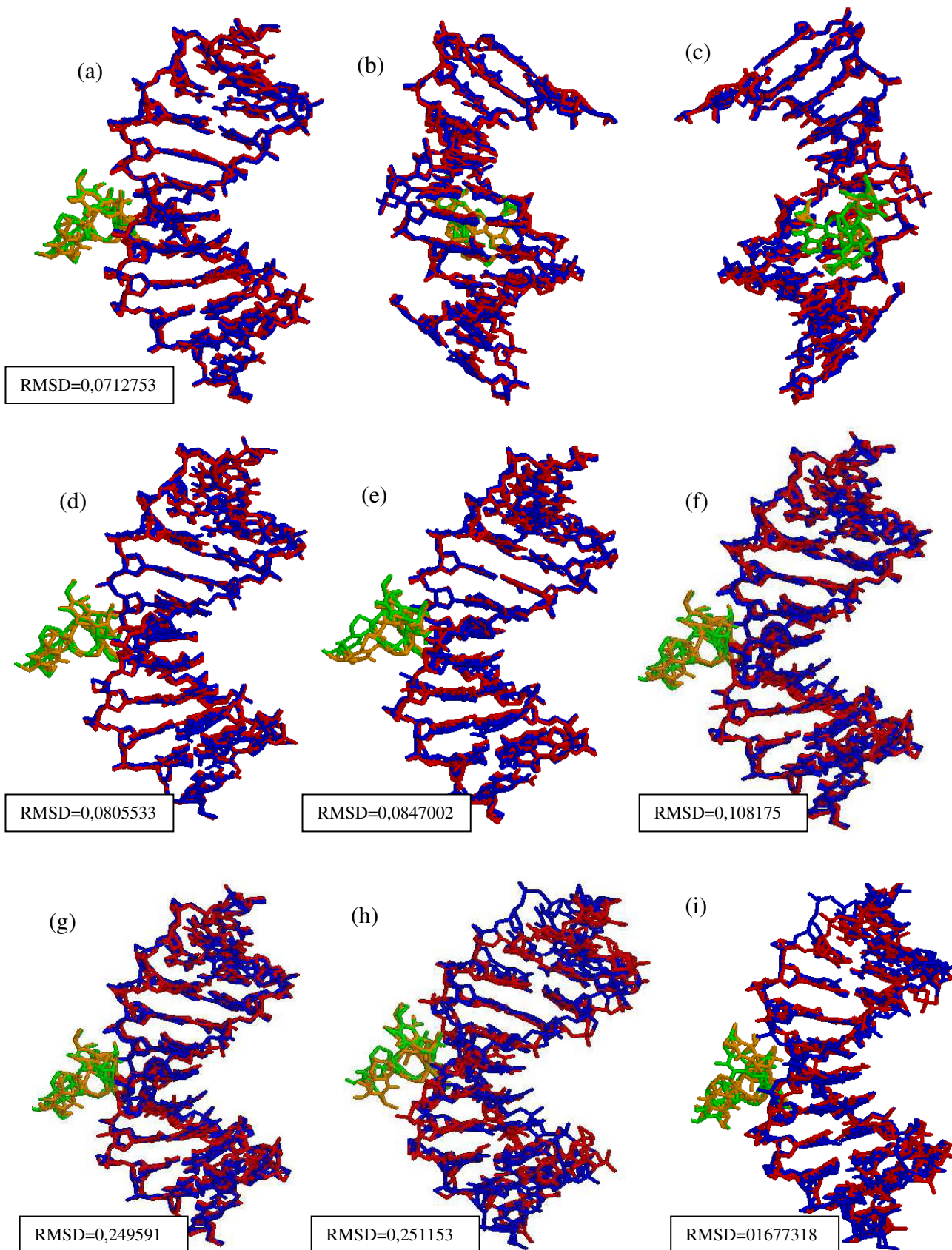


**Figura 53:** RMSD de todos os átomos da seqüência AGG do complexo covalente AGG-ET743 após 1,0 ns de simulação.

O complexo covalente construído pela seqüência AGT, apresentou variação da estrutura durante a dinâmica, como observamos na figura 54, embora a escala de tempo de dinâmica seja pequeno. Pela figura 56, podemos observar as variações do RMSD, que permanecem altos durante a dinâmica.

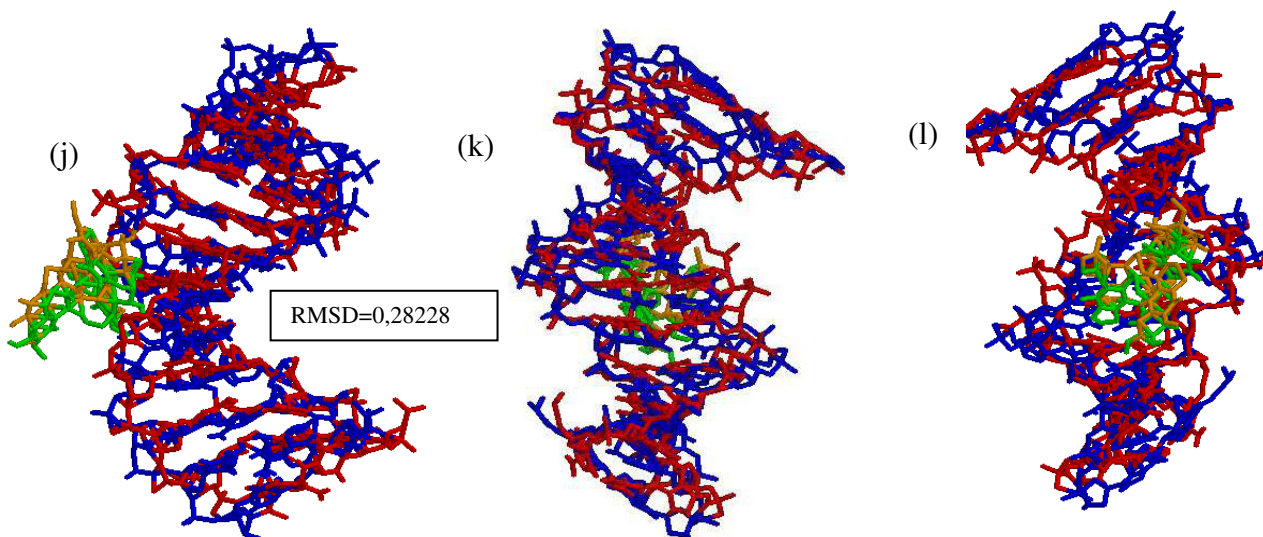


**Figura 54:** RMSD de todos os átomos da seqüência AGT do complexo covalente AGG-ET743 após 400 ps de simulação.

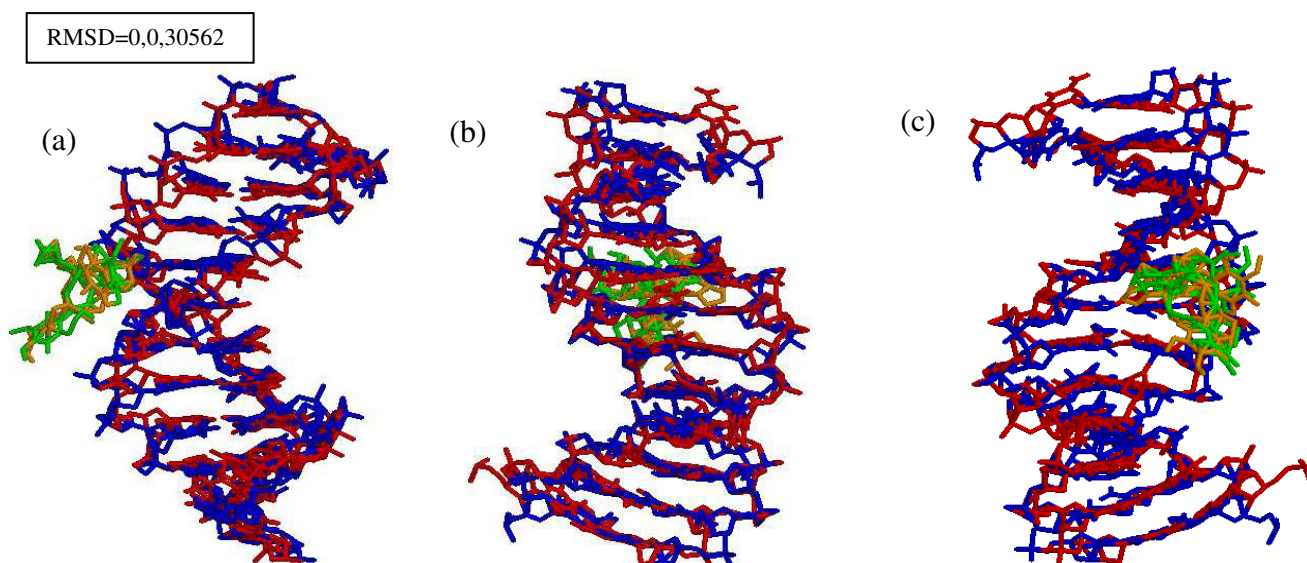


**Figura 55:** Sobreposição do complexos não covalente ET-AGG com o complexo covalente ET-AGG. (a), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGG não covalente), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC covalente), Laranja (ET final).

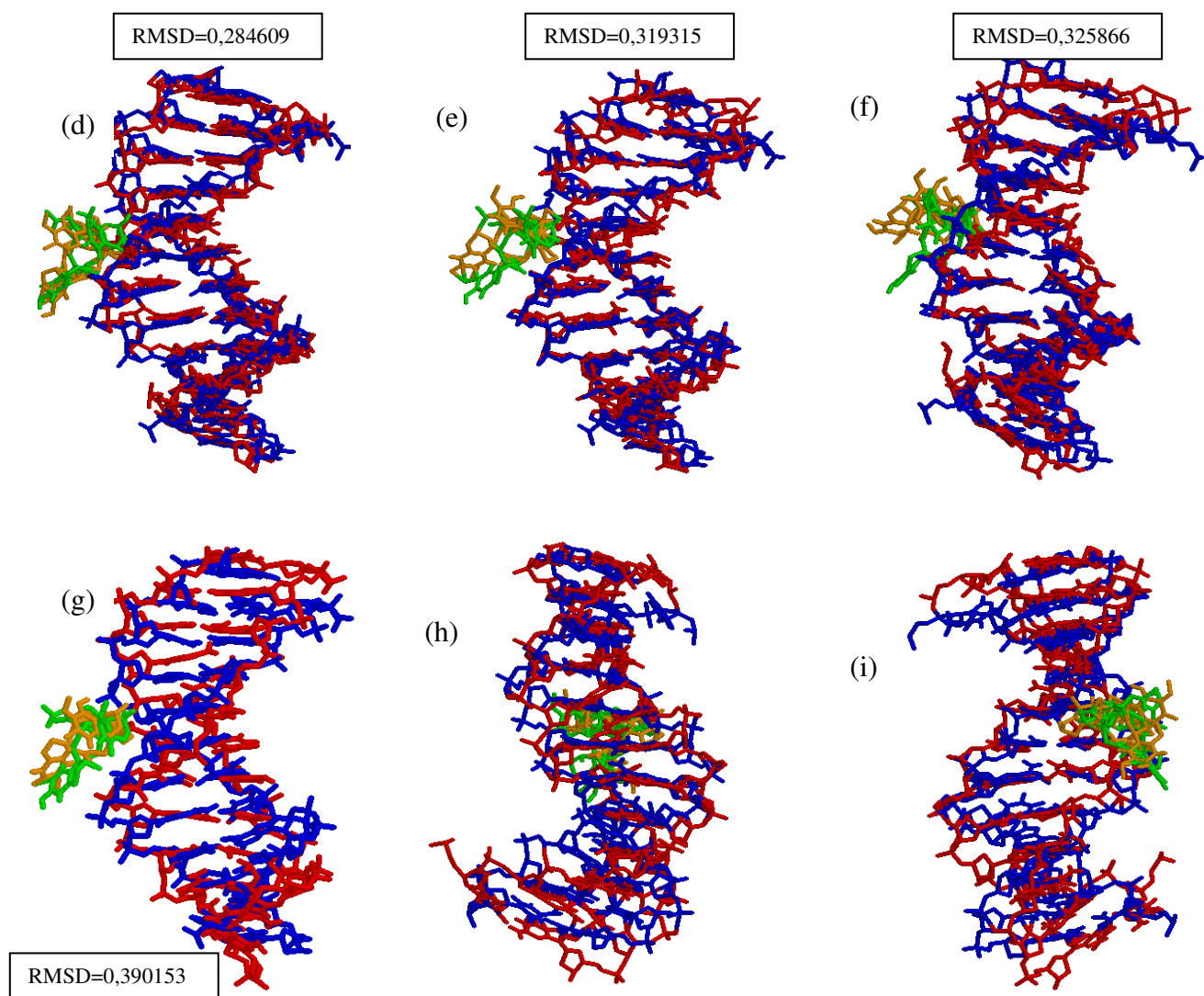




**Figura 55:** Continuação. Sobreposição do complexos não covalente ET-AGG com o complexo covalente ET-AGG. (a), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) visão lateral. (b) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGG não covalente), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGC covalente), Laranja (ET final).



**Figura 56:** Sobreposição dos complexos covalente ET-AGT ao longo da dinâmica. (a), (d), (e), (f) e (g) visão lateral. (b) e (h) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGT inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGT final), Laranja (ET final).



**Figura 56:** Continuação. Sobreposição dos complexos covalente ET-AGT ao longo da dinâmica. (a), (d), (e), (f) e (g) visão lateral. (b) e (h) Visão frontal com o fármaco ao fundo e (c) e (i) Visão frontal com o fármaco na frente. Azul (AGT inicial), Verde ET (Inicial), Vermelho (AGT final), Laranja (ET final).



## 6. CONCLUSÕES

A partir dos objetivos traçados, o presente trabalho permitiu concluir que:

- As cargas atômicas obtidas para ET743 forneceram simulações confiáveis e estáveis para o fármaco.
- Apesar de exibir certa tendência à desnaturação em algumas extremidades dos oligonucleotídeos em solução, as simulações usando o campo de força GROMOS 53A6 se caracterizam pela estabilidade da região central (especialmente a tríade central que interage com o fármaco), a qual adquire uma forma B.
- Não há uma relação óbvia entre as seqüências com as quais a ET743 interage, por um lado, e as distorções ou as intensidades das interações, por outro lado. Embora a dinâmica molecular tenha fornecido uma ferramenta para caracterizar a estrutura do complexo, não foi possível uma hierarquização das reatividades com base puramente nos resultados da simulação.
- No entanto, algumas peculiaridades quanto à reatividade das seqüências puderam ser notadas. A seqüência CGA é a que mostrou a interação mais reversível, a aproximação da ET743 perturba a mesma, mas com o afastamento e estrutura volta a forma inicial isolada. Além disso, constatou-se, no oligonucleotídeo que apresentava tríade central AGG uma migração da ET743 a qual, ao invés de interagir com a guanina 6, passou a interagir com a guanina 7 (ficando tríade 5'-GGA<sup>8</sup>). A literatura, de fato, aponta que esta última é mais favorável do que a anterior.
- Embora a energia de interação seja positiva (endotérmica) a ET743 interage fortemente com o DNA, distorcendo a sua estrutura e exibindo um longo tempo de residência no sítio de interação, devido a ligações de hidrogênio. Algumas destas ligações confirmam as previstas na literatura, mas foram encontradas muitas outras ligações não recitadas (alternativas).
- Ao interagir com o DNA, a ET743 diminui a mobilidade relativa dos segmentos, mesmo quando esta interação é de caráter não-covalente.
- A formação de ligação covalente entre ET743 e DNA leva a uma diminuição na mobilidade e a uma distorção na estrutura do DNA.

Globalmente, os resultados obtidos confirmam o potencial de ferramentas de simulações computacionais no estudo de sistemas biológicos, em especial DNA (oligonucleotídeos), comparando informações da literatura com a prática e mostrando novos caminhos, como por exemplo, que o metodologias via dinâmica molecular sirva como instrumento de investigação para sistemas biológicos antes dos estudos experimentais.

## **7. PERSPECTIVAS**

Considerando os resultados obtidos no trabalho e as informações obtidas dos complexos não covalentes e covalentes entre a ET743 e os oligonucleotídeos. Ainda temos que realizar:

- Caracterização das ligações de hidrogênio nos complexos não covalentes com seqüência (AGT e CGA);
- Análises complementares do afastamento para as seqüências (AGT e CGA);
- Simulações mais longas para os complexos covalentes;
- Caracterização das ligações de hidrogênio dos complexos covalentes, bem como sua comparação com a literatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- <sup>1</sup> Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2006: *Incidência de Câncer no Brasil*. INCA, Rio de Janeiro. 2006.
- <sup>2</sup> International Union Against Cancer: *Introduction UICC Global Cancer Control*. Geneve, Switzerland, UICC, 2005.
- <sup>3</sup> National Horizon Scanning Centre, *Trabectedin (Yondelis) for soft tissue sarcoma*. Jan, 2003.
- <sup>4</sup> B. M. Moore, F. C. Seaman, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5475-5476, 1997.
- <sup>5</sup> K. L. Rinehart, T. G. Holt, N. L. Fregeau, J. G. Stroh, P. A. Keifer, F. Sun, L. H. Li, D. G. Martin. *J. Org. Chem.* **55**, 4512-4515, 1990.
- <sup>6</sup> S. Delalogue, A. Yovine, A. Taamma, M. Riofrio, E. Brain, E. Raymond, P. Cottu, F. Goldwasser, J. Jimeno, J. L. Misset, M. Marty, E. Cvitkovic. *J. Clin. Oncol.* **19**, 1248-1255, 2001.
- <sup>7</sup> A. Taama, J. L. Misset, M. Riofrio, C. Guzman, E. Brain, L. Lopez Lazaro, H. Rosing, J. M. Jimeno, E. Cvitokovic *J. Clin. Oncol.* **19**, 1256-1265, 2001.
- <sup>8</sup> F. C. Seaman, L. H. Hurley. *Molecular Basis for the DNA Sequence Selectivity of Ecteinascidin 736 and 743: Evidence for the Dominant Role of Direct Readout via Hydrogen Bonding*. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 13028-13041, 1998.
- <sup>9</sup> Grant, G.H.; Richards, W.G.; *Computational Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 1995.
- <sup>10</sup> M. P. Allen and D. J. Tildesley – *Computer Simulation of Liquids*, Clarendon Press, Oxford, 1987.
- <sup>11</sup> M. Frenkel e B. Smit – *Understanding Molecular Simulation*, Academic Press, San Diego, 1996.
- <sup>12</sup> N. H. Morgon e K. Coutinho – *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*, Ed livraria da física, São Paulo, 2007.
- <sup>13</sup> Daura, X.; Mark, A. E.; e van Gunsteren, W. F. *Journal of Computational Chemistry* **19**, 535 (1998); van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P. e Tironi, I. G. Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich.
- <sup>14</sup> De Souza O.N., Ornstein R.L. *Effect of periodic Box size on aqueous molecular dynamics simulation of a DNA dodecamer with particle-mesh Ewald method*. *Biophys J.* **1**;72(6):2395-7, 1997.

- <sup>15</sup> Darden, T., York, D., Pedersen, L. *Particle mesh Ewald: An  $N$ -log( $N$ ) method for Ewald sums in large systems.* J. Chem. Phys. 98:10089–10092, 1993.
- <sup>16</sup> U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen. *A smooth particle mesh ewald potential.* J. Chem. Phys. **103**, 8577–8592, 1995.
- <sup>17</sup> Luty, B. A., Tironi, I. G., van Gunsteren, W. F. Lattice-sum methods for calculating electrostatic interactions in molecular simulations. J. Chem. Phys. 103:3014–3021, 1995.
- <sup>18</sup> T. Hansson. C. Oostenbrink, e W. F. Van Gunsteren, *Molecular dynamics simulations Curr. Opin, Struct. Biol.* **12**, 120, 2002.
- <sup>19</sup> Oostenbrink C., Soares T. A., Van der Vegt N. F. A., Gunsteren W. F. V., *Eur Biophys J.* 34: 273-284, 2005.
- <sup>20</sup> Oostenbrink C., Villa A., Mark A. E., Van Gunsteren W. F.. *J. Comput.Chem.*, **25**, 1656, 2004.
- <sup>21</sup> <http://www.gromacs.org>, van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A. R.; Apol, E. Acessado em 09/03/2006.
- <sup>22</sup> Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., Berendsen, H. J. C. *Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints; molecular dynamics of n-alkanes.* J. Comp. Phys. 23:327–341, 1977.
- <sup>23</sup> Miyamoto, S., Kollman, P. A. SETTLE: *An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models.* J. Comp. Chem. 13:952–962, 1992.
- <sup>24</sup> Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Fraaije, J. G. E. M. *LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations.* J. Comp. Chem. 18:1463–1472, 1997.
- <sup>25</sup> Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., DiNola, A., Haak, J. R. *Molecular dynamics with coupling to an external bath.* J. Chem. Phys. 81:3684–3690, 1984.
- <sup>26</sup> Berendsen, H. J. C, Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F. , Hermans, J. *Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Intermolecular Forces.* Pullman, B. ed. D. Reidel Publishing Company Dordrecht, 331-342, 1981.
- <sup>27</sup> Nelson, D. L. , Cox, M. M. *Nucleotídeos e ácidos nucléicos. In: Lehninger Princípios de Bioquímica*, Cap. 10. 3.ed, são Paulo: Sarvier, 2002.
- <sup>28</sup> Watson, J. D. ; Crick, F. H. C. *Molecular Structure of nucleic acids.* Nature, v. 171, p. 737-738. 1953.
- <sup>29</sup> Cheatham, T. E. *Simulation and modeling of nucleic acid structure, dynamics and interactions* Struc. Biology **14**. 360-367, 2004.
- <sup>30</sup> Ricci, C. G. A, *B e Z-DNA: caracterização conformacional e importância biológica.* Trabalho de conclusão de curso, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

M. Zewail-Foote, L. H. Hurley. *J. Med. Chem.* **42**, 2493-2497, 1999.

<sup>31</sup> Lu, X.-J., Olson W. K. *Nucleic Acids Research.* **17**, 5108, 2003.

<sup>32</sup> Xiang-Jun Lu. *3DNA— A 3-Dimensional Nucleic Acid Structure Analysis and Rebuilding Software Package*. Rutgers University, NJ, 2003.

<sup>33</sup> Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2000.

<sup>34</sup> Almeida et al. *Câncer e agentes antineoplásticos Ciclo-celular específico*. *Quím. Nova* **1**, 118-129, 2005.

<sup>35</sup> Haefner B. *Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates*. *DDT* **12**, 536-544, 2003.

<sup>36</sup> Soares, D.G.; Poletto N.P.; Bonatto, D.; Salvador, M.; Schwartzmann, G.; Henriques, J.A.P. *Biochemical Pharmacology* **70**. 59-69, 2005.

<sup>37</sup> J. H. Beumer, J. M. Rademaker-Lakhai, H. Rosing, M. J. X. Hillebrand, T. M. Bosch, L. L. Lazaro, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen. *Cancer Chemother Pharmacol* **59**. 825-837, 2007.

<sup>38</sup> Y. Takebayashi, P. Pourquier, D. B. Zimonjic, K. Nakayama, S. Emmert, T. Ueda, Y. Urasaki, A. Kanzaki, S-I. akiyama, N. Popescu, K. H. Kraemer, Y. Pommier. *Nature Medicine* **7**, 961-966, 2001.

<sup>39</sup> Zewail-Foote, L. H. Hurley. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6485-6495, 2001.

<sup>40</sup> Franco, M. Montenegro, M. R. *Patologia : processos gerais*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 320 p.

<sup>41</sup> M. Zewail-Foote, L. H. Hurley. *J. Med. Chem.* **42**, 2493-2497, 1999.

<sup>42</sup> [www.gaussian.com](http://www.gaussian.com), acessado em 05/05/2006.

<sup>43</sup> Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *J. Molec. Graphics* **14**, 33, 1996.

<sup>44</sup> Guex, N.; Peitsch, M.C. *Electrophoresis* **18**, 2714, 1997.

<sup>45</sup> Foote, L. H. Hurley. Li V. S, Khon H., Bearss D., Guzman M. *The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent*. *Chemistry & Biology*. **8**, 1033-1049, 2001.

<sup>46</sup> RasMol: Biomolecular graphics for all, by Roger A. Sayle and E. J. Milner-White, *Trends in Biochemical Sciences* **20**(Sept):374-376, 1995.