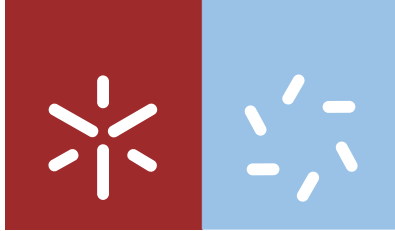


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Bárbara Palma de Abreu Caldeira Pinto

Estudos teóricos e estruturais para o desenvolvimento e síntese de aza-açúcares com atividade melhorada contra a Golgi α -manosidase II



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Bárbara Palma de Abreu Caldeira Pinto

Estudos teóricos e estruturais para o desenvolvimento e síntese de aza-açúcares com atividade melhorada contra a Golgi α -manosidase II

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Química Medicinal

Trabalho realizado sob a orientação do
Doutor Nuno Micaêlo

DECLARAÇÃO

Nome: Bárbara Palma de Abreu Caldeira Pinto

Endereço electrónico: brbr_abreu@yahoo.com Número do Bilhete de Identidade: 13976726

Título dissertação:

Estudos teóricos e estruturais para o desenvolvimento e síntese de aza-açúcares com atividade melhorada contra a Golgi α -manosidase II

Orientador: Doutor Nuno Micaêlo

Ano de conclusão: 2014

Designação do Mestrado:

Mestrado em Química Medicinal

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 16/05/2014

Assinatura: _____

*“Nature and nature’s laws
Lay hid in the dark
And God said
Let Newton be!
And all was light”*
Alexander Pope

Agradecimentos

Ao Doutor Nuno Micaêlo não só por toda a orientação e disponibilidade ao longo do trabalho, quer fosse presencialmente ou à distância, mas também por me ensinar a refletir sobre os problemas, a encontrar soluções e a criar autonomia ao longo deste tempo em que trabalhei no grupo. Para além disso, agradeço a amizade, a confiança depositada e todas as oportunidades que me apresentou.

Ao Doutor Claudio Soares por me ter recebido no ITQB.

À Sofia do grupo *Protein Modelling* no ITQB pela ajuda fundamental e preciosa para realizar a titulação de cadeias laterais de aminoácidos.

À Sara e ao Davide no ITQB pela ajuda essencial e preciosa na realização de PCA.

A todos os membros em geral dos grupos *Protein Modelling* e *Molecular Simulation* no ITQB por me terem acolhido bem.

A todas as pessoas que conheci no *Molecular Modelling and Simulation lab* na Universidade do Minho pela amizade, troca de ideias e inspiração.

A todas as pessoas que contribuíram para a minha formação e que me ajudaram ao longo do meu percurso académico na Universidade do Minho.

A todas as pessoas que me encorajaram ao longo deste ano.

Aos meus amigos que me apoiaram e me compreenderam nesta fase.

Aos meus pais, e ao resto da família por todo o apoio, amor e compreensão dados.

À minha mãe por todo o apoio, amor e paciência.

A Deus e ao meu anjo da guarda por toda a força e proteção.

Estudos teóricos e estruturais para o desenvolvimento e síntese de aza-açúcares com atividade melhorada contra a Golgi α -mannosidase II

Resumo

A maior parte dos tumores apresentam padrões de glicosilação aberrantes, como a siliação e a ramificação de oligossacarídeos *N*-ligados. Alguns destes padrões estão associados à progressão do cancro como eventos de metástase, invasão de tecidos e evasão ao sistema imune. A Golgi α -mannosidase II (GMII) cliva dois resíduos de manose aquando do processamento de oligossacarídeos *N*-ligados. A sua inibição leva à diminuição da progressão dos tumores tornando-se num alvo terapêutico. A swainsonina é, atualmente, o inibidor mais potente para a GMII, porém não é seletiva contra a α -mannosidase lisossomal (LM), pensando-se estar associada a alguns efeitos secundários.

Neste trabalho utilizaram-se técnicas de modelação molecular para descobrir e avaliar a atividade e seletividade de novos derivados de swainsonina como as azaswainsoninas ou com outros substituintes na posição 5.

A titulação de cadeias laterais de aminoácidos protonáveis foi realizada para obter uma estrutura com os estados de protonação a pH 6.6 para realizar cálculos de energia livre. As interações fundamentais para a ligação de inibidores à proteína foram deduzidas usando simulações de dinâmica molecular de complexos proteína-ligando já caracterizados. Realizou-se *docking* de um conjunto de derivados da swainsonina e de um pequeno conjunto de moléculas contra um conjunto de estruturas da GMII determinadas experimentalmente juntamente com um modelo flexível correspondente às estruturas de menor energia, obtido por dinâmica molecular e análise de componentes principais. Concluiu-se assim, que a maior parte dos análogos criados tem uma afinidade semelhante ou superior à da swainsonina e alguns mostram seletividade. Os cálculos de integração termodinâmica permitiram, de uma forma mais rigorosa, mostrar quais os grupos funcionais mais favorecidos e os cálculos de MM-PBSA mostraram o comportamento dinâmico dos derivados desenvolvidos, apesar de não ser possível aferir a afinidade por este método.

Theoretical and structural studies for the development and synthesis of stereoselective azasugars with improved activity towards Golgi α -mannosidase II

Abstract

Most tumors show altered glycosylation patterns, such as sialylation and ramification of *N*-linked oligosaccharides. Some are associated to cancer progression events, such as metastasis, tissue invasion, growth and non-recognition by the immune system. Golgi α -mannosidase II (GMII) plays a key role in the *N*-glycosylation pathway, trimming two mannose residues. The inhibition of GMII leads to a decrease in cancer progression. Therefore, GMII is a promising therapeutic target. Swainsonine is the most potent inhibitor for GMII known. However, it also inhibits lysosomal α -mannosidase (LM) and it is thought to be associated to several side effects.

In the current work, molecular modelling techniques were used in order to find and evaluate the activity and selectivity of new swainsonine derivatives such as azaswainsonines or other possessing new moieties in position 5.

Titration of ionizable sidechains of aminoacids was done in order to obtain a structure with the correct protonation states at pH 6.6. This structure was used to build the systems for free energy calculations. The most important interactions for ligand binding were concluded using molecular dynamics simulations of already known and characterized protein-ligand complexes. Docking of a set of swainsonine derivatives and a small set of miscellaneous molecules was made against another set of crystallographic structures along with a flexible model of low energy structures, obtained by molecular dynamics and principal component analysis. It was concluded that most swainsonine analogues display a similar or greater affinity than swainsonine and some of these even show selectivity. Thermodynamic integration calculations showed in a more rigorous way which were the most favoured moieties and MM-PBSA calculations allowed to check the dynamic behavior of the developed analogues, despite the fact that it was not possible to confirm the analogues' affinity in this way.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice.....	xi
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de imagens.....	ix

1- Introdução

• 1.1-Papel biológico dos hidratos de carbono.....	1
• 1.2-Biossíntese de proteínas N- glicosiladas.....	2
• 1.3-O papel dos glicanos no cancro.....	5
• 1.4-Golgi α -manosidase II.....	7
• 1.5-Inibição da Golgi α -manosidase II (GMII).....	9

2-Metodologias de modelação molecular

• 2.1-Simulações de dinâmica molecular (DM).....	12
• 2.2-Métodos de simulação baseados em não-amostragem.....	17
• 2.3-Inicialização de um sistema.....	18
• 2.4-Cálculos de energia livre.....	19
○ 2.4.1 Integração termodinâmica (IT)	20
○ 2.4.2 MM-PBSA (<i>Molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area</i>).....	21
• 2.5-Docking.....	22
• 2.6- Análises PCA (<i>Principal Component Analysis</i>).....	24
• 2.7-Titulação de cadeias laterais protonáveis.....	24

3-Materiais e métodos

- 3.1 Titulação de resíduos com cadeias laterais ionizáveis.....26
 - 3.1.1.Criação da estrutura inicial.....26
 - 3.1.2 Cálculos de electrostática contínua (EC).....26
 - 3.1.3 Cálculos de Monte Carlo.....27
- 3.2-Simulações de dinâmica molecular da proteína apo e de complexos proteína-ligando.....27
- 3.3-Análises *Principal Component Analysis* (PCA).....28
- 3.4-*Docking*.....29
- 3.5 Cálculos de energia livre29
 - 3.5.1 Construção dos sistemas.....29
 - 3.5.2 Integração termodinâmica (IT).....30
 - 3.5.3 MM-PBSA.....31

4- Titulação de resíduos de aminoácidos ionizáveis da GMII.....33

5-Estudo estrutural de complexos proteína-ligando.....38

6- *Docking* de derivados da swainsonina

- 6.1 Desenvolvimento de derivados da swainsonina.....46
- 6.2 Comparação das estruturas obtidas por DM/MM com as cristalográficas.....48
- 6.3 Resultados do *docking* realizado.....49

7-Cálculos de energia livre

- 7.1 Cálculos de Intergração termodinâmica.....57
- 7.2 Cálculos de MM-PBSA.....66

8-Conclusão.....81

9-Referências bibliográficas.....84

10-Anexos.....91

Lista de abreviaturas

Pi - Fosfato	Tnf-α - <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
mRNA - Ácido desoxirribonucleico mensageiro	Nag - <i>N</i> -acetilglucosamina
Glc -Glucose	UDP -Uridina difosfato
Man -Manose	Å -Ångström
GDP -Guanosina difosfato	ns -Nanosegundo
glcNAc - <i>N</i> -acetilglucosamina	Thr -Treonina
His -Histidina	Ser -Serina
Asp -Aspartato	fs -Fentosegundo
Asn - Asparagina	
N-cam - <i>Neuronal cell adhesion molecule</i>	
RE -Retículo endoplasmático	
NK - <i>Natural killer</i>	
GMII -Golgi α -manosidase	
ML - α -manosidase lisossomal	
PDB - <i>Protein DataBank</i>	
DM/MM -Dinâmica molecular/Mecânica molecular	
PME - <i>Particle Mesh Ewald</i>	
MM-PBSA - <i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i>	
IT -Integração termodinâmica	

Índice de figuras

Figura 1-Exemplos de monossacarídeos e dissacarídeos.....	1
Figura 2-Esquema da biossíntese de proteínas N-glicosiladas (adaptado de [1])	2
Figura 3-Esquema das várias transformações que o oligossacarídeo N-ligado sofre durante o seu processamento, Glc-glucose; Man-manose ; GlcNAc- N-acetilglucosamina; Gal-galactose; AS-ácido siálico.....	3
Figura 4-Exemplos de polissacarídeos envolvidos no cancro.....	5
Figura 5-Esquema da reação levada a cabo pela GMII.....	6
Figura 6- Estrutura do substrato da GMII. G-glucosamina, M-manose, Asn-Asparagina	6
Figura 7- Estrutura secundária da parte catalítica da GMII, a rosa está o domínio C-terminal, a amarelo o domínio N-terminal e a azul três hélices α . Código PDB:3CZN.....	7
Figura 8- Estrutura da GMII, com GlcNAcMan ₅ GlcNAc ligado. A face convexa está para cima e a plana para baixo. Código PDB:3CZN	7
Figura 9- Centro ativo da GMII, com GlcNAcMan ₅ GlcNAc, M4 e M5 são os resíduos de manose numerados como na fig.8, que se ligam nos locais catalítico, de holding e de ancoragem respectivamente.....	8
Figura 10- Mecanismo da reação de hidrólise dos resíduos de manose executada pela GMII. Entre parêntesis está o estado de transição oxocarbénio.....	9
Figura 11- Exemplos de alcalóides naturais de várias classes e que inibem glicosidasas.....	9
Figura 12-Ligação de GlcNAcMan ₅ GlcNAc à GMII (PDB:3CZN) em azul e LM (PDB:17OD) a amarelo.....	11
Figura 13- Potencial harmónico descrito pelos movimentos dos átomos em ligações e ângulos.....	14
Figura 14-Potenciais descritos pelos diedros impróprios (A) e diedros próprios (B).....	14
Figura 15-Potencial de Lennard-Jones.....	15
Figura 16- Potencial colômbico gerado por duas partículas de carga oposta.....	16
Figura 17- Esquematização do algoritmo <i>leap-frog</i> . Adaptado de [35].....	16
Figura 18- GMII com condições periódicas de fronteira.....	17
Figura 19- Diagrama de um algoritmo que realiza simulações de dinâmica molecular.....	19

Figura 20- Exemplo de um gráfico usado para calcular a afinidade num processo de IT.....	20
Figura 21- Esquema de cálculo para a área não polar.[38].....	22
Figura 22- Estrutura de um cromossoma e respetivos caracteres para cada uma das características da molécula.....	22
Figura 23-Estrutura dos tautómeros da histidina.....	24
Figura 24-Exemplo de uma transformação realizada por integração termodinâmica.....	30
Figura 25-Ciclo termodinâmico usado para as experiências de integração termodinâmica.....	30
Figura 26- Curvas de titulação para os resíduos de histidina 90 e 471. Encontra-se representada a probabilidade da histidina estar protonada no respetivo estado (HISE ou HISD) em função do pH.....	33
Figura 27- Curvas de titulação para o resíduo de histidina 273 e aspartato 270.....	35
Figura 28- Posições dos resíduos 270 e 273 nas estruturas 3BLB (a azul) e na estrutura 1HXK (a laranja).....	35
Figura 29- Curvas de titulação para os resíduos de aspartato 204 e 92.....	36
Figura 30- Curvas de titulação para as várias formas da histidina 470 e para o resíduo de aspartato 472.....	36
Figura 31- Posições dos resíduos 470 e 472 nas estruturas 3BLB (a azul) e na estrutura 2F1A (a laranja).....	37
Figura 32- Estrutura da swainsonina e os seus modos de ligação no complexo cristalográfico (A) e após 20ns de simulação (B). A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	38
Figura 33- Estrutura da tioswainsonina e os seus modos de ligação no complexo cristalográfico (A) e após 20ns de simulação (B). A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	39
Figura 34- Estrutura da desoximanojirmicina.....	39
Figura 35- Ligação da desoximanojirmicina à GMII. A- Ligação da molécula na estrutura cristalográfica. B- Ligação à GMII após 20ns de simulação. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	40
Figura 36- Ligação da pirrolidina substituída na posição 5 à GMII. A- Ligação da molécula na estrutura cristalográfica. B- Ligação à GMII após 20ns de simulação. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	40

Figura 37- Ligação da swainsonina substituída na posição 5 à GMII. A- Ligação da molécula na estrutura cristalográfica. B- Ligação à GMII após 20ns de simulação. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	41
Figura 38- Ligação do manoimidazole substituída na posição 5 à GMII. A- Ligação da molécula na estrutura cristalográfica. B- Ligação à GMII após 20ns de simulação.....	42
Figura 39- Estrutura geral das azaswainsoninas.....	46
Figura 40-Esquema do centro ativo com os vários pockets e com a swainsonina ligada.....	46
Figura 41- Representação de um fragmento do substrato Man ₃ (verde), a swainsonina (estrutura 3BLB) e um modelo das novas swainsoninas propostas (laranja). A azul está a estrutura da GMII (código PDB: 3BLB).....	47
Figura 42-Sobreposição do mínimo de menor energia retirado do basin (a azul), da estrutura cristalográfica da forma apo (a verde-código PDB:3BUB) e da estrutura cristalográfica do complexo com a swainsonina (a laranja-código PDB:3BLB).....	48
Figura 43-Ligação de um derivado da swainsonina (S17) à estrutura 3EJU. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	50
Figura 44-Ligação de um derivado da swainsonina (SC1) à conformação 98586. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	50
Figura 45-Ligação de uma azaswainsonina (AC1) à estrutura 1HXX. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	51
Figura 46-Ligação de um derivado da swainsonina (S17) à estrutura 98568. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	52
Figura 47-Ligação de um derivado da swainsonina (S19) à estrutura 98566. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	52
Figura 48-Protómeros existentes para o derivado com a cadeia lateral CH ₂ NH ₂	52
Figura 49-Ligação de um derivado dissustituído (S30) à estrutura 98571.....	53
Figura 50-Estruturas dos análogos 33 e 34, respetivamente.....	53
Figura 51-Swainsonina 5-substituída ligada à estrutura 98570. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	53
Figura 52-Swainsonina ligada à estrutura 98568. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	54
Figura 53- CID 449437 ligado à estrutura 3D4Y. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	55

Figura 54- A-CID 124021 ligado à estrutura 1HXK. B-CID 124021 ligado à estrutura 98572. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	55
Figura 55- CID 441437 ligado à estrutura 3BLB. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.....	56
Figura 56- A-Estrutura da indolisina 6. B- Estrutura da pirrolidina 1.....	56
Figura 57- Ligação do derivado da azaswainsonina com uma cadeia lateral amida. As pontes de hidrogénio estão a amarelo e as distâncias em Ångstrom.....	65
Figura 58- Ligação do derivado da azaswainsonina com a cadeia lateral $\text{CH}_2\text{COC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ com a estrutura 3EJQ obtida experimentalmente. As pontes de hidrogénio estão a amarelo e as distâncias em Ångstrom.....	66
Figura 59- Modo de ligação das azaswainsoninas com grupos carboxilo e amida após 10ns de simulação.....	68
Figura 60- Modo de ligação da azaswainsonina com a cadeia lateral CONHC_6H_5 após 10ns de simulação.....	69
Figura 61- Modo de ligação das azaswainsoninas com as cadeias laterais $\text{CH}_2\text{NHC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$ e $\text{CH}_2\text{COC}_6\text{H}_5$, após 10ns de simulação.....	69
Figura 62- Modo de ligação da swainsonina com uma cadeia lateral éster.....	70
Figura 63- Modo de ligação da swainsonina com uma cadeia lateral CH_2COO^- após 10ns de simulação... ..	70
Figura 64- Modo de ligação de dois derivados da swainsonina dissubstituídos com uma cadeia lateral CH_2OH	71
Figura 65- Modo de ligação de um derivado da swainsonina dissubstituído com uma cadeia lateral cíclica.....	71
Figura 66- Estrutura e modo de ligação de um derivado da swainsonina com uma cadeia lateral mais longa, capaz de alcançar o local de holding.....	72
Figura 67- Estrutura e modo de ligação de um derivado da swainsonina com uma cadeia lateral que possui um grupo carboxilo mais longa, capaz de alcançar o local de holding.....	72
Figura 68- Estrutura e modo de ligação de um derivado da swainsonina com um grupo terminal que possui um grupo carboxilo.....	73
Figura 69- Estrutura e modo de ligação de um derivado da swainsonina com um grupo terminal que possui um grupo carboxilo.....	73
Figura 70- Estrutura e modo de ligação de um derivado da azaswainsonina.....	74
Figura 71- Estrutura e modo de ligação de um derivado dissubstituído da azaswainsonina, em que o <i>linker</i> possui um anel alifático substituído em posições adjacentes.....	75

Figura 72-Estrutura e encaixe do derivado da swainsonina monosubstituído em que o linker possui um anel alifático substituído em posições adjacentes. A- Estrutura do derivado da swainsonina, B- Interações que a molécula realiza com a proteína, C-Conformções obtidas ao longo de 10ns de simulação, o local de ancoragem está demarcado com um círculo vermelho e o local de holding com um círculo preto. A amarelo estão representadas todas as interações por pontes de hidrogénio e as ligações da molécula ao metal.....	75
Figura 73-Estrutura e modo de ligação de um derivado de swainsonina, em que o linker possui um anel alifático substituído em posições 1,3.....	76
Figura 74-Estrutura e modo de ligação de um derivado de swainsonina, com o linker $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$	77
Figura 75-Estrutura e modo de ligação de um derivado de azaswainsonina, com o linker $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$ substituído em meta.....	77
Figura 76-Estrutura e modo de ligação de um derivado de swainsonina, que possui o linker $\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$	77
Figura 77-Estrutura e modo de ligação de um derivado de swainsonina, que possui o linker $\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$, mas uma unidade terminal diferente.....	78
Figura 78-Estrutura e modo de ligação de um derivado dissubstituído de swainsonina, que possui o linker $\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2\text{CH}_2$	78
Figura 79-Estrutura e modo de ligação ao local de holding de um derivado monosubstituído de swainsonina, que possui o linker $\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2\text{CH}_2$	78
Figura 80-Estrutura e modo de ligação ao local de ancoragem do derivado acima mostrado que possui o linker $\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2\text{CH}_2$	79
Figura 81-Estrutura e modo de ligação ao local de ancoragem do derivado da swainsonina que possui com o linker que contém um anel de cinco membros substituído nas posições 2,4.....	79
Figura 82-Estrutura e modo de ligação ao local de ancoragem do derivado da swainsonina que possui com o linker que contém um anel de cinco membros substituído nas posições 2,3.....	79

1.Introdução

1.1. Papel biológico dos hidratos de carbono

Os hidratos de carbono são as biomoléculas mais abundantes na natureza. Estruturalmente, são definidos por serem polihidroxi aldeídos, cetonas ou outras substâncias, que quando sofrem hidrólise, originam açúcares. [1]

Existem três classes de hidratos de carbono: os monossacarídeos, os oligossacarídeos e os polissacarídeos. Os monossacarídeos caracterizam-se por possuírem apenas um grupo aldeído ou cetona, dois ou mais grupos hidroxilo e mais de três átomos de carbono. Os monossacarídeos com mais de cinco átomos de carbono encontram-se predominantemente numa forma cíclica (figura 1). Os oligossacarídeos contêm dois ou mais monossacarídeos covalentemente ligados entre si, através de ligações glicosídicas, em que há a formação de um acetal através da reação de um grupo hidroxilo de um açúcar com o carbono anomérico de outro. Os mais abundantes são os dissacarídeos como a lactose e a sacarose (figura 1). [1] Os polissacarídeos são polímeros que contêm mais de 20 resíduos de monossacarídeos, como por exemplo, o amido e o glicogénio. Estas moléculas podem ser cadeias lineares ou ramificadas e também podem ser constituídas por monómeros iguais ou diferentes entre si. [1][2]

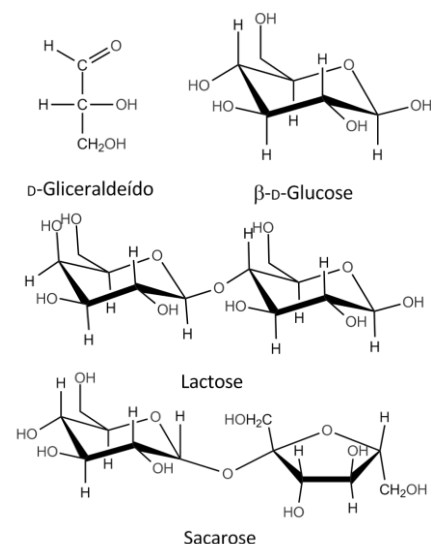


Figura 1. Exemplos de monossacarídeos e dissacarídeos.

Os hidratos de carbono podem ser covalentemente ligados a outras biomoléculas formando glicoconjugados ou glicanos. As glicoproteínas possuem oligossacarídeos covalentemente ligados a proteínas. A ligação a proteínas pode ser realizada através de resíduos de arginina ou asparagina (*N*-ligação) ou ainda a resíduos de serina ou treonina (*O*-ligação). [1][3] Os glicolípidos são lípidos em que o grupo hidrofílico também possui hidratos de carbono ligados e os proteoglicanos possuem glicosaminoglicanos ligados covalentemente a proteínas membranares ou secretadas.

Os hidratos de carbono podem desempenhar uma grande variedade de funções. Podem servir para armazenamento de energia como o amido nas plantas e o glicogénio nos animais. Também podem ter uma função estrutural como a celulose, presente em plantas, a quitina presente no exoesqueleto de animais e o peptidoglicano na parede celular das bactérias. [1]

Em conjunto com estas funções, os polissacarídeos e oligossacarídeos também podem servir para o direcionamento de proteínas, endocitose, ativação de recetores, reconhecimento de moléculas endógenas e exógenas e adesão celular.[4]

Desta forma, as moléculas glicosiladas desempenham papéis em fenómenos como a adesão celular, infeções virais, reações inflamatórias, ação hormonal, reações imunes e mesmo metástase de células cancerígenas.[4]

Considera-se que os hidratos de carbono codificam informação, na medida em que podem variar na sua sequência, ramificação e flexibilidade conformacional, possuindo assim um elevado potencial de isomerização que aumenta o seu potencial como portadores de informação comparativamente a outras biomoléculas.[5]

As lectinas são proteínas que se ligam a glicanos e são altamente seletivas para estruturas específicas. Estão envolvidas em processos como as interações entre células em que as lectinas, como as selectinas, de uma célula interagem com os hidratos de carbono na superfície de outra célula.

1.2. Biossíntese de proteínas N- glicosiladas

Nos eucariontes, a biossíntese de proteínas que sofrem glicosilação após a tradução ocorre em ribossomas ligados ao retículo endoplasmático. No retículo endoplasmático (RE), começa por haver a síntese de um núcleo oligossacarídico num lípido polisoprenóide, o dolicol, que está inserido na membrana do RE. Esta síntese ocorre na face citoplasmática do retículo endoplasmático e há a transferência de um grupo fosfato e um resíduo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a partir de GDP-GlcNAc e outro resíduo de GlcNAc também através da molécula anterior (figura 2). Havendo depois

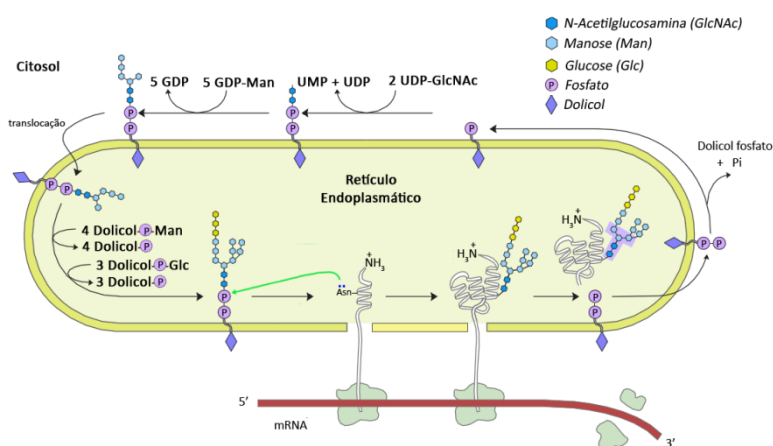


Figura 2- Esquema da biossíntese de proteínas N-glicosiladas (adaptado de [1])

transferência de cinco unidades de manose (Man) a partir de GDP-Man. De seguida, há a translocação do intermediário para o lúmen do RE. No lúmen do RE ainda há transferência de mais

resíduos de manose e glucose ligados ao dolicol fosfato para formar um núcleo final de catorze resíduos $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ (figura 2). Este oligossacarídeo é transferido *en bloc* para um resíduo de asparagina que esteja numa sequência AsnXSer ou AsnXThr (X é um qualquer resíduo exceto prolina) de um polipéptido nascente (figura 2). [1][6]

Após a junção do núcleo oligossacarídico à proteína recém-sintetizada existe uma fase de pós-processamento. Nesta fase começa por haver a excisão de três resíduos terminais de glicose 1,2 ligada pela glicosidase I e os resíduos de glicose 1,3 são removidos pela glicosidase II (figura 3). Este último passo é mais lento uma vez que as chaperonas calnexina e calreticulina assistem ao *folding* da proteína. De seguida, as manosidasases do retículo endoplasmático (manosidase I, manosidase II e endo- α -manosidase) removem um resíduo de manose em diferentes posições gerando diferentes intermediários que são translocados para o complexo de Golgi (figura 3-4/5/6). Neste organelo, as Golgi-manosidasases IA, IB e IC, uma para cada intermediário, clivam três manoses (figura 3-7/8/9).

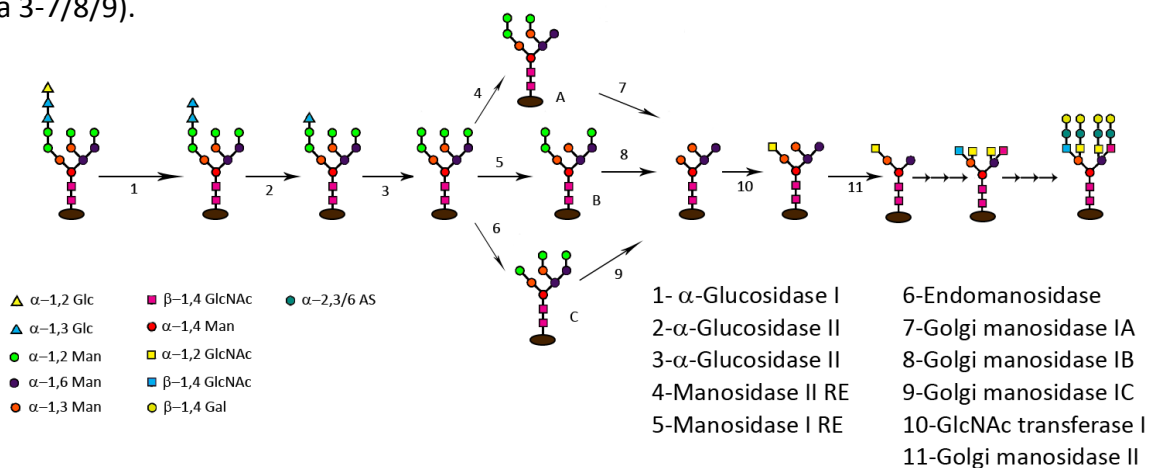


Figura 3- Esquema das várias transformações que o oligossacarídeo N-ligado sofre durante o seu processamento, Glc-glucose; Man-manose; GlcNAc- N-acetilglucosamina; Gal-galactose; AS-ácido siálico

Depois, um resíduo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) pode ser adicionado pela GlcNAc transferase I (figura 3-10). O produto resultante pode servir de substrato para três enzimas: a galactosiltransferase que transfere um resíduo de galactose para o oligossacarídeo, a N-acetilglucosaminiltransferase III que transfere um resíduo de N-acetilglucosamina e a Golgi- α -manosidase II que cliva dois resíduos de manose ligados através de ligações $\alpha-1,3$ e $\alpha-1,6$ a $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ para gerar $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ (figura 3-11). Apenas o produto desta última reação continua a ser processado para gerar oligossacarídeos mais complexos. $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ serve de substrato para GlcNAc transferases e outras glicosiltransferases sofrendo mais modificações de ramificação e extensão para se tornar mais complexo podendo implicar a adição

de outros aminoácidos como o ácido siálico. Esta fase final de elaboração de N-glicanos é a mais complexa e variada sendo a causa da grande diversidade de proteínas glicosiladas (figura 3-passos finais). As enzimas e proteínas destinadas aos lisossomas são fosforiladas em resíduos de manose no complexo de Golgi. [6][7][8]

Mutações nas enzimas responsáveis pela glicosilação podem conduzir a síndromes severos como a mucopolidose II que resulta da incapacidade de fosforilar resíduos de manose para direcionar enzimas para os lisossomas, provocando desordens no catabolismo proteico. Mutações no gene PMM2 são responsáveis pela diminuição da síntese do precursor oligossacarídico ligado ao dolicol estando relacionadas com desordens congénitas. Outras mutações nas enzimas desta via estão relacionadas com o aparecimento de diversos tipos de tumores e problemas no desenvolvimento embrionário. Quando há a interrupção de um primeiros passos da via biossintética há uma maior probabilidade de a doença ser mais severa.[4]

1.3 O papel dos glicanos no cancro

As células cancerígenas apresentam um padrão de glicosilação aberrante. As alterações passam por modificações nas estruturas dos oligossacarídeos *N*-ligados e *O*-ligados, como por exemplo, o aumento do tamanho e da ramificação das cadeias *N*-ligadas e alteração da constituição dos oligossacarídeos. Estas alterações são devidas a mudanças na expressão de glicosiltransferases, que alteram a estrutura do núcleo oligossacarídico, como a GlcNAc transferase V que acrescenta resíduos de GlcNAc ramificados através de ligações β 1,6 ou as que estão envolvidas na transferência de resíduos terminais para os oligossacarídeos, como as sialiltransferases e fucosiltransferases.[9][10] Estas alterações levam à expressão de certos epítomos como, por exemplo, antigénios de Lewis e ácido polissíalico (figura 4). A expressão de certos conjuntos de epítomos está associada a certos tipos de cancro. Estas mudanças contribuem diretamente para o progresso do cancro, a formação de tumores sólidos e muitas vezes estão associadas com fases específicas do seu desenvolvimento. [11] [12]

Uma alteração relevante na glicosilação é o aumento de resíduos de ácido siálico ligados a resíduos de galactose por ligações α 2,6. Esta alteração existe em 90% dos cancros e ocorre devido à sobreexpressão da enzima que transfere resíduos de ácido siálico para resíduos de galactose por ligações α 2,6. O aumento de resíduos sialilados está associado com um aumento do potencial invasivo e metástico que se pensa estar associado com uma diminuição da adesão aos

componentes extracelulares da matriz, especialmente da fibronectina.[13] Para além disso, o ácido siálico também está envolvido na interação das células cancerígenas com outras células e na adesão das células cancerígenas a determinadas selectinas permitindo a sua motilidade e pensa-se que está envolvido na regulação do crescimento. [14]

A ramificação 1,6 em cadeias N-ligadas (figura 3) também está relacionada com o progresso do cancro e potencial maligno. Nesta ramificação ocorre a ligação de um resíduo de GlcNAc a um resíduo de manose já ligado a GlcNAcGal. Acredita-se que esta transformação facilita a invasão através de membranas. Neste caso a GlcNAc transferase V está sobreexpressa e é responsável por esta atividade. [9][11]

O ácido polissialílico é um polímero linear de resíduos de ácido siálico constituído por 10 a 50 unidades de ácido siálico (figura 4). O ácido siálico costuma ser um resíduo terminal, mas neste caso faz parte da constituição do núcleo oligossacarídico do glicano. O ácido polissialílico também existe em células não tumorais, mas a sua expressão restringe-se às moléculas de adesão N-CAM e às subunidades α dos canais de sódio no cérebro. As moléculas N-CAM são essenciais para controlar a adesão entre células e entre as células e a matriz. A presença de cadeias longas de ácido polissialílico provoca o enfraquecimento de interações entre as células e está relacionada com a ativação da metástase. Estas moléculas são frequentes em cancros do pâncreas, da mama, no pulmão, no cérebro e na leucemia. [9][10] Os antígenos de Lewis são originados pela adição de resíduos de fucose a cadeias principais de glicanos e são expressos apenas por células tumorais. Estes antígenos também podem possuir resíduos de ácido siálico terminais constituindo antígenos sialil Lewis (figura 4). O conjunto destas moléculas regula o processo de metástase estando envolvidas na extravasão de células para os capilares e na adesão de células cancerígenas a tecidos endoteliais. São característicos de cancros do pâncreas, ovários, colon, da mama, do pulmão, entre outros.[9][15]

Outras alterações típicas em células cancerígenas prendem-se com um aumento da expressão de gangliósidos (lípidos ligados a oligossacarídeos) e de mucinas (glicoproteínas com oligossacarídeos O-ligados). [10] Apesar de se verificarem mudanças significativas na glicosilação

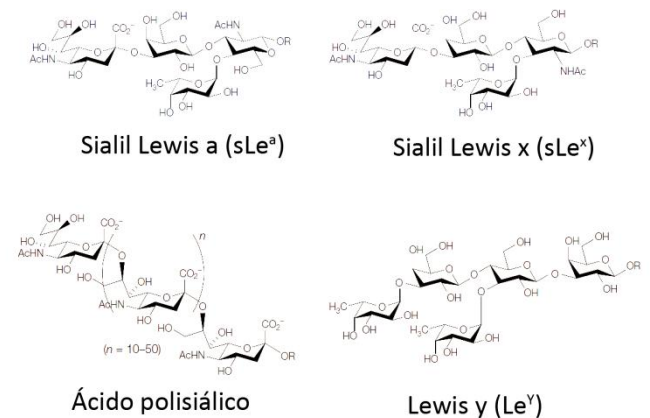


Figura 4- Exemplos de polissacarídeos envolvidos no cancro[9]

das células tumorais é possível constatar que os tecidos malignos são caracterizados por um conjunto de transformações na glicosilação e não é possível associar uma única alteração à transformação de células normais a cancerígenas.

O estado de glicosilação aberrante permite que as células tumorais não sejam reconhecidas pelo sistema imune como não-normais, permitindo assim a sua sobrevivência. Dennis *et al* mostraram que as células imunes NK (*natural killer*) são capazes de detetar e matar células tumorais quando os oligossacarídeos da superfície celular eram incompletos ou ricos em manose (high-mannose-com pelo menos cinco resíduos de manose). Desta forma, ao inibir as várias enzimas envolvidas no processo de glicosilação é possível fazer com que as células cancerígenas apresentem um padrão de glicosilação tal que favoreça a sua eliminação pelo sistema imune.[16]

1.4-Golgi α -manosidase II

A Golgi α -manosidase II (GMII) é uma das enzimas envolvida no processamento de oligossacarídeos N-ligados a proteínas, catalisa a clivagem consecutiva de dois resíduos de manose de $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ a $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ (figuras 5 e 6). A sua importância prende-se com o facto de que catalisa um passo crucial no processamento de proteínas N-glicosiladas, uma vez que a sua inibição leva à diminuição das estruturas oligossacarídicas associadas à progressão do cancro e ao aumento de oligossacarídeo ricos em manose, aumentando a probabilidade do reconhecimento pelo sistema imune.

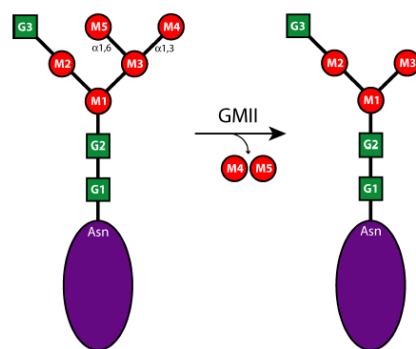


Figura 5-Esquema da reação levada a cabo pela GMII (adaptado de [17])

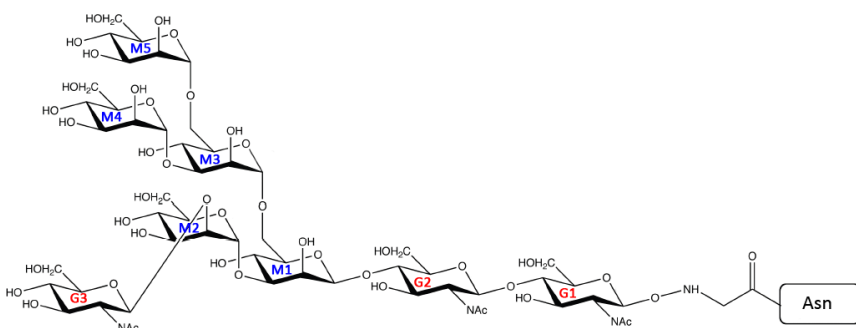


Figura 6- Estrutura do substrato da GMII. G-glucosamina, M-manose, Asn-Asparagina.

Esta enzima está localizada no complexo de Golgi e é uma proteína transmembranar, possui uma pequena porção N-terminal virada para o citoplasma, um domínio transmembranar e um domínio catalítico C-terminal volumoso que se localiza para o lúmen do complexo de Golgi. [17] Esta enzima possui um íão



Figura 7- Estrutura secundária da parte catalítica da GMII, a rosa está o domínio C-terminal, a amarelo o domínio N-terminal e a azul três hélices α . Código PDB:3CZN

de zinco e elevada especificidade para o substrato, removendo os dois resíduos de manose retendo a configuração anomérica. O primeiro resíduo a ser clivado é o resíduo de manose 1,6 ligado, seguido do resíduo 1,3. [17]. Relativamente à parte catalítica da enzima, há um domínio N-terminal que possui uma estrutura α/β , i., possui onze folhas β quase todas paralelas rodeadas por dezasseis α -hélices. Aqui situa-se o local ativo onde está localizado o íão de zinco que

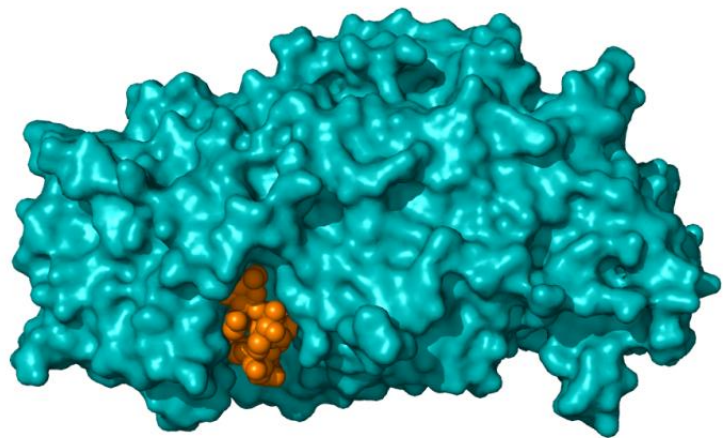


Figura 8- Estrutura da GMII, com GlcNAcMan₅GlcNAc ligado. A face convexa está para cima e a plana para baixo. Código PDB:3CZN

participa na catálise (figura 7). Esta parte é glicosilada com um resíduo de GlcNAc e possui dois resíduos de cisteína que formam pontes dissulfureto. O domínio C-terminal possui dois domínios semelhantes às imunoglobulinas, que possuem apenas folhas β anti-paralelas e um conjunto de três α -hélices juntas que está entre a parte anterior. A GMII possui uma face planar e outra face convexa. O centro ativo localiza-se na face plana e na face convexa (figura 8) existe um poro com 20Å de comprimento e de diâmetro, cujos resíduos possuem elevada mobilidade e a sua função ainda se desconhece.[18]

O centro ativo possui uma carga global negativa e divide-se em três secções: o local catalítico, o sítio de holding e o local de ancoragem. O local catalítico possui um ião de zinco pentacoordenado por dois resíduos de histidina, dois resíduos de aspartato uma molécula de água (quando está vazio). Esta geometria é estabilizada por pontes de hidrogénio com outros resíduos e moléculas de água. Neste local liga-se o resíduo de manose M5 (à esquerda) (figura 9)

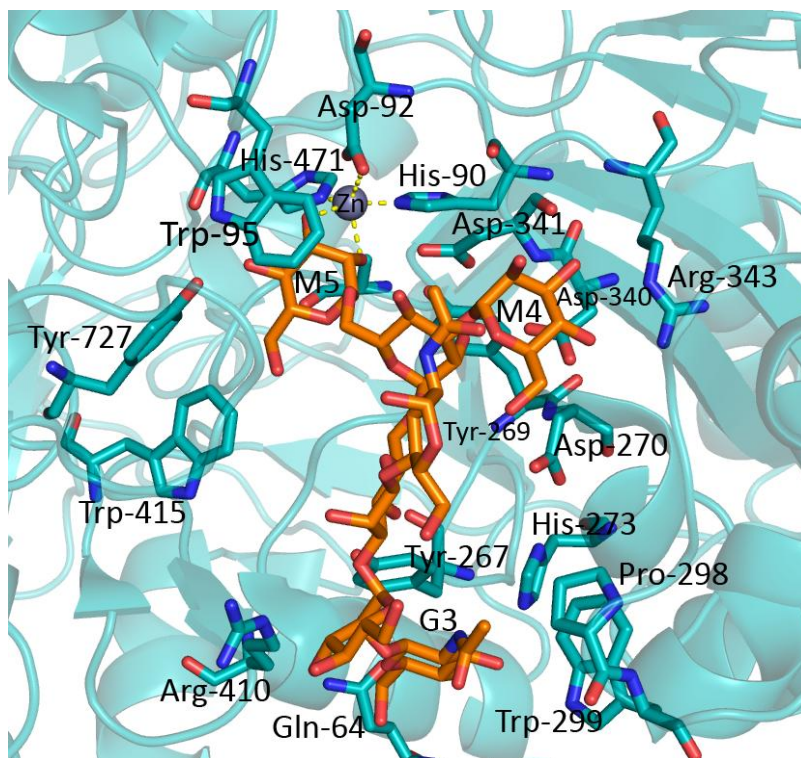


Figura 9- Centro ativo da GMII, com GlcNAcMan₅GlcNAc, M4 e M5 são os resíduos de manose numerados como na fig.6, que se ligam nos locais catalítico, de holding e de ancoragem respectivamente.

ligado ao átomo de zinco através dos grupos hidroxilo nas posições 2 e 6, também interage por pontes de hidrogénio com os resíduos de tirosina 727 e 269, histidina 471 e aspartato 472 e realiza interações π -stacking com um resíduo de triptofano 95. No local de *holding* (à direita) liga-se o resíduo de manose M4 (fig.9) que faz pontes de hidrogénio com a arginina 343. No sítio de ancoragem, liga-se um resíduo de GlcNAc G3 (em baixo à direita)(fig.9) que faz pontes de hidrogénio com o resíduo de tirosina 267 e histidina 273 e interações π -stacking com o resíduo de tirosina 267. O resíduo de GlcNAc na posição de ancoragem é crucial para a actividade uma vez que faz com que o resíduo M4 se ligue ao local de *holding* e o resíduo de manose M5 ao local catalítico. O mecanismo de hidrólise destas ligações é semelhante ao mecanismo das restantes hidrolases glicosídicas, mas possui um catião de zinco e o centro activo é diferente. Acredita-se que o ião de zinco tem como funções a distorção do substrato e a estabilização do estado de transição. O resíduo de aspartato 204 faz um ataque nucleofílico formando um intermediário covalente, que passa por um estado de transição com carga positiva oxocarbénio (figura 10). O resíduo de aspartato 341 remove um protão de uma molécula de água e ião hidroxilo ataca o carbono 1 do resíduo de manose M5 e este é libertado. Após a libertação deste resíduo de manose, há um rearranjo do substrato de forma a que o próximo resíduo de manose a ser clivado (M4) se posicione no local de clivagem.

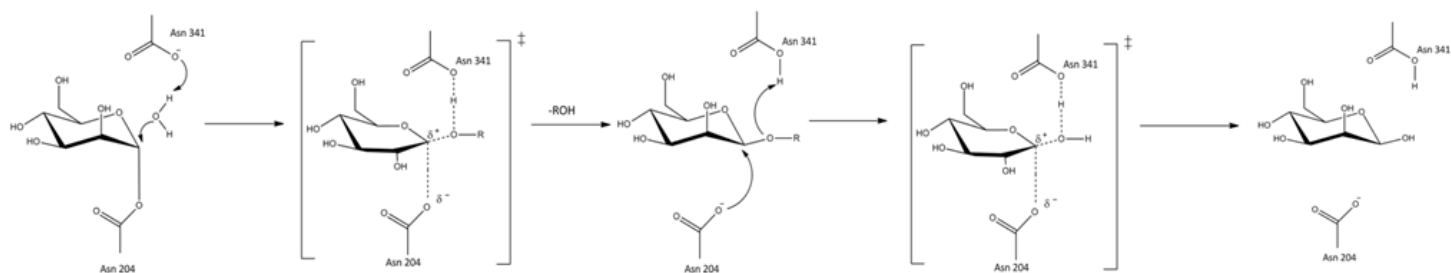


Figura 10- Mecanismo da reação de hidrólise dos resíduos de manose executada pela GMII. Entre parêntesis está o estado de transição oxocarbênico.

A clivagem do segundo resíduo de manose ocorre de forma idêntica à clivagem do primeiro. O posicionamento do substrato é facilitado pelo local de ancoragem uma vez que os resíduos de histidina 273 e aspartato 270 presentes nesse local são essenciais para controlar uma rede de pontes de hidrogênio que se estende até ao local catalítico e coloca o resíduo de tirosina 269 na orientação favorável para a ligação ao substrato. [18][19][20]

1.5-Inibição da GMII

A inibição da GMII provoca o aparecimento de glicoproteínas com um processamento incompleto, que possuem $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$. Existem também inibidores para outras glicosidases que realizam o processamento de açúcares. Os inibidores mais comuns destas enzimas são geralmente alcalóides polihidroxilados que são extraídos de fontes naturais, como piperidinas, pirrolidinas, indolisinas, pirrolidizinas e nortropanos polihidroxilados (figura 11). [21] Estes compostos atuam mimetizando ou carga ou a forma do estado de transição oxocarbênico. [22]

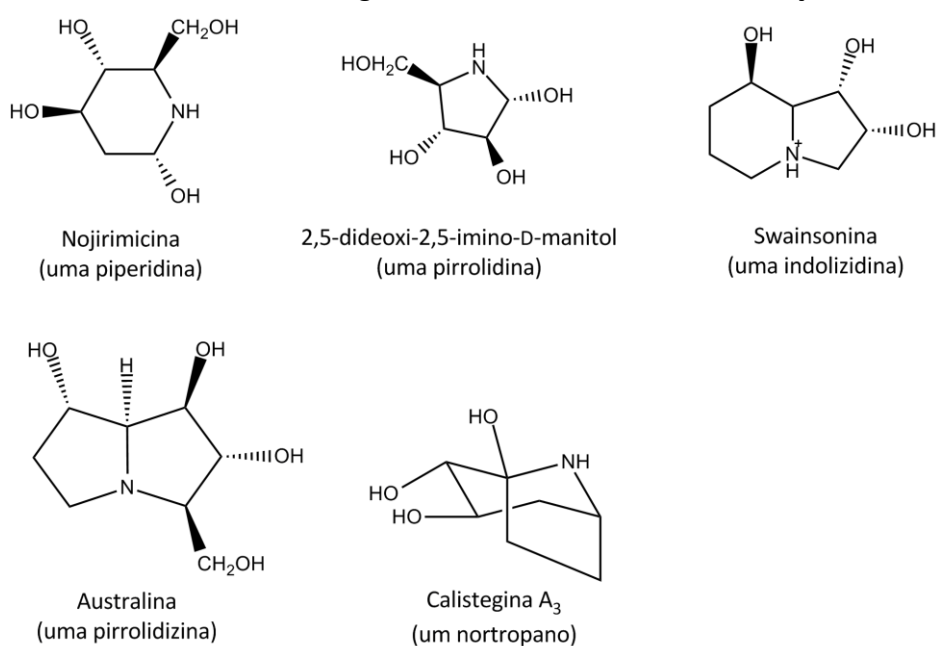


Figura 11- Exemplos de alcalóides naturais de várias classes e que inibem glicosidases.

Sabe-se que a GMII é inibida por várias moléculas desse género, que são inibidores competitivos, como as manostatina A, que pode ser isolada a partir do microrganismo *Streptoverticillium verticillus* e que são ciclopentano-aminas e acredita-se que mimetiza o estado de transição devido à conformação do anel de manose.[23] Porém o inibidor mais conhecido da GMII é a swainsonina.

A swainsonina é uma indolisina isolada das plantas *Swainsona canescens*, *Castanospermum australe*, de algumas espécies dos géneros *Astragalus* e *Oxytropis*, sendo também produzida pelo fungo *Rhizoctonia leguminicola*. A ingestão das plantas anteriores por gado nos Estados Unidos e na Austrália provocou a sua morte causando prejuízos avultados.[24] Pensa-se que a swainsonina mimetiza a carga positiva do estado de transição, uma vez que o nitrogénio está protonado a pH fisiológico.[22][25] A swainsonina é mais potente do que os outros inibidores conhecidos de glicosidases e para além disso a sua acção anti-cancerígena é muito extensa, uma vez que não apenas inibe a formação de oligossacarídeos complexos reduzindo a capacidade de metástase e de crescimento de tumores, mas estes efeitos perduram após a sua administração uma vez que provoca a ativação e proliferação de células *natural killer* (NK), linfócitos T e macrófagos, que têm como função a apresentação de antigénios, produção de citocinas, vigilância imune e atividade citocida contra células tumorais. Também se acredita que estimula a produção de células de medula óssea e que interage sinérgicamente com citocinas como o TNF- α e que suprime a atividade de metaloproteases essenciais para a metástase e invasão de tecidos. A swainsonina é solúvel tanto em água como em lípidos e assim difunde-se eficazmente para os tecidos. [26][27]

Os testes clínicos de fase I mostraram que o tratamento com swainsonina administrada intravenosamente melhorou o estado clínico de pacientes com cancro, verificando-se mesmo diminuições da dimensão da massa tumoral. Estes testes provaram que possui baixa toxicidade e boa tolerância e que se administrada doses elevadas ou frequentemente pode provocar repressão do sistema imune. [28] Porém, os testes de fase II mostraram que a administração de swainsonina apenas estabilizou a doença na maior parte dos casos, não havendo um efeito terapêutico significativo e apenas alguns indivíduos mostraram progressos e outros mostraram sintomas de toxicidade neurológica. Outros efeitos secundários registados incluem fadiga, anorexia e dores abdominais.[29]

A swainsonina é seletiva para a Golgi α -manosidase II. Contudo, também inibe a α -manosidase lisossomal (ML) provocando alguns efeitos secundários, que no caso anteriormente referido, acredita-se que levaram à morte de gado. A α -manosidase lisossomal é uma enzima existente nos lisossomas envolvida no catabolismo de proteínas N-ligadas havendo a clivagem de ligações de resíduos de manose α -1,2, α -1,3 e α -1,6, com retenção da configuração do carbono

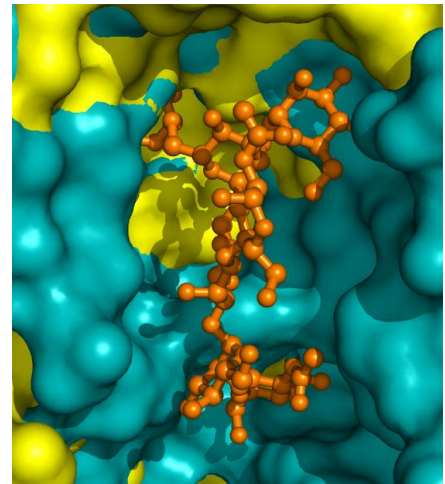


Figura 12-Ligação de GlcNAcMan₅GlcNAc à GMII (PDB:3CZN) em azul e LM (PDB:17OD) a amarelo.

anomérico.[30] A GMII e a ML são enzimas muito semelhantes, uma vez que o local ativo contém um íon de zinco com uma coordenação semelhante, o local catalítico é bastante conservado entre as duas enzimas. De facto, verifica-se que tanto o tamanho e a forma do local catalítico são semelhantes e todos os aminoácidos indispensáveis para a catálise como para a ligação do substrato estão posicionados no mesmo local e na mesma conformação. Porém, nos locais de ancoragem e *holding*, as sequências de ambas as enzimas são bastante diferentes conduzindo a grandes diferenças no tamanho e forma do local ativo. Assim, a ML não possui esses locais, resultando numa fenda do centro ativo muito mais larga. Desta forma, é possível tirar partido dos locais de *holding* e de ancoragem para alcançar inibidores com estruturas que permitam alcançar seletividade entre as duas enzimas.[19]

A inibição da ML leva à acumulação de oligossacarídeos não degradados nos lisossomas gerando sintomas similares à α -manose em que tem origem genética. Nesta doença há falha da ML e as funções celulares são comprometidas, através de mecanismos que ainda se desconhecem.[31][7]

Recentemente, outros inibidores estão a ser criados com base na swainsonina como tioswainsoninas ou swainsoninas substituídas em várias posições.[25] Fiaux *et al* também criaram vários derivados de pirrolidina que mimetizam a conformação do anel das manostatinas.[32]

2-Metodologias de modelação molecular

A modelação molecular utiliza modelos matemáticos e princípios da física para estudar o comportamento de sistemas moleculares através de técnicas computacionais e teóricas. Assim, é possível simular e visualizar o comportamento de moléculas em diferentes condições. [33]

As técnicas de modelação molecular permitem medir propriedades e prever fenómenos impossíveis ou dispendiosos quando realizados experimentalmente. Permitem, acima de tudo, vislumbrar a realidade molecular e quantificar propriedades que ocorrem em escalas temporais ou espaciais muito pequenas, que é o caso dos fenómenos bioquímicos. Assim, é possível acompanhar os fenómenos moleculares e obter não apenas os valores médios das propriedades, mas acompanhar a sua evolução ao longo do tempo.[33]

Neste trabalho recorreu-se a técnicas de modelação molecular com o objetivo de desenvolver novos derivados da swainsonina e para avaliar a sua atividade e seletividade.

As técnicas de modelação molecular utilizadas neste trabalho foram: cálculos de protonação de caldeias laterais de aminoácidos ionizáveis, simulações de dinâmica molecular/mecânica molecular (DM/MM), análise de componentes principais, cálculos de energia livre por integração termodinâmica (IT) e por MM-PBSA e ainda *docking* molecular.

2.1-Simulações de dinâmica molecular/mecânica molecular (DM/MM)

As simulações de DM/MM consideram as moléculas como sistemas que obedecem às leis da física clássica. Desta forma, os átomos que constituem as moléculas são considerados como partículas que se movem de acordo com as leis da mecânica clássica. Assim, a 2ª equação de Newton (eq. 1) é resolvida para todos os átomos do sistema em cada instante:

$$F_{(i)} = m_{(i)} \times a_{(i)} \quad (1)$$

Onde F_i é a força que atua na partícula i pelo resto do sistema, m_i é a massa da partícula i e a_i é a aceleração correspondente à partícula i . Esta força também pode ser calculada pelo gradiente da função de energia potencial relativamente à posição da partícula (eq. 2).

$$F_{(i)} = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (2)$$

A energia potencial (eq.3) de uma partícula é dada pela soma do potencial associado às interações ligantes ($V_{int. ligantes}$) e às interações não ligantes ($V_{int. não ligantes}$). [34]

$$V = V_{int. ligantes} + V_{int. não ligantes} \quad (3)$$

Estes termos são calculados através de um campo de forças. Um campo de forças é um conjunto de funções e de parâmetros usados para calcular a energia potencial e para modelar todas as interações ligantes e não ligantes. Estas funções e parâmetros são obtidos principalmente através de estudos experimentais e de mecânica quântica em moléculas mais pequenas e são aplicados a outras moléculas de interesse. Em DM/MM, estas funções seguem os princípios da mecânica clássica e não os da mecânica quântica. [34] Assim, os átomos são considerados no estado fundamental. O *software* usado para simulação de DM/MM possui vários campos de forças. Nas simulações de DM, as moléculas são caracterizadas através de topologias. As topologias possuem os parâmetros necessários para calcular as funções de energia potencial, tais como a carga dos átomos, o tipo de átomo, as constantes de ligação, distâncias, ângulos, diedros e pares de átomos excluídos dos cálculos.

$$V_{int.ligantes} = V_{ligações} + V_{ângulos} + V_{diedros\ impróprios} + V_{diedros\ próprios} \quad (4)$$

$$V_{ligações}(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (5)$$

As interações ligantes contemplam as ligações, ângulos e diedros próprios e impróprios (eq. 4). $V_{ligações}$ descreve o estiramento entre dois átomos ligados entre si i e j (eq.5), em que k_{ij}^b é a constante de força da ligação, r_{ij} é a distância entre os dois átomos i e j e b_{ij} é o comprimento de referência da ligação, i.e, é o comprimento de ligação quando os outros parâmetros são zero. Este potencial é considerado harmónico.

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ij}^0 (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (6)$$

A vibração dos ângulos também pode ser descrita por um potencial harmónico (eq. 6) em que θ_{ijk} é o ângulo formado entre os átomos i, j e k e θ_{ijk}^0 é um ângulo de referência (figura 13).

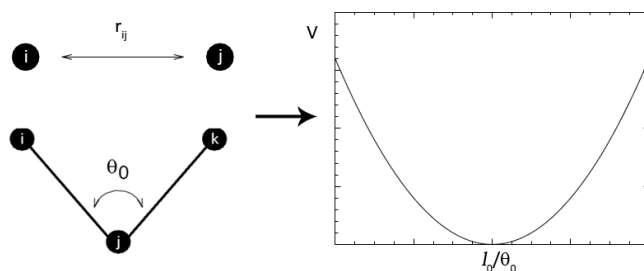


Figura 13- Potencial harmónico descrito pelos movimentos dos átomos em ligações e ângulos.

$$V_{di}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{\xi} (\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \quad (6)$$

$$V_{dp}(\phi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{\phi} (1 + \cos(n\phi - \phi_s)) \quad (7)$$

Os diedros impróprios referem-se a interações entre quatro átomos i, j, k e l e consistem em ângulos entre dois planos constituídos por dois conjuntos de átomos, estas interações são importantes para manter a quiralidade das moléculas e manter a planaridade de grupos. Também obedecem a um potencial harmónico (eq.6).

Os diedros próprios referem-se também a interações entre quatro átomos i, j, k e l e modelam as torções das ligações. Uma das formas de modelar diedros próprios é através de um potencial periódico. ϕ é o ângulo de torção e ϕ_s o ângulo de referência (eq.7).[34]

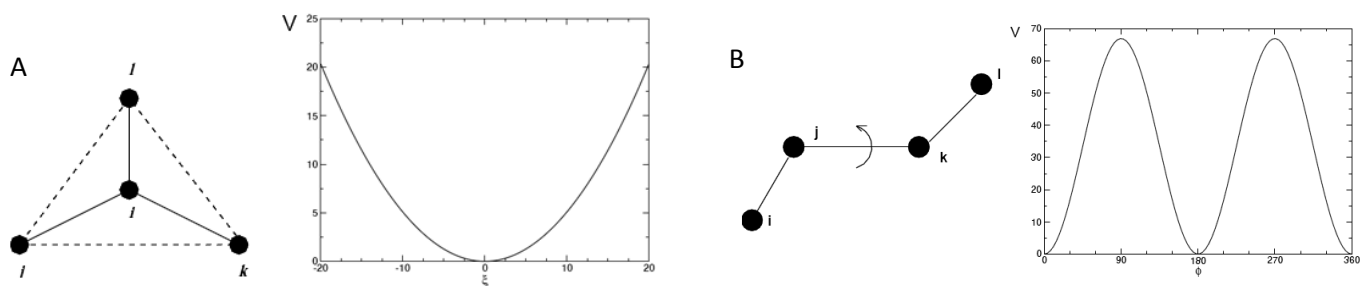


Figura 14-Potenciais descritos pelos diedros impróprios (A) e diedros próprios (B).

A energia das interações não ligantes é dada pela soma do potencial das interações de van der Waals e interações electrostáticas (eq.8).

$$V_{int. \text{ não ligantes}} = V_{vdW} + V_{electrostático} \quad (8)$$

$$V_{LJ}(r_{ij}) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (9)$$

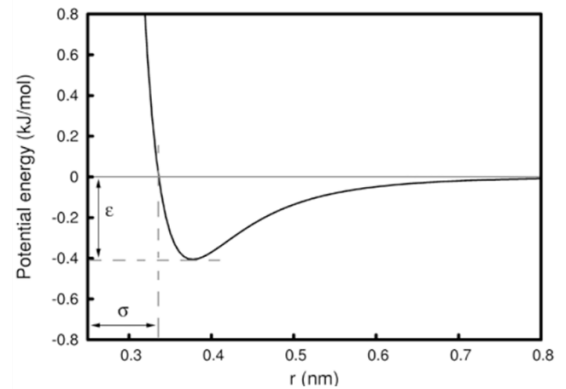


Figura 15-Potencial de Lennard-Jones

A energia correspondente às interações de van der Waals é frequentemente calculada através da função 12-6 de Lennard-Jones, que calcula as interações entre dois átomos (eq.9). Estas interações são constituídas por uma componente repulsiva $(1/r)^{12}$ que representa a repulsão entre átomos devido à sobreposição de orbitais e a componente atrativa $(1/r)^6$ que representa as forças atrativas a longa distância. À medida que a distância entre os átomos aumenta, o potencial existente diminui. O parâmetro ϵ é a distância entre os átomos para a qual a derivada da função é zero. O parâmetro σ é a distância para a qual a energia é zero. As interações de van der Waals são a curta distância e pode-se usar uma distância de *cut-off*, i.e, uma distância a partir da qual as interações são truncadas, porque o potencial sentido não é significativo e assim também é possível acelerar os cálculos. [34] As interações de van der Waals são calculadas para átomos que estão pelo menos a três ligações de distância (o terceiro vizinho – $i+3$) de um átomo i , porque as interações entre os dois primeiros átomos são de natureza quântica, mas são modelados através dos termos das ligações ou dos ângulos. Na topologia, pode haver uma secção especial para discriminar os átomos usados para os cálculos - a secção de *pairs*. [35]

Para calcular o potencial resultante das interações electrostáticas, utiliza-se a lei de Coulomb para calcular as interações entre duas partículas carregadas (eq.10). As interações electrostáticas são de longo alcance. Desta forma, a interação decai a um ritmo muito lento e têm um alcance muito longo, podendo ser maior que metade do comprimento da caixa.[34] Um dos métodos usados para tratar estas interações é o método PME (*Particle mesh Ewald*) em que o sistema é rodeado por um número infinito de cópias de si próprio e assim há a soma da energia total da energia electrostática de todas as partículas de todas as cópias do sistema.[34]

$$V(r) = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (10)$$

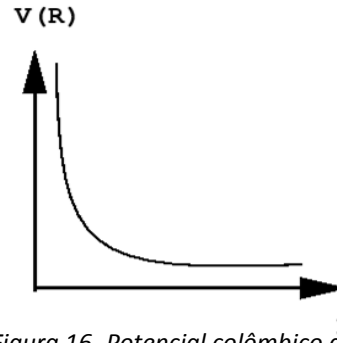


Figura 16- Potencial colômbico gerado por duas partículas de carga oposta.

As interações colômbicas são calculadas como a soma de interações entre pares de cargas pontuais. q_i é a carga da partícula i e q_j é a carga da partícula j . r é a distância entre as duas partículas e ϵ é a permissividade elétrica no meio. N_A e N_B são as cargas pontuais de cada uma das moléculas.

Através do cálculo da energia potencial é possível obter as forças que atuam em cada átomo e assim resolver as equações do movimento de Newton. Essas equações são integradas para originar uma trajetória que reflete o movimento dos átomos ao longo do tempo. Um dos métodos para este fim é o método *leap-frog*. Este algoritmo integra as equações de movimento em muitos intervalos de tempo δt .

$$v\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) = v\left(t - \frac{\delta t}{2}\right) + \frac{F(t)}{m} \delta t \quad (11)$$

$$r(t + \delta t) = r(t) + v\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) \delta t \quad (12)$$

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) + v\left(t - \frac{\delta t}{2}\right) \right] \quad (13)$$

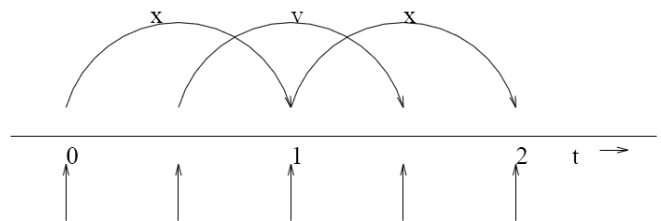


Figura 17- Esquematização do algoritmo leap-frog. Adaptado de [35]

Neste método as posições e as velocidades estão desfasadas, utiliza-se as posições r no instante t e as velocidades v no instante $t - \frac{\delta t}{2}$. Começa-se por calcular as velocidades no instante $t + \frac{\delta t}{2}$, usando a velocidade em $t - \frac{\delta t}{2}$, no caso de $t=0$ utiliza-se velocidades iniciais atribuídas aleatoriamente através de uma distribuição de Boltzmann (eq.11). As posições em $t + \delta t$ são calculadas usando as posições em t e as velocidades em $t + \frac{\delta t}{2}$ (eq.12). As posições são calculadas a partir das velocidades à medida que o tempo avança. A velocidade é atualizada usando a força no instante t . As velocidades em t são calculadas a partir de $t - \frac{\delta t}{2}$ e $t + \frac{\delta t}{2}$ (eq.13) (figura 17).

As simulações de DM utilizam também outros algoritmos que permitem o controle da temperatura e da pressão. Um algoritmo que permite o controle da temperatura é o algoritmo velocity rescale. Neste método, as velocidades de todas as partículas são multiplicadas por um factor α , calculado quando se obriga a que a energia cinética total do sistema seja igual à energia cinética média para a temperatura em qua se realiza a simulação.

As constraints permitem eliminar movimentos de alta frequência entre átomos que não são relevantes para o movimento global da molécula e que são de natureza quântica. As constraints são principalmente utilizadas em ligações, mas também para ângulos e diedros, um exemplo destes algoritmos é o LINCS. Estes métodos permitem usar um δt de integração maior. Existem também position restraints que se podem aplicar aos átomos para que estes se movam em torno de uma posição de referência e são usadas para evitar movimentações drásticas de alguns átomos. Na prática aplica-se um potencial a essas partículas. Também existem restraints para ângulos, diedros e até ligações.[34][35]

Quando se simula um sistema molecular é necessário usar condições periódicas de fronteira. O sistema é rodeado por cópias de si mesmo. Assim, é possível simular um pequeno numero de partículas de uma forma mais realista e que não cria artefactos nos cálculos. Desta forma, o meio envolvente não é o vácuo, mas sim cópias do sistema (figura 18).

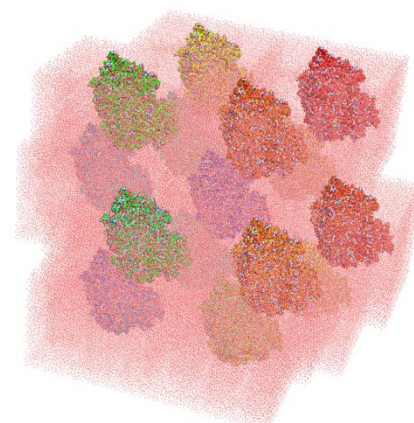


Figura 18- GMII com condições periódicas de fronteira.

2.2-Métodos de simulação baseados em não-amostragem

Também quando se simula um sistema deve-se realizar uma minimização de energia primeiro para remover choques estereoquímicos e relaxar as ligações químicas e ângulos até atingir um mínimo de energia local ou global. Utilizam-se dois métodos para fazer uma minimização de energia: *steepest descent* e *conjugate gradient*, que mudam gradualmente as coordenadas dos átomos para o sistema ficar mais perto do mínimo. O método *steepest descent* é usado para quando o sistema ainda está longe do mínimo de energia, enquanto que o método *conjugate gradient* é mais eficaz para quando o sistema está mais perto do mínimo.

$$r_{n+1} = r_n + \frac{F_n}{\max(|F_n|)} h_n \quad (14)$$

Usam as forças (F_n) e energia potencial para cada átomo e vai realizando a minimização de forma iterativa em que o desvio aplicado (h_n) aos átomos é ajustado conforme a energia potencial do sistema subiu ou desceu. r é um vetor posição de um átomo. Caso $V_{n+1} < V_n$ as novas posições são aceites e $h_{n+1} = 1.2h_n$ se $V_{n+1} \geq V_n$ as novas posições são rejeitadas e $h_n = 0.2h_n$ (eq.14). Os algoritmos param quando as alterações na energia potencial entre dois passos consecutivos são inferiores a um determinado valor definido ou quando completam um número de passos definidos pelo utilizador.

2.3-Inicialização de um sistema

Quando se realiza uma simulação de dinâmica molecular de um sistema começa-se por construir o mesmo, utilizando uma estrutura da molécula desejada que pode ser obtida através de cristalografia de raios-x ou de RMN ou mesmo por modelação por homologia com outras moléculas, insere-se a molécula numa caixa e preenche-se o restante espaço com moléculas de solvente. Nesta fase também se definem as condições em que a simulação ocorre. Depois, realiza-se uma minimização de energia para colocar o sistema num mínimo de energia. A seguir, também se pode relaxar ainda mais o sistema, para evitar possíveis colisões e rearranjos drásticos durante a simulação fazendo relaxações, i.e, simulações de pouco tempo utilizando position restraints em diferentes átomos do sistema em diferentes fases. Por fim, realiza-se a simulação de DM propriamente dita sem constrangimentos em que há amostragem de estados. Há uma primeira fase até o sistema estar em equilíbrio, por isso deve-se ter atenção ao tempo de simulação realizado, porque as propriedades a analisar devem ser obtidas quando o sistema já está em equilíbrio. No final obtêm-se os resultados sobre a forma de uma trajectória em que se registam as coordenadas de todos os átomos e também se obtêm as velocidades e energias das partículas que compõem o sistema, podendo-se realizar a análise dos resultados. (fig.19)

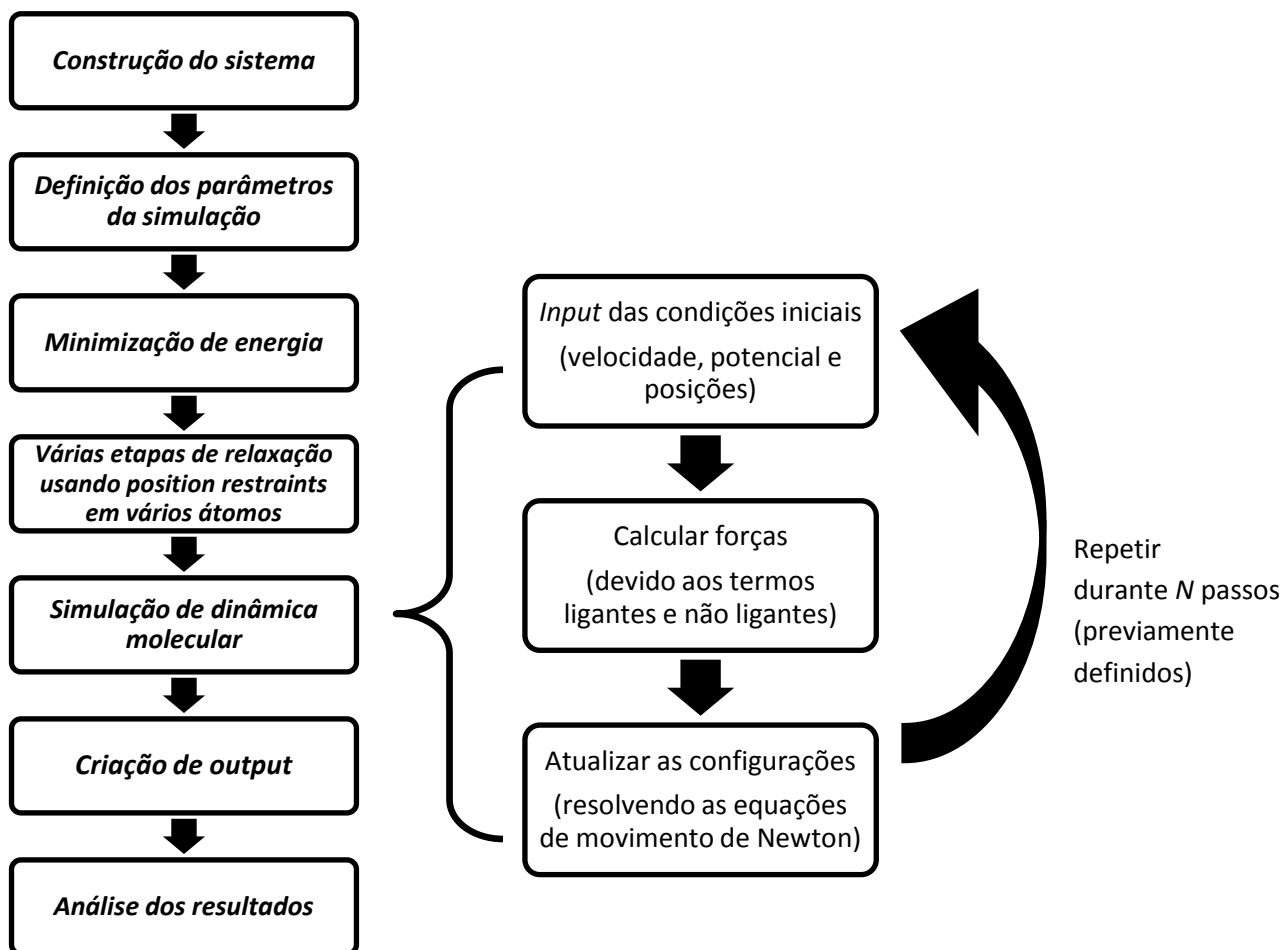


Figura 19- Diagrama de um algoritmo que realiza simulações de dinâmica molecular.

2.4-Cálculos de energia livre

Existem técnicas de modelação molecular que permitem calcular a afinidade de um ligando para uma proteína, através da diferença de energia livre entre dois estados. Exemplos destes métodos são a integração termodinâmica e o *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM-PBSA).

2.4.1- Integração termodinâmica (IT)

No método de IT é possível calcular a energia livre de ligação entre dois estados ligeiramente diferentes e realiza-se a transformação de um estado noutra. Este processo é realizado através de perturbações termodinâmicas em que se cria uma série de estados intermédios que ligam o primeiro e o estado final. Os estados intermédios são criados através de um parâmetro de acoplamento λ , que pode variar entre 0 e 1. Este parâmetro influencia os termos do campo de forças (interações ligantes e não ligantes) e para 0 obtêm-se os termos do campo de forças correspondentes ao estado inicial e para 1 tem-se os mesmos termos correspondentes ao estado final e correspondente energia.

$$\Delta G = \sum_{\lambda} \Delta G_{\lambda} = RT \sum_{\lambda} \ln \left\langle e^{-\frac{U_{\lambda} - U_{\lambda + \Delta\lambda}}{RT}} \right\rangle \quad (15)$$

A energia livre de ligação é calculada pela expressão 15, em que U é a energia total da molécula, T a temperatura e R a constante dos gases. Os estados intermédios não existem na realidade, porém como a energia livre é uma função de estado que só depende dos estados final e inicial é possível usar este método.[34]

A energia livre é calculada a partir da média da derivada do potencial em função da amplitude da perturbação para cada um dos λ empregues e depois calcula-se o integral desse valor em função de λ . Na prática realizam-se uma série de simulações de dinâmica molecular com λ entre 0 e 1. Para calcular a afinidade relativa de dois ligandos no mesmo recetor por IT, usa-se um ciclo termodinâmico como o da figura 20. A

afinidade de ligação do ligando 1 é ΔG_1 e ΔG_2 para o ligando 2. Estas afinidades não podem ser calculados usando modelação molecular porque é impossível obter uma amostragem adequada, por isso, realiza-se a transformação de um ligando noutra em solução (ΔG_3) e na proteína (ΔG_4) e como $\Delta G_1 - \Delta G_2 = \Delta G_4 - \Delta G_3$, é possível calcular a diferença de afinidade entre os ligandos.[34]

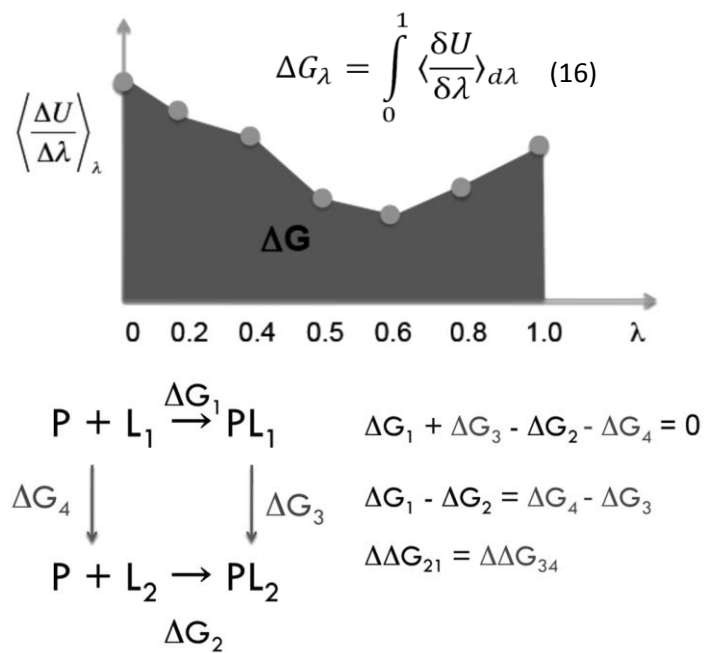


Figura 20- Exemplo de um gráfico e ciclo termodinâmico usado para calcular a afinidade num processo de IT.

2.4.2- MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area)

O método de MM-PBSA já permite calcular a afinidade absoluta de ligação a uma molécula. É considerado um método *end-point*, uma vez que só é necessário o estado final e o estado inicial para calcular a afinidade em contraste com o método de IT em que é necessário utilizar vários estados intermédios.

Este método divide a energia livre em vários termos: termos de solvatação, energia de mecânica molecular e entrópicos (eq.17 a 21).[36]

$$\Delta G = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} + \Delta G_{np} - T \Delta S \quad (17)$$

$$\Delta E_{MM} = E_{MM}^{comp} - (E_{MM}^{prot} + E_{MM}^{lig}) \quad (18)$$

$$\Delta G_{solv} = G_{solv}^{comp} - (G_{solv}^{prot} + G_{solv}^{lig}) \quad (19)$$

$$\Delta G_{np} = G_{np}^{comp} - (G_{np}^{prot} + G_{np}^{lig}) \quad (20)$$

$$\Delta S = S^{comp} - (S^{prot} + S^{lig}) \quad (21)$$

Estes termos são calculados para o complexo, para o ligando e para a proteína sem ligando (forma apo) e cada termo é dado pela diferença da soma do ligando e proteína e do complexo.

A energia de mecânica molecular (ΔG_{MM}) corresponde à energia potencial dada pela energia potencial calculada a partir das interações ligantes e não ligantes como anteriormente descrito. A energia livre de solvatação (ΔG_{solv}) é calculada a partir da equação de Poisson-Boltzmann, que permite obter o potencial electrostático. O potencial electrostático depende das localizações e valores das cargas atómicas, da constante dieléctrica do meio e da força iónica.

$$G_s = \frac{1}{8\pi} \left(\frac{1}{\epsilon_0} - \frac{1}{\epsilon} \right) \sum_{i,j}^N \frac{q_i q_j}{f_{GB}} \quad (22)$$

O modelo Generalized Born é uma aproximação da equação de Poisson-Boltzmann, (eq. 22) que permite cálculos mais rápidos, em que ϵ_0 é a permissividade elétrica no vácuo, ϵ é a permissividade elétrica no meio, q_i e q_j as cargas das partículas i e j respectivamente e f_{GB} é um parâmetro calculado a partir da contribuição energética de cada átomo.[36]

A área de solvatação não polar (ΔG_{np}) é dada pelo perímetro de uma esfera imaginária que percorre a proteína, gerando assim o volume excluído do solvente (figura 21). [37] A entropia pode ser calculada através de uma análise de componentes principais (aproximação quasi-harmônica) e assim a entropia total da molécula é calculada como a soma de vários osciladores harmônicos independentes.[39]

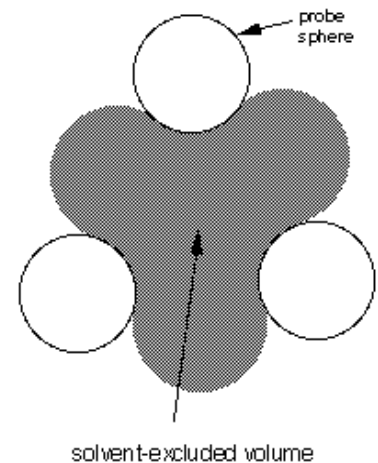


Figura 21- Esquema de cálculo para a área não polar.[38]

2.5-Docking

O método de *docking* permite prever as estruturas de um complexo proteína-ligando, em que o ligando está ligado não covalentemente e permite prever a afinidade de ligação. Desta forma, o processo de *docking* pode ser dividido em duas partes: a procura da melhor conformação ligando-recetor (*posing*) e o cálculo da afinidade de ligação (*scoring*). O objetivo do processo é encontrar o mínimo global do sistema.[34]

O *posing* consiste em ver se uma determinada conformação do ligando encaixa no centro ativo. Para isso, alguns algoritmos fazem mudanças aleatórias na geometria do ligando. Os algoritmos genéticos atuam desta forma, usando os conceitos de mutações para gerar novas

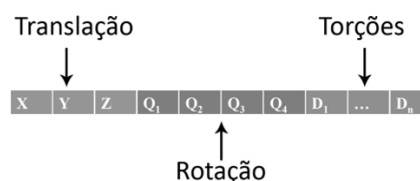


Figura 22- Estrutura de um cromossoma e respectivos caracteres para cada uma das características da molécula.

conformações e de dinâmica populacional. Assim, começa-se por gerar aleatoriamente uma população de conformações possíveis. Cada membro desta população é codificado por um cromossoma, que basicamente é um conjunto de caracteres (*string*) que codifica as características da molécula como o número de torções no ligando, a sua orientação no espaço e rotação e coordenadas que definem a translação (figura 22). As mutações introduzem mudanças aleatórias nestas variáveis gerando novas conformações. O *crossover* também introduz variabilidade nas

strings ao escolher uma posição i na *string*, entre $1 \leq i \leq l-1$, em l é o comprimento da *string*, e trocaram todos os bits entre essas duas posições. Estas operações permitem a geração de uma nova população e com essa população ocorre outra vez um novo ciclo e assim sucessivamente. O algoritmo repete-se até um número predeterminado de conformações ou até atingir uma determinada energia. [34]

O *scoring* consiste em alcançar uma estimativa aproximada da afinidade de ligação para uma determinada conformação. Uma função de *scoring* tem de não apenas identificar qual é a conformação mais provável de uma molécula quando de liga ao recetor, mas também comparar várias conformações entre si, ou mesmo vários ligandos diferentes de uma forma rápida. A energia de ligação tem a contribuição da energia de interação recetor-ligando, a energia interna do ligando, a desolvatação, as mudanças entrópicas, pontes de hidrogénio e interações não polares. A energia interna do ligando e da interação ligando-recetor é dada pela soma das interações de van der Waals e colômbicas, calculadas pelas mesmas expressões anteriormente referidas. Para calcular as interações de Lennard-Jones e colômbicas, utiliza-se uma grelha em que se calcula previamente o potencial da proteína em cada um dos pontos e o *docking* do ligando é realizado contra a grelha. Isto permite que o cálculo seja mais rápido e eficiente.[34]

Através do *docking* é possível realizar uma avaliação rápida de uma quantidade considerável de moléculas como é o caso do screening de fragmentos usando bibliotecas de compostos. Estes fragmentos podem depois ser usados na construção de leads que podem originar drogas.

Estes três métodos permitem calcular a afinidade de ligação. O método de integração termodinâmica é o método mais rigoroso que existe com menor erro possível. Porém, apenas permite calcular a energia relativa entre dois estados, usa bastantes simulações e é computacionalmente exigente. Já o método de MM-PBSA usa apenas duas/três simulações e energias médias de *ensembles* e incorpora termos de solvatação. Porém, as estimativas entrópicas são pobres e as médias dos termos energéticos não incorporam as flutuações energéticas naturais, pode não haver convergência energética e sobrestima a afinidade. O *docking* é um procedimento limitado na medida em que considera o ligando e a proteína rígidos, não considera o solvente explicitamente e considera que as cargas são fixas. Apesar disto, é um método bastante rápido e simples.[34][36]

2.6 Análises PCA (*Principal Component Analysis*)

A análise de PCA permite caracterizar o espaço conformacional de uma molécula. Este método caracteriza-se pela simplificação de um conjunto de dados, reduzindo a sua dimensionalidade mantendo a variabilidade dos dados. PCA transforma um conjunto de variáveis possivelmente correlacionadas num conjunto de variáveis não relacionadas (componentes principais).[40]

Assim, há a redução do número de dimensões de forma a que os estados conformacionais possam ser facilmente visualizados e manipulados.[40]

2.7 Titulação de resíduos com cadeias laterais ionizáveis

Os aminoácidos protonáveis podem ter várias posições de protonação, por exemplo, a histidina possui dois locais passíveis de protonação: os dois azotos, que originam tautómeros diferentes. Estes tautómeros não são equivalentes entre si (figura 23).

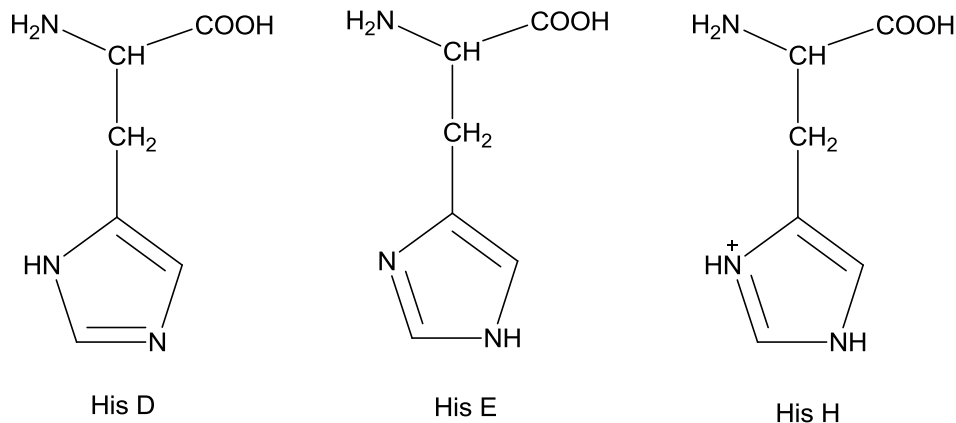


Figura 23-Estrutura dos tautómeros da histidina.

Para este procedimento, realizam-se cálculos electrostáticos em que a molécula é tratada como rígida e dessa forma cada tautómero é tratado de forma rígida e independente, incluindo mesmo os aminoácidos como os que têm cadeias carboxilo ou amina em que podem protonar em posições quimicamente equivalentes, mas para os cálculos electrostáticos, tornam-se não equivalentes, uma vez que os prótons tem orientações diferentes e tornam-se energeticamente diferentes e não interconvertíveis.

Assim cada local tautomérico é dividido em pseudo-locais não tautoméricos, sendo um por tautómero. Dessa forma, cada lisina é dividida em três pseudo-locais, cada aspartato em quatro pseudo-locais e assim sucessivamente. [41][42]

$$\Delta G = -2.3kT \sum_{r \in P} m_r pK_r^{\text{int}} + \frac{1}{2} \sum_r \sum_s (n_r n_s + n_r z_s^* + n_s z_r^*) W_{rs} \quad (23)$$

O estado do sistema resultante pode ser descrito como um vetor $n = (n_1, n_2 \dots n_n)$, (eq. 23) onde $n_i=0$ ou 1 que indica se o local está vazio ou ocupado. $\Delta G(n)$ é a energia livre associada à reação de protonação $0 \rightarrow n$ e $n = \sum_r n_r$ é o número total de protões existentes. z_i^0 é a carga do local i na forma desprotonada, pK_i é o pK_a do local quando os outros são mantidos neutros e W_{ij} é o potencial obtido nos cálculos electrostáticos ($W_{rs} = W_{sr}$ e $W_{rr}=0$). P é o conjunto de locais protonáveis.[41-43]

$$n_i = (1 + z_i^0)(1 - \tau_i) + \sum_{r \in \bar{i}} m_r \quad (24)$$

Portanto, a ocupação de um local tautomérico i pode ser obtido a partir dos estados de ocupação de todos os pseudo-locais que pertencem àquele local (eq.24). [41-43]

3. Metologias utilizadas

3.1 Titulação de resíduos com cadeias laterais ionizáveis

3.1.1 Criação da estrutura inicial

Começou-se por remover todos os ligandos da estrutura cristalográfica. De seguida, adicionou-se átomos de hidrogénio à estrutura de forma a gerar todos os protões necessários para os cálculos tautoméricos. Considerou-se como resíduos protonáveis os resíduos de arginina, lisina, aspartato, glutamato, histidina, serina, tirosina, cisteína e os grupos N e C terminais e moléculas de água posteriormente selecionadas. Estas operações foram realizadas utilizando o software Gromacs-4.5.4 e o campo de forças Gromos54a7. Utilizando esta estrutura selecionaram-se apenas as moléculas de água que tivessem uma acessibilidade menor que 0.5, i.e, excluíram-se dos cálculos todas as moléculas de água que tivessem menos de 50% de acessibilidade, i.e, que não estivessem rodeadas por menos de 50% da superfície da proteína, utilizando o programa ASC.[44]

3.1.2 Cálculos de electrostática contínua (EC)

Os cálculos de EC permitiram calcular a energia livre de protonação (que foi usada posteriormente para calcular a probabilidade da existência de um estado protonado através de cálculos de Monte Carlo. Foram realizados usando o conjunto de aplicações MEADTools 1.5 e o software MEAD 2.2.9. Os raios atómicos usados foram os dados pelos mínimos de energia de Lennard-Jones mais $2RT$, sendo R a constante dos gases nobres e T a temperatura. As cargas parciais foram adotadas do campo de forças Gromos54a7. O raio da sonda do solvente foi de 1.4 \AA , utilizou-se um raio de exclusão do solvente de 2.0 \AA , uma força iónica de 300mM e uma temperatura de 310K . O processo de *focusing* usado consistiu no uso de uma grelha com o espaçamento de 1.0 \AA e centrada no centro geométrico do sistema e duas grelhas centradas noutros pontos de interesse com os espaçamentos de 0.5 \AA e 0.25 \AA . A constante dielétrica usada para o solvente foi de 80, correspondendo à constante dielétrica da água e assumiu-se 20 para a proteína.[45][46]

3.1.3 Cálculos de Monte Carlo

Para calcular a probabilidade de existência dos estados de protonação utilizou-se um método de Monte Carlo implementado no software PETIT em que há amostragem do conjunto de estados disponíveis do sistema [43]. O conjunto de valores de pH analisados oscilou entre 0 e 20 com intervalos de 0.2 unidades. A temperatura considerada foi de 310K. As médias foram calculadas usando 10^5 passos e as correlações 106 passos da rotina de Monte Carlo.[41][42]

3.2 Simulações de dinâmica molecular da proteína apo e complexos proteína-ligando

Começou-se por escolher a estrutura correspondente à forma apo da GMII na base de dados Protein DataBank (PDB) com o código 3BUB. As estruturas dos complexos proteína-ligando foram selecionadas tendo em conta os seguintes critérios de exclusão:

- Baixa resolução
- Grau de complexão da estrutura (com todos os átomos pertencentes à estrutura)
- Ligandos com núcleos distintos e cadeias laterais diferentes entre si

Seguindo estes critérios, as estruturas experimentais selecionadas foram, com os códigos PDB: 3DDF, 3DX4, 2OW6, 3BLB, 1HXK, 21FA, 3D51, 3EJU e 3D4Y.

Começou-se por parametrizar os ligandos usando os parâmetros do campo de forças Gromos54a7 e depois usou-se o programa PRODRG [47] para criar as topologias dos ligandos mais complexos e usou-se o programa Gamess, que o usa método quântico de Hartree-Fock com o conjunto de funções 6-31G(d) para otimizar a geometria. A geometria otimizada e o potencial quântico electrostático foram usadas para calcular as cargas parciais de cada átomo através do método de *fitting* RESP.[48][49] Usou-se o software GROMACS 4.5.4 com o campo de forças Gromos54a7. Para realizar a simulação e parametrizar automaticamente a proteína. Usou-se o algoritmo PME para tratar as interações colômbicas com um cutoff de 0.9 nm e um espaçamento na grelha de 1.2 nm, com uma ordem de PME de 4. Para as interações de Van der Waals usou-se um cutoff de 0.9 nm. Utilizou-se o algoritmo LINCS para constrianger as ligações químicas da proteína e do ligando e o algoritmo SETTLE para constrianger as ligações químicas das moléculas de água. A temperatura foi controlada usando o algoritmo *velocity rescale* e mantida a 300K. Cada simulação foi realizada uma vez. O sistema foi neutralizado com contra-íões de Na^+ . [50-58]

Para realizar a simulação, o sistema foi preparado da seguinte forma:

- Uma etapa de minimização de energia usando o integrador Steepest descent durante 100000 passos.
- Uma segunda etapa de minimização de energia usando o integrador Conjugate gradient durante 12000 passos.
- Uma fase de relaxação para relaxar a esfera de hidratação da proteína em que se aplicam position restraints de $100000 \text{ kJ/mol/nm}^2$ em todos os átomos da proteína e no ligando durante 100 ps com um intervalo de intergração (time step) de 0.002ps (2fs). Aqui aplicou-se aleatoriamente velocidades iniciais a todos os átomos geradas por uma distribuição de Maxwell a 310K.
- Uma segunda fase de relaxação para relaxar as sidechains dos aminoácidos da proteína em que se aplicam position restraints de $100000 \text{ kJ/mol/nm}^2$ nos átomos da cadeia principal (carbonos α , azotos e grupos carbonilo) durante 100 ps com um time step de 0.002ps (2fs).
- Uma terceira fase de relaxação em que se coloca position restraints nos carbonos α da proteína de $100000 \text{ kJ/mol/nm}^2$ durante 100 ps com um time step de 0.002ps (2fs).
- Uma ultima fase de relaxação sem quaisquer position restraints no sistema durante 100ps.
- Simulação de dinâmica molecular durante 20ns com um time step de 0.002ps (2fs).

Realizou-se também uma simulação nas mesmas condições de um derivado da swainsonina: uma das azaswainsoninas.

No final das simulações fizeram-se análises à trajetória, em que se descartaram os primeiros 5ns, porque o sistema ainda não se encontrava em equilíbrio. Utilizou-se o programa Pymol para visualização e análise dos resultados.[59]

3.3 Análises PCA (Principal Component Analysis)

Analisou-se uma trajetória de 130 ns. Utilizou-se o método de Campos *et al*, em que se começa por encontrar uma estrutural central, i.e, uma estrutura que tenha o menor RMSD em comparação com todas as outras estruturas da trajetória. Depois seleciona-se o número de componentes principais adequados para capturar 70% da amostra e depois realizou-se a análise de componentes principais usando ferramentas de análise g_covar e g_anaeig incluídas no *software*

GROMACS 4.5.4.[50-58] No final, utilizaram-se outras ferramentas para selecionar os *basins* e encontrar os mínimos de cada *basin*. Selecionaram-se 10 estruturas de menor energia.

3.4 Docking

Utilizaram-se as estruturas previamente encontradas através das análises de PCA. As moléculas utilizadas para o *screening* foram todos os derivados da swainsonina e azaswainsonina previamente criados para as análises por integração termodinâmica e MM-PBSA, juntamente com um conjunto de moléculas selecionadas na base de dados *PubChem*. A maior parte das moléculas apresenta as seguintes características: peso molecular menor que 200 g/mol e pelo menos 2 HBA (*hydrogen bond acceptor*) e HBD (*hydrogen bond donor*). Outras moléculas sem estas características também foram selecionadas devido à semelhança com o substrato ou por terem núcleos distintos. O software usado foi o AutoDock Vina.[56] A região do centro activo utilizada para realizar a procura conformacional entre a enzima e o ligando possui as dimensões de 26x16x27 pontos com espaçamento de 1 Å e foi colocada no centro do local de ligação nas seguintes coordenadas 27; 65,22; 13,36. A visualização e análise dos resultados foram realizadas utilizando o software PyMol. [59]

3.5 Cálculos de energia livre

3.5.1 Construção dos sistemas

Para os ligandos experimentais, utilizou-se a última frame das simulações de dinâmica molecular previamente realizadas e fez-se simulações de 10ns do complexo proteína-ligando.

A estrutura das azaswainsoninas e dos derivados de swainsonina foi construída a partir da estrutura de raios-x da swainsonina como anteriormente descrito. Para obter as cargas atómicas e uma estrutura otimizada processou-se a estrutura usando o programa Gamess, em que se usou o método quântico de Hartree-Fock otimizar a geometria com o conjunto de funções 6-31G(d) [48][49]. A geometria otimizada e o potencial quântico electrostático foram usadas para calcular as cargas parciais de cada átomo através do método de *fitting* RESP. A topologia foi obtida a partir do software PRODRG[47]. A estrutura obtida foi alinhada com a estrutura obtida por raios-x da swainsonina de forma a inserir corretamente a nova molécula na proteína, que foi adaptada da estrutura 3BLB. O sistema depois foi neutralizado com contra-íões de Na⁺.

Começou-se por construir as moléculas necessárias a partir da estrutura de raios-x da swainsonina ligada à GMII (código PDB:3BLB), utilizando o software Pymol.[52] A sua geometria foi otimizada usando o programa Gamess e usou-se o mesmo e o software PRODRG para parametrizar as moléculas. Construiu-se os sistemas usando o software Pymol e a estrutura 3BLB.

3.5.2 Integração termodinâmica (IT)

Usou-se o campo de forças Gromos54a7. O algoritmo PME foi usado para tratar as interações colômbicas com um cutoff de 0.9 nm e um espaçamento na grelha de 0.12 nm. Para as interações de Van der Waals usou-se um cutoff de 0.9 nm. Utilizou-se o algoritmo LINCS para constranger as ligações químicas da proteína e do ligando e o algoritmo SETTLE para constranger as ligações químicas das moléculas de água. A temperatura foi controlada usando o *algoritmo velocity rescale* e mantida a 300K. O sistema foi minimizado e equilibrado com descrito anteriormente. Realizaram-se 1ns de simulação para se obter uma estrutura em equilíbrio. Porém, para a maior parte dos cálculos utilizaram-se as estruturas finais após as simulações já realizada da swainsonina e do derivado: a azaswainsonina. [50-58]

Nas experiências de IT, transformou-se uma molécula X num estado inicial na molécula Y, sendo esta o estado final.

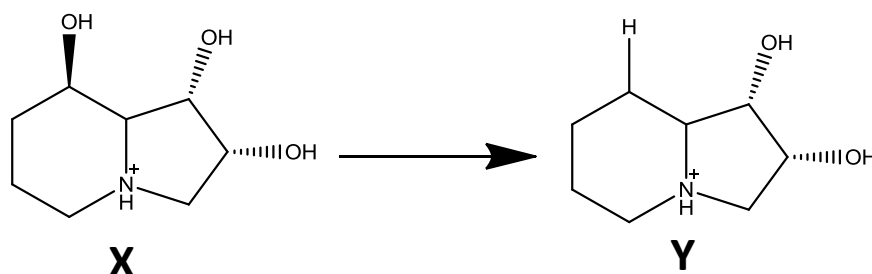


Figura 24-Exemplo de uma transformação realizada por integração termodinâmica, em que há a transformação de um grupo hidroxilo num átomo de hidrogénio.

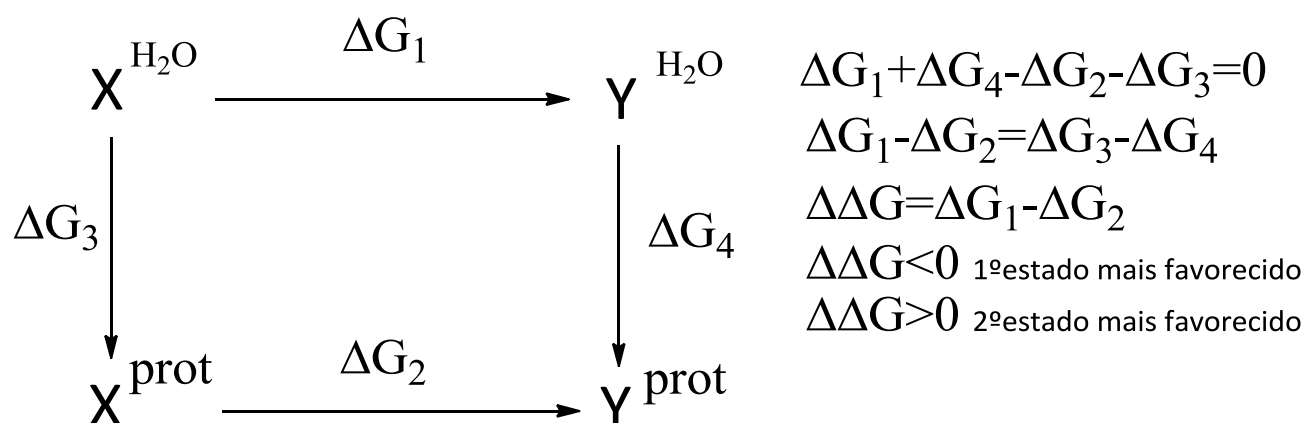


Figura 25-Ciclo termodinâmico usado para as experiências de integração termodinâmica.

Para isso, construiu-se um ciclo termodinâmico como o mostrado na figura 25, em que ΔG_1 é a energia livre associada à transformação de X em Y em solução, e ΔG_2 é a energia livre associada à transformação de X em Y na proteína. ΔG_3 e ΔG_4 são as energias livres de ligação das moléculas X e Y, respetivamente na proteína. ΔG_3 e ΔG_4 só podem ser determinados experimentalmente. Porém, através deste ciclo termodinâmico é possível determinar a relação entre ΔG_1 e ΔG_2 e consequentemente entre ΔG_3 e ΔG_4 . Assim, se $\Delta\Delta G > 0$, o segundo estado é mais favorecido, senão é o primeiro estado o mais favorecido.

Variou-se λ entre 0 e 1 e assim fizeram-se 10 simulações com os valores de λ de 0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 e 1.0. Cada simulação teve a duração de 500ps e foi realizada nas condições anteriormente descritas. As simulações do ligando em solução foram realizadas nas mesmas condições.

3.5.3 MM-PBSA

O sistema foi minimizado utilizando os algoritmos *steepest descent* e *conjugate gradient* da forma anteriormente referida e equilibrado da mesma forma anteriormente referida.

Realizou-se 10ns de simulação. As simulações foram realizadas usando os mesmos parâmetros para as anteriores. Usou-se o campo de forças Gromos54a7. Usou-se o algoritmo PME para tratar as interações colômbicas com um cutoff de 0.9 nm e um espaçamento na grelha de 0.12 nm. Para as interações de Van der Waals usou-se um cutoff de 0.9 nm. Utilizou-se o algoritmo LINCS para constranger as ligações químicas da proteína e do ligando e o algoritmo SETTLE para constranger as ligações químicas das moléculas de água. Usou-se o algoritmo *velocity rescale* para manter a temperatura a 300K.[50-58]

Analisaram-se 8ns de trajetória tanto para a proteína como para o complexo. Para o ligando realizaram-se simulações de 10ns do mesmo em solução e analisou-se a trajetória toda. A energia livre foi calculada segundo o método de MM-PBSA descrito por Gilson e Zhou [36]. Para calcular a energia interna, a entropia e a energia de solvatação não polar utilizaram-se aplicações *g_energy*, *g_covar*, *g_anaeig* e *g_sas* incluídas no programa GROMACS 4.5.4. A entropia foi calculada usando a aproximação quasi-harmónica, a área de solvatação foi calculada pelo método já explicado no capítulo 2 e a energia interna consiste na soma das interações de van der Waals com as eletrostáticas. O potencial electrostático e a energia livre de solvatação foram calculados utilizando

o método de Poisson-Boltzmann implementado no software MEAD 2.2.9.[44][45] As cargas atómicas para a proteína e o ligando foram adotadas do campo de forças Gromos54a7. Os raios atómicos usados foram os associados ao campo de forças usado. Para calcular a energia livre de solvatação da proteína e do complexo, usaram-se 1000 conformações obtidas entre 2ns e 3ns e no caso do complexo e considerou-se o ião de zinco nos cálculos que envolviam a proteína e o complexo. Para calcular a energia livre de solvatação do ligando analisaram-se as primeiras 1000 conformações. Em todos os cálculos usou-se uma grelha de 101 pontos com o espaçamento de 1 Å e uma grelha de *focusing* com 101 pontos e um espaçamento de 0.25 Å para refinar os cálculos electrostáticos da proteína. Usou-se uma constante dielectrica de 4 para a proteína e 80 para o meio e uma força iónica de 100 mM. A energia de solvatação não polar foi calculada usando uma constante de 5 cal/mol/Å² e um raio da sonda de 1.4 Å. A entropia foi calculada usando a aproximação quasiharmónica. A temperatura considerada foi de 300K.

4. Titulação de resíduos de aminoácidos ionizáveis da GMII

Realizou-se a titulação das cadeias laterais com resíduos protonáveis da GMII com o objetivo de obter estruturas com os estados de protonação corretos a pH 6.6, que é o pH do lúmen do complexo de Golgi [61]. Esta necessidade prende-se com o facto de que posteriormente neste trabalho vão ser realizadas simulações de dinâmica molecular de alguns dos ligandos sujeitos ao *docking*, para analisar o seu comportamento ligados à enzima. Assim, é possível realizar as simulações em condições verdadeiramente fisiológicas. As titulações foram realizadas usando apenas as conformações obtidas por cristalografia.

Dessa forma, realizou-se a titulação das cadeias laterais dos aminoácidos ionizáveis das várias estruturas cristalográficas usando cálculos electrostáticos e uma rotina de Monte Carlo descrita na secção 3.1. Os grupos considerados tituláveis foram: os grupos N-terminal, C-terminal, os grupos carboxilo dos resíduos de aspartato, glutamato, arginina, lisina, cisteína, tirosina, serina e histidina. Assim, obtiveram-se os padrões de protonação em que existe a probabilidade do resíduo estar protonado em função do pH.

Analisaram-se mais exaustivamente os aminoácidos que pertencem ao centro ativo. No centro ativo consideraram-se três resíduos de histidina: a histidina 90, a histidina 471 e a histidina 273. As histidinas 90 e 471 estão a coordenar o íon de zinco, enquanto que a histidina 273 localiza-se no local de ancoragem. Para as duas primeiras histidinas a forma mais abundante é HISD. Pela figura 48 observa-se que estes resíduos estão protonados, uma vez que a probabilidade é bastante elevada a todos os pH de que esteja protonado (figura 26).

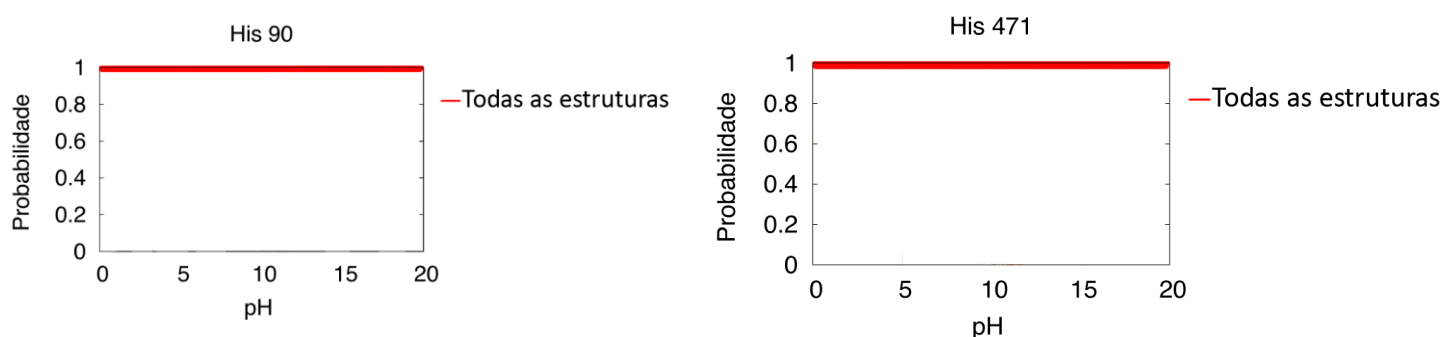


Figura 26- Curvas de titulação para os resíduos de histidina 90 e 471. Encontra-se representada a probabilidade da histidina estar protonada no respetivo estado (HISE ou HISD) em função do pH.

Já para a histidina 273, ela pode estar nas três formas a quase todos os pH (figura 27). Esta histidina já se localiza quase no exterior do centro ativo e por isso, está mais exposta ao meio e possui um resíduo de aspartato adjacente, de forma que os seus estados de protonação já são mais variáveis. Verifica-se que a pH 6.6 existe uma probabilidade de 72,2 % a 86,6 % da histidina estar na forma de HISD e 2,38 a 24,6 % de estar em HISE e de 0,67 a 7,89% de estar em HISH. De facto, ao observar a estrutura da proteína observa-se que esta se localiza ao lado do resíduo de aspartato 270 e com o protão orientado para o grupo carboxilo, podendo assim realizar uma ponte de hidrogénio. Num caso limite, seria possível o resíduo de aspartato captar o protão da histidina ficando protonado e por sua vez, a histidina pode captar um protão de uma molécula de água adjacente, do lado do azoto NE e dar origem à HISE ou pode apenas captar o protão da molécula de água, que é menos provável e originar a HISH. Na imagem 26 observa-se as curvas de titulação para os vários tautómeros da histidina 273 e observa-se que a probabilidade de existir uma maior quantidade de histidina na forma de HISH é maior a pH mais baixo. Porém para estes dois resíduos verifica-se que estão em isoformas diferentes para estruturas diferentes. O que acontece é que há a rotação da ligação C β -imidazole originando a rotação do anel de imidazole e ficando em diferentes orientações conforme as estruturas cristalográficas. Na figura 27 observa-se que para as estruturas com os códigos PDB 3BLB, 3D51, 3DX4, 3D4Y e 3DDF, a HISD é mais favorecida porque nestas conformações o anel de imidazole está em tal orientação que permite a realização uma ponte de hidrogénio direta usando o protão está no átomo de azoto ND1, com o resíduo de aspartato. Para as estruturas 1HXK, 2F1A e 2OW6, o anel de imidazole rodou 180° e neste caso não há nenhum átomo de azoto protonado que fique diretamente orientado para o resíduo de aspartato 270 (figura 28), assim as probabilidades de o aminoácido se encontrar na forma HISD ou HISE tornam-se mais semelhantes. O átomo NE2 fica ligeiramente mais próximo sendo assim a probabilidade de estar na forma HISE maior. O aspartato 270, envolvido na ligação de bastantes inibidores tem uma probabilidade de 0.018 % a 1.2 % de estar protonado.

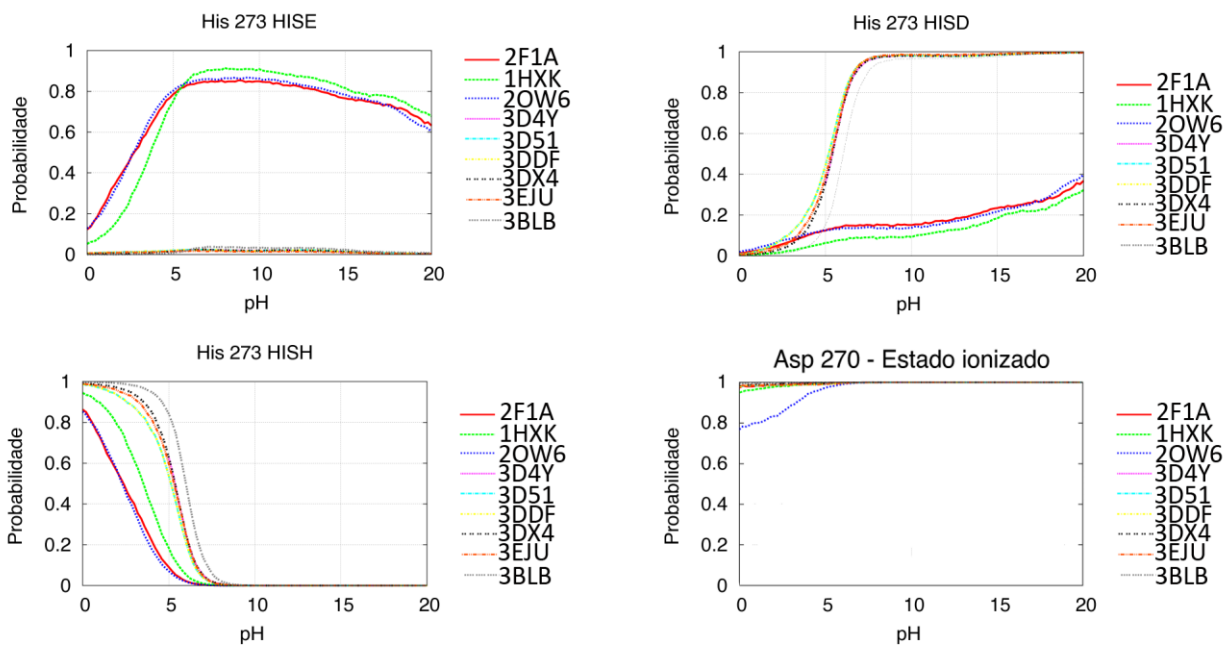


Figura 27- Curvas de titulação para o resíduo de histidina 273 e aspartato 270.

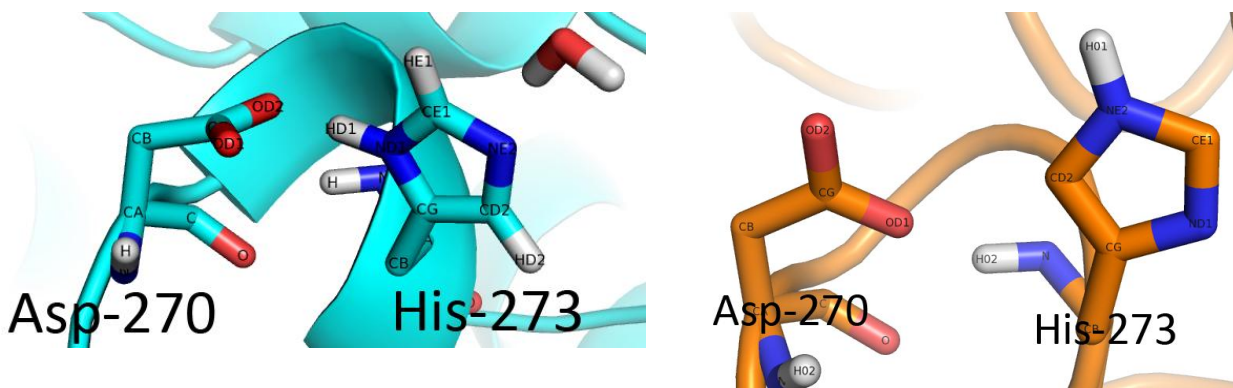


Figura 28- Posições dos resíduos 270 e 273 nas estruturas 3BLB (a azul) e na estrutura 1HXK (a laranja).

Para os resíduos de aspartato observa-se a maior parte encontra-se desprotonada, como seria de esperar, uma vez que o pKa do ácido carboxílico da cadeia lateral é de 3.40. [1] Um dos resíduos relevantes é o aspartato 204 que está desprotonado como previsto, uma vez que é o aminoácido que serve de nucleófilo na reação de hidrólise, sendo assim essencial para o mecanismo. O aspartato 92 está envolvido na coordenação do ião metálico. Como se pode observar pelas figura 51 estes resíduos encontram-se ionizados a pH 6.6 (figura 29).

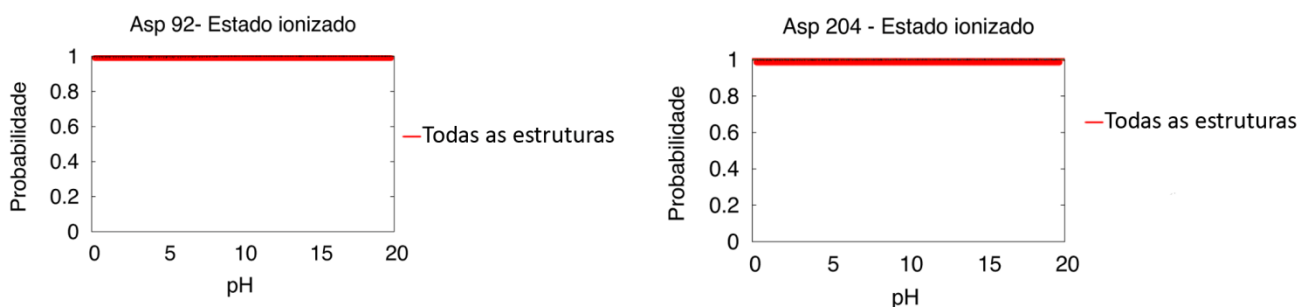


Figura 29- Curvas de titulação para os resíduos de aspartato 204 e 92.

As curvas de titulação destes aminoácidos apresentam perfis diferentes, em que o aspartato 92 possui uma probabilidade de quase 100% de estar ionizado em toda a gama de valores de pH, e o aspartato 341 a partir do pH 6 tem uma probabilidade acima de 90% de estar ionizado. O aspartato 472 pode estar protonado em alguns valores de pH mais baixos (figura 30). Na proteína observa-se que este resíduo está adjacente à histidina 470. Para esta histidina verifica-se que está na mesma sujeita a diferentes estados de protonação consoante a rotação do anel de imidazole. Para as estruturas com os códigos PDB 3BLB, 3D51, 3DDF, 3DX4 e 3D4Y, o anel de imidazole está protonado no azoto NE1 e esta está diretamente orientado para o resíduo de aspartato realizando uma ponte de hidrogénio com o aspartato 472 (figura 31). Para as estruturas 1HXK, 2F1A, 2OW6 e 3BLB há uma rotação de cerca de 180° e as probabilidades de existirem tanto H1SD como H1SE acabam por ser semelhantes e a probabilidade de existir uma H1SH aumenta drasticamente, chegando a ser a forma mais provável na estrutura 1HXK (figura 30).

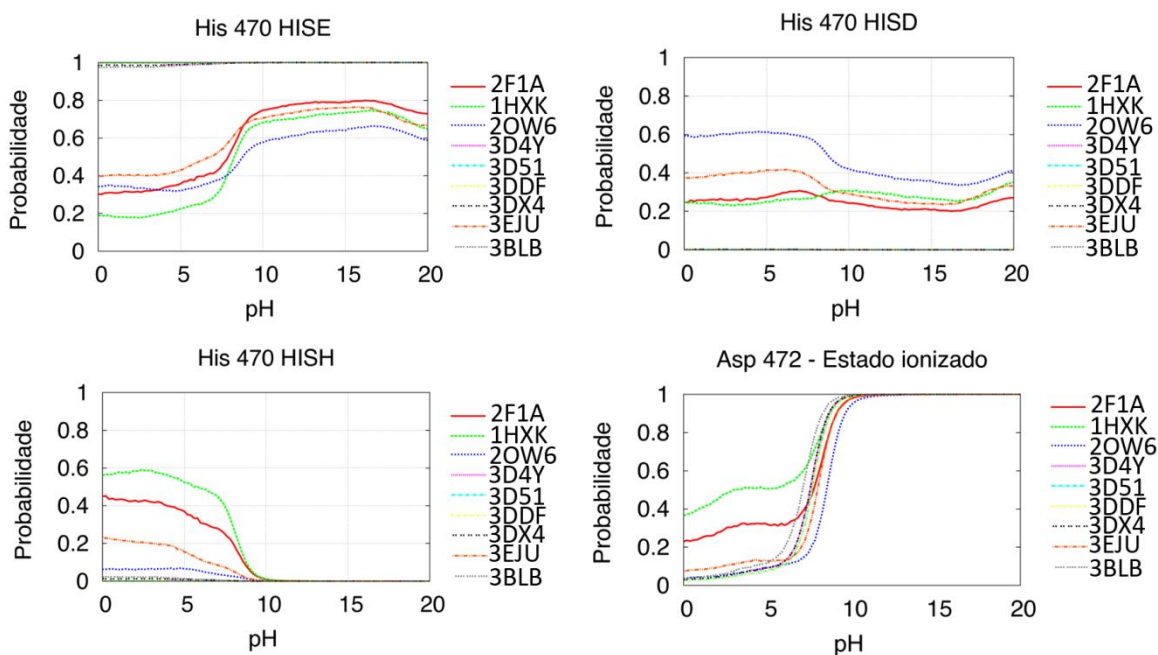


Figura 30- Curvas de titulação para as várias formas da histidina 470 e para o resíduo de aspartato 472.

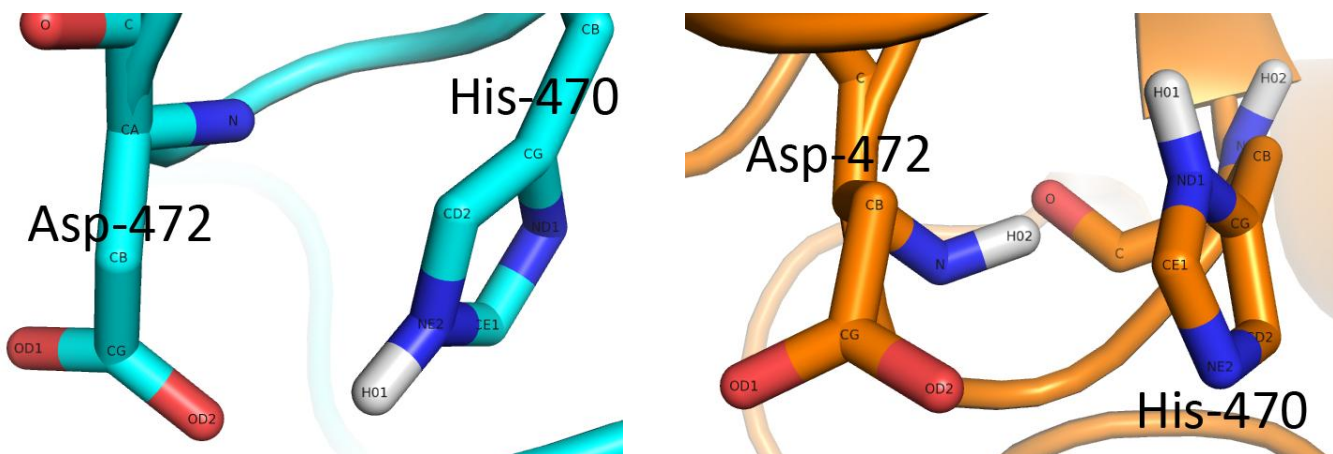


Figura 31- Posições dos resíduos 470 e 472 nas estruturas 3BLB (a azul) e na estrutura 2F1A (a laranja).

Relativamente a outros resíduos também se analisaram os resíduos de tirosina, observa-se que também se encontram protonados a pH 6.6, como as tirosinas 727 e 269 e que se encontram protonados em toda a gama de pH testada.

Observa-se que a maior parte dos aminoácidos apresentam curvas de titulação bastante semelhantes, apenas com pequenos desvios, o que significa que as diferentes conformações não induzem deslocamentos significativos que provoquem mudanças no ambiente químico que rodeia os resíduos. Para os pares aspartato-histidina, observam-se diferenças nos perfis de titulação dos aminoácidos, não apenas diferenças provocadas pela presença de outro resíduo ao lado, mas também por mudanças na orientação das cadeias laterais, como é no caso da histidina.

5-Estudo estrutural de complexos cristalográficos proteína-ligando

Selecionaram-se várias estruturas cristalográficas de complexos da GMII com inibidores já conhecidos e testados experimentalmente com o objetivo de poder analisar as interações importantes para atividade desses inibidores, para observar o comportamento dos mesmos no local ativo e comparar as estruturas cristalográficas com as simulações de dinâmica molecular realizadas. Ao todo realizaram-se simulações de dinâmica molecular de 9 complexos GMII-ligando com os códigos PDB: 1HXK,2F1A,2OW6,3BLB,3DX4,3DDF,3D53,3EJU,3D4Y. Para abreviar, apenas as estruturas com comportamentos mais distintos vão ser referidas.

Analisou-se a estrutura 3BLB em que a GMII está ligada à swainsonina, que como já foi referido anteriormente, é o inibidor mais potente conhecido para esta enzima (figura 31).

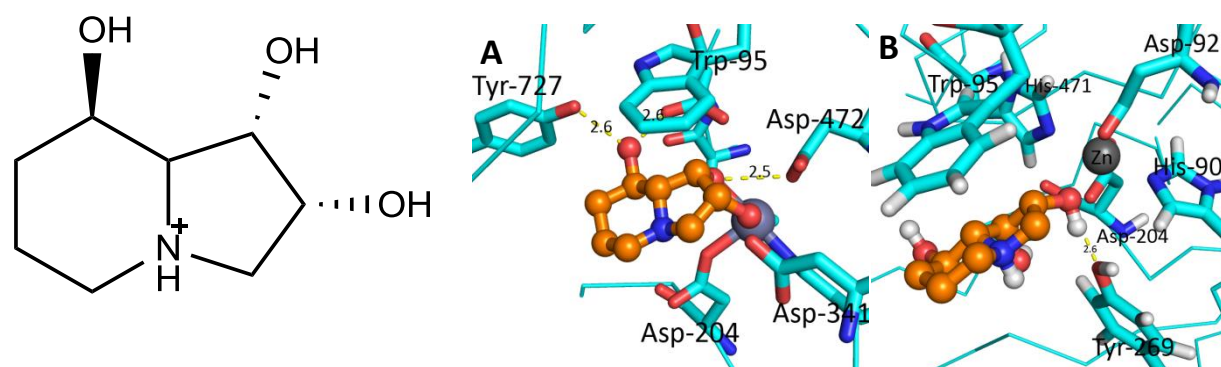


Figura 32- Estrutura da swainsonina e os seus modos de ligação no complexo cristalográfico (A) e após 20ns de simulação (B). A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.

É possível verificar que, na estrutura de raios-x, (figura 32 A) a swainsonina liga-se ao zinco através dos grupos hidroxilo, estabelece pontes de hidrogénio com os resíduos de aspartato 472, tirosina 727 e aspartato 92 e interações catião π e hidrofóbicas com o resíduo de triptofano 95 e interações iónicas com o resíduo de aspartato 204. Após 20ns de simulação é possível observar um ligeiro desvio na configuração da swainsonina, tal que agora as interações resumem-se apenas à ligação de um grupo hidroxilo ao zinco e às interações anteriormente descritas com o triptofano 95 e uma ponte de hidrogénio com a tirosina 269 (figura 32 B).

O complexo 2OW6 consiste na GMII ligada à tioswainsonina, que é um análogo de swainsonina, mas com enxofre (figura 33). Este inibidor é reportado como tendo uma afinidade bastante inferior à swainsonina ($k_i=2.0\text{mM}$).

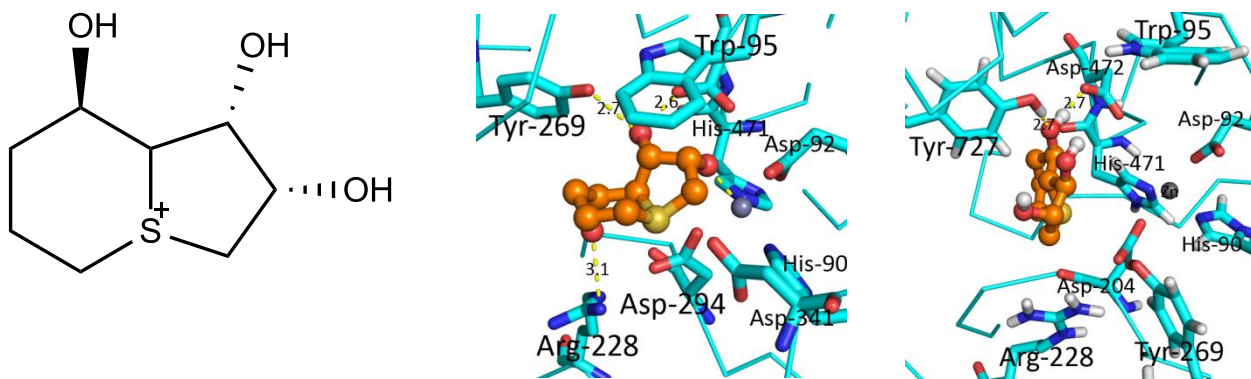


Figura 33- Estrutura da thioswainsonina e os seus modos de ligação no complexo cristalográfico (A) e após 20ns de simulação (B). A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.

No complexo cristalográfico (figura 33) o inibidor está ligado ao zinco apenas por um grupo hidroxilo, mas realiza várias pontes de hidrogénio com os resíduos de aspartato 472, tirosina 727 e arginina 228, para além de interações iónicas com o aspartato 204 e interações com o resíduo de triptofano 95. No final da simulação (figura 33), observa-se que há um grande desvio do centro ativo e na orientação da molécula, havendo duas pontes de hidrogénio com os resíduos de aspartato 472 e tirosina 727, para além de interações iónicas com o aspartato 204. Este desvio pode ter acontecido possivelmente porque as ligações ao zinco são mais fracas do que na swainsonina, passando a predominar outras interações com as pontes de hidrogénio e interações iónicas. Também é possível que o maior volume do átomo de enxofre dificulte o encaixe perfeito no *pocket* do centro ativo e provoque este desvio.

À estrutura com o código PDB 1HXK corresponde um complexo da GMII com o ligando desoximanojirmicina (figura 34).

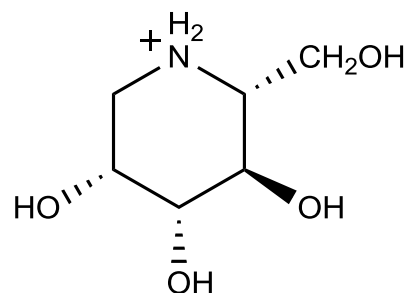


Figura 34- Estrutura da desoximanojirmicina

É possível observar nas figuras 35 A e 35 B que esta molécula interage com o átomo de zinco através dos grupos hidroxilo e ainda realiza pontes

de hidrogénio com os resíduos de aspartato 472, 341, tirosina 727 e arginina 876, interações

catião π com o resíduo de triptofano 95 e interações iónicas com os resíduos de aspartato 341 e 204. Na imagem 28B é possível observar o ligando após 20ns de simulação e constata-se que se manteve na mesma posição e a maior parte das interações se mantiveram inalteradas, exceto a ponte de hidrogénio com o grupo carbonilo da arginina 876, que deixou de existir, porque se verificou um desvio do resíduo.

Para a estrutura 2F1A, observa-se uma molécula com um núcleo de pirrolidina, em que ao pH fisiológico, o anel está carregado (figura 36 A). Nesta molécula é importante realçar a sua cadeia lateral, uma vez que poderá permitir estabelecer interações extra com a enzima.

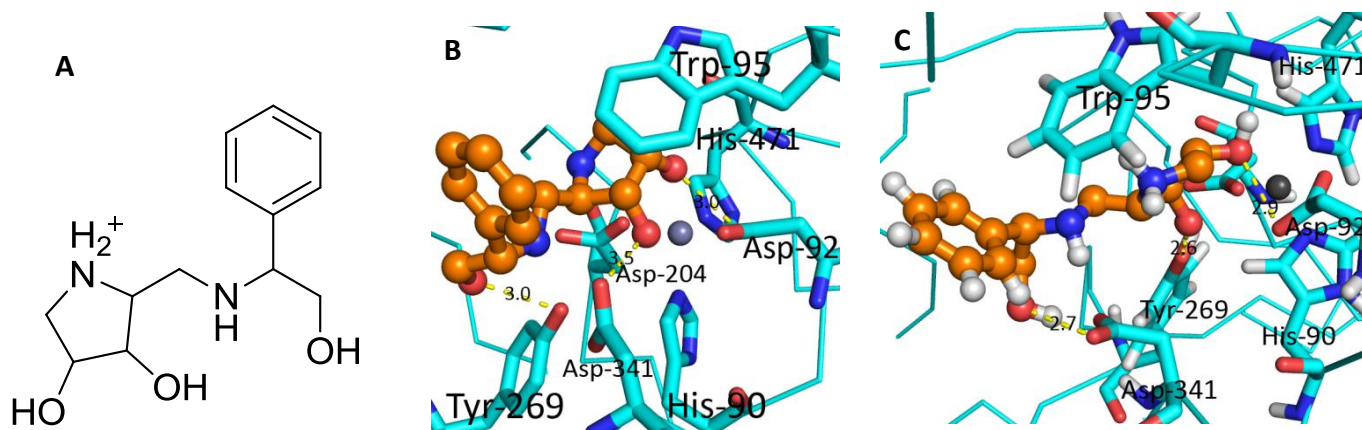


Figura 35- Ligação da desoximanojirmicina à GMII. A- Ligação da molécula na estrutura cristalográfica. B- Ligação à GMII após 20ns de simulação. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.

Figura 36- Ligação da pirrolidina substituída na posição 5 à GMII. A- Ligação da molécula na estrutura cristalográfica. B- Ligação à GMII após 20ns de simulação. A amarelo estão as pontes de hidrogénio. As distâncias estão em Angström.

No complexo cristalográfico (figura 36B), é possível observar que para além das interações comuns aos outros ligandos existem uma ponte de hidrogénio do grupo carbonilo com a tirosina 269 e uma ponte de hidrogénio da amina na cadeia lateral com o resíduo de aspartato 341. Após 20ns de simulação (figura 36C) é possível observar que a molécula continua na mesma posição,

porém o grupo hidroxilo da cadeia lateral já não interage com a tirosina 269, mas com o aspartato 341 e o grupo fenilo realiza agora interações π - π *edge-to-face*.

Outra estrutura com uma cadeia lateral diferente é o derivado da swainsonina com o código PDB 3EJU (figura 37A), possui uma cadeia com um grupo carbonilo e outro fenilo, o grupo carbonilo realiza pontes de hidrogénio com o resíduo de arginina 228 e interações catião- π e é relatado na literatura que este grupo pode contribuir para aumentar a seletividade com a LM (α -manosidase lisossomal).

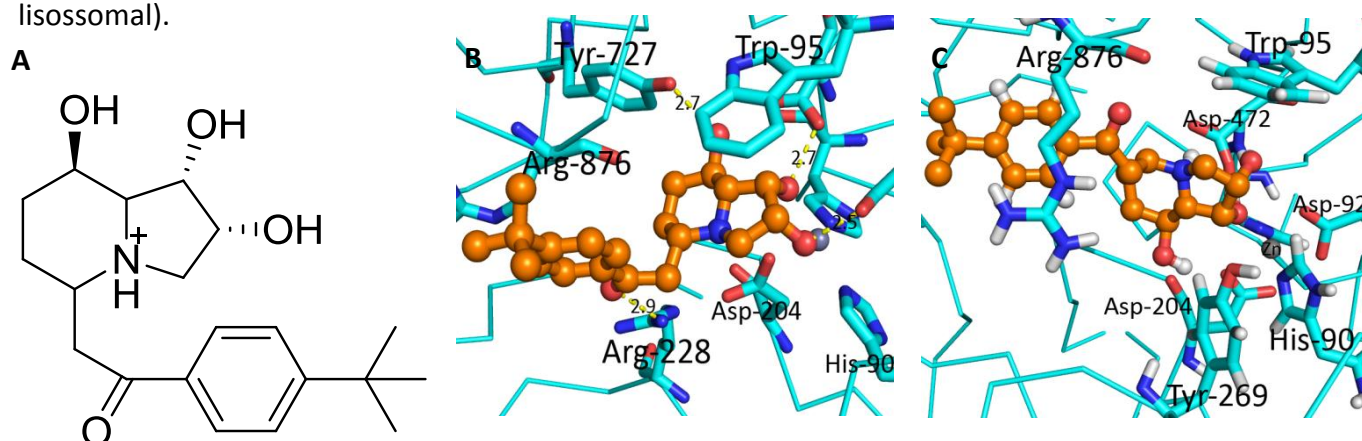


Figura 37- Ligação da swainsonina substituída na posição 5 à GMII. A- Ligação da molécula na estrutura cristalográfica. B- Ligação à GMII após 20ns de simulação. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

Na estrutura 34DY encontra-se ligando à GMII o manimidazole (figura 38A). Ao contrário de todas as moléculas até agora apresentadas, esta é neutra. O que significa que as interações iónicas vistas anteriormente são importante para uma maior afinidade das moléculas, mas não fundamentais para a sua atividade como inibidores, o que é relevante visto que se acredita que a carga presente nos inibidores é importante para mimetizar a carga do estado de transição. Outro facto é que a ausência de carga pode minimizar os custos de desolvatação, tornando a ligação mais favorável energeticamente.

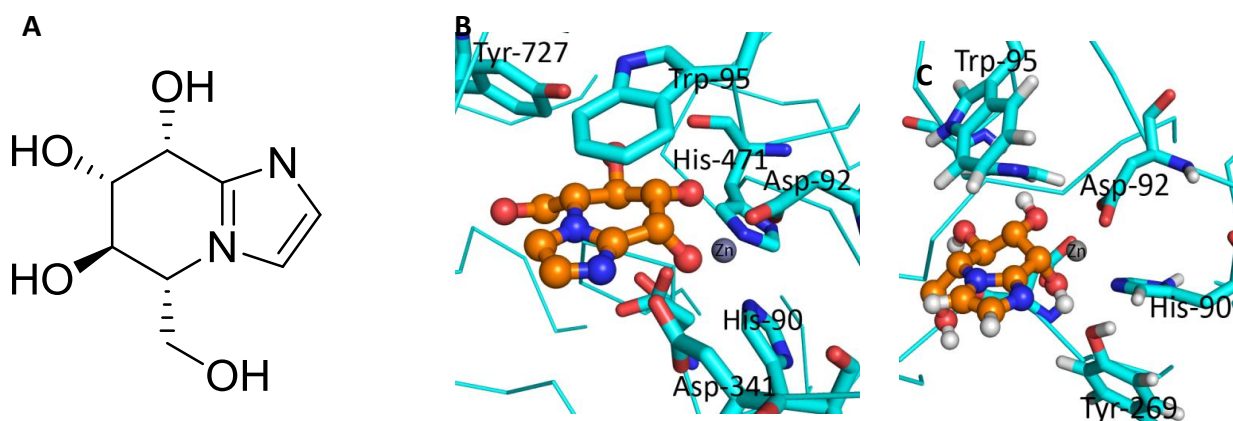


Figura 38- Ligação do manimidazole substituída na posição 5 à GMII. A- Ligação da molécula na estrutura cristalográfica. B- Ligação à GMII após 20ns de simulação.

Porém, é possível observar que tanto na estrutura cristalográfica (figura 38B) como após a simulação de DM, as interações mantiveram-se inalteradas (figura 38C), confirmando que a ausência da carga na molécula não é uma condicionante na atividade da molécula. Também para a estrutura cristalográfica com o código 3D51, em que está uma glucoxima neutra ligada à GMII, verificou-se que após a simulação de dinâmica molecular as interações com a enzima mantiveram-se praticamente inalteradas, verificando-se apenas um ligeiro afastamento.

Desta forma, também se realizou uma simulação de 20ns de um dos análogos da swainsonina desenvolvidos neste trabalho- uma azaswainsonina, que também é neutra. No final da dinâmica molecular, verificou-se, tal como os ligandos nos complexos experimentais, a molécula continua na mesma posição e realiza as mesmas interações que os outros ligandos. Demonstrando assim que estes derivados podem possuir, de fato, atividade contra a GMII.

Através desta análise é possível concluir que as principais interações realizadas pelos inibidores da GMII e que são comuns a todos os inibidores são:

- A ligação ao zinco através de grupos hidroxilo.
- Pontes de hidrogénio com os resíduos de aspartato 472 e 341
- Interações hidrofóbicas com o resíduo de triptofano 95.

Para os ligandos carregados ainda existem:

- Interações iónicas com o resíduo de aspartato 204.
- Interações catião- π com o resíduo de triptofano 95.

Desta forma, resolveu-se medir a distância média destas interações ao longo das simulações de 20ns, para que, dessa forma, se possa verificar quais são, de fato, as interações realizadas pelos inibidores da GMII, durante o processo de inibição. Começou-se por medir as distâncias das ligações dos grupos hidroxilo ao metal.

*Tabela I- Distâncias médias das ligações dos dois grupos hidroxilo ao metal; S-substituída; *Análogo da manostatina*

Inibidor	Distância	Inibidor	Distância
Desoximanojirmicina	2,61 /2,04 Å	Manoimidazole	2,07/2,03 Å
Pirrolidina 5-S.	2,06 /3,06 Å	Glucoxima	4,64/5,34 Å
Tioswainsonina	7,52/3,63 Å	Lactama S.	2,05/2,05 Å
Swainsonina	3,32/4,76 Å	Swainsonina 5-S.	4,19/2,24 Å
Manostatina *	2,02/2,24 Å	Azaswainsonina	2,05/2,02 Å

É possível observar que, na maior parte dos casos, as distâncias oscilam entre 2-4Å, exceto no caso da tioswainsonina em que a molécula se desvia bastante do átomo de zinco e apenas fica ligada por um hidroxilo e no caso da glucoxima verifica-se um ligeiro desvio da molécula em relação ao átomo de zinco. Verificando-se assim, que este tipo de interação é bastante próximo na maior parte das estruturas, significando assim, que é importante para a atividade das moléculas como inibidores.

*Tabela II- Distâncias médias das ligações por pontes de hidrogénio de grupos hidroxilo com os resíduos de aspartato 341 e 472 e interações iónicas com o aspartato 204 (no caso dos ligandos carregados) *-O aminoácido está demasiado longe; **-Ligando neutro;***-Análogo da manostatina*

	Asp-341	Asp-472	Asp-204 (int.iónica)
Inibidor	Distância	Distância	Distância
Desoximanojirmicina	3,08 Å	2,63 Å	4,71 Å
Pirrolidina 5-S	5,34 Å	3,18 Å	5,63 Å
Tioswainsonina	7,52/3,63 Å	10,68 Å	3,93 Å
Swainsonina	4,35 Å	-*	1,43Å
Manostatina ***	3,51 Å	2,96 Å	5,15 Å
Manoimidazole	2,07/2,03 Å	-*	-*

Glucoxima	4,83 Å	3,33 Å	-**
Lactama S.	2,05/2,05 Å	2,62 Å	5,12 Å
Swainsonina 5-S.	4,19/2,24 Å	3,43 Å	5,29 Å
Azaswainsonina	3,36 Å	2,49 Å	-**

As interações acima referidas na tabela II ocorrem sempre com um grupo hidroxilo do ligando, mas não estão na mesma posição relativa. Verifica-se que apenas sete inibidores realizam pontes de hidrogénio com o aspartato 341, considerando que as pontes de hidrogénio ocorrem a distâncias menores ou iguais que 3,5Å, segundo Bissantz et al [62]. Para o aspartato 472 é possível verificar que a maior parte dos inibidores realizam interações por pontes de hidrogénio intensas com o mesmo, exceto os das estruturas 3BLB e 3D4Y, porque se verifica um afastamento muito grande do resíduo do centro ativo. Assim, pode-se deduzir que esta é uma interação comum a uma grande parte dos ligandos estudados e que contribui para a atividade destas. As azaswainsoninas também realizam estas interações e com uma distância tão ou mais próxima do que os inibidores já conhecidos, confirmando assim o seu potencial como inibidores da GMII. As interações iónicas entre os inibidores e o resíduo de aspartato 204, mimetizam as interações que o estado de transição oxocarbenião realiza com o aspartato 204, que serve de nucleófilo [40]. Assim, as simulações de DM permitem dar uma noção de como é que se realiza a interação com os inibidores de GMII. Na tabela I é possível observar que a interação iónica da swainsonina (3BLB) com este resíduo é bastante mais próxima (1,43 Å) do que os restantes inibidores e isso pode explicar a maior afinidade da swainsonina para a GMII. A esta distância também é possível haver uma ponte de hidrogénio entre o grupo NH e o carboxilo do aspartato. A tioswainsonina também interage fortemente com este resíduo, porém não está na orientação correta para realizar as restantes interações, tendo assim uma fraca afinidade. As restantes moléculas também não interagem de uma forma tão próxima com este aminoácido, mas possuem outras interações como pontes de hidrogénio, interações hidrófobas e interações dipolo-dipolo com outros resíduos que compensam este fato.

De uma forma global, é possível dizer que os inibidores observados se ligam à enzima através de ligações hidroxilo-zinco, 2-3 pontes de H com os resíduos circundantes, sem contar com as cadeias laterais, interações hidrófobas e no caso dos ligandos carregados interações iónicas com

resíduos de aspartato e interações catião- π . Também se verificou que os vários inibidores estabeleciam variadas interações com outros resíduos circundantes.

6. Desenvolvimento de novos derivados da swainsonina

6.1- Desenvolvimento de novas moléculas

Nesta parte do trabalho desenvolveram-se várias moléculas derivadas da swainsonina, i.e, adotou-se a estrutura base da swainsonina e testaram-se várias modificações à molécula-base como alterações dos grupos funcionais e acréscimo de cadeias laterais diferentes.

As várias alterações aos grupos funcionais já existentes serviram para verificar relações estrutura-atividade. Os derivados foram concebidos conjuntamente com a equipa de químicos sintéticos. Uma das espécies de derivados considerados são as azaswainsoninas (figura 39) em o carbono na posição 5 foi substituído por um átomo de azoto e dessa forma, este núcleo passa a ser neutro. O azoto na posição 5 também pode ser substituído com uma cadeia lateral. Depois conceberam-se derivados da swainsonina funcionalizados no carbono 5.

Relativamente aos substituintes usados considerou-se dois tipos de substituintes: substituintes de curta dimensão e substituintes mais longos e complexos com o objetivo de alcançar os outros locais de ligação da enzima como o local de *holding* e de ancoragem de forma a conseguir alcançar seletividade entre a GMII e a ML (α -manosidase lisossomal) (figuras 40 e 41).

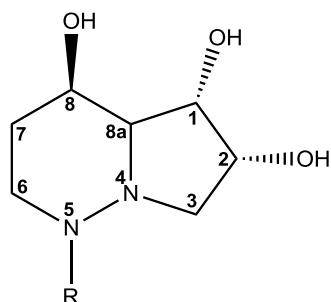


Figura 39- Estrutura geral das azaswainsoninas

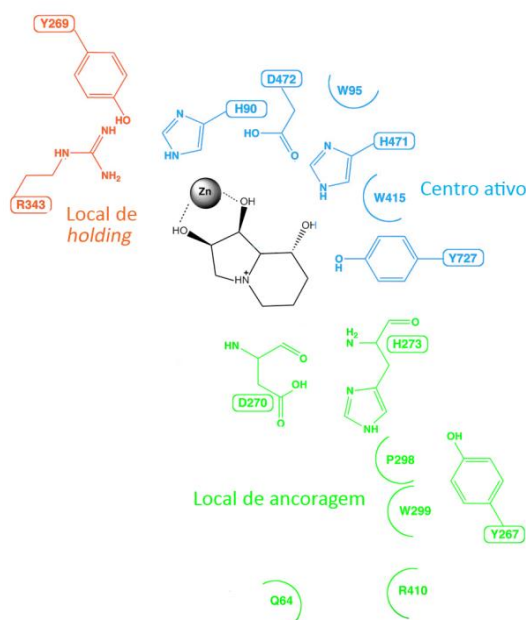


Figura 40- Esquema do centro ativo com os vários pockets e com a swainsonina ligada.

As moléculas mais complexas foram desenvolvidas de forma a mimetizar o substrato natural no local de *holding* (figura 40). Dessa forma, após vários estudos de modelação acrescentou-se, na posição 5 do núcleo de swainsonina, uma cadeia lateral similar à do substrato em que existe um espaçador alifático de duas unidades ligado a unidade central - um anel, com os substituintes em várias posições, que pode ser variável e uma unidade de 3 carbonos com um anel de seis membros ligado. No último anel verificou-se que deveriam existir pelo menos dois grupos hidroxilo nas posições 3 e 4 essenciais para a ligação tal como é reportado para o substrato [19]. Não se tentou criar moléculas que alcançassem o local de ancoragem, uma que vez se verificou que a sua síntese química era inviável.

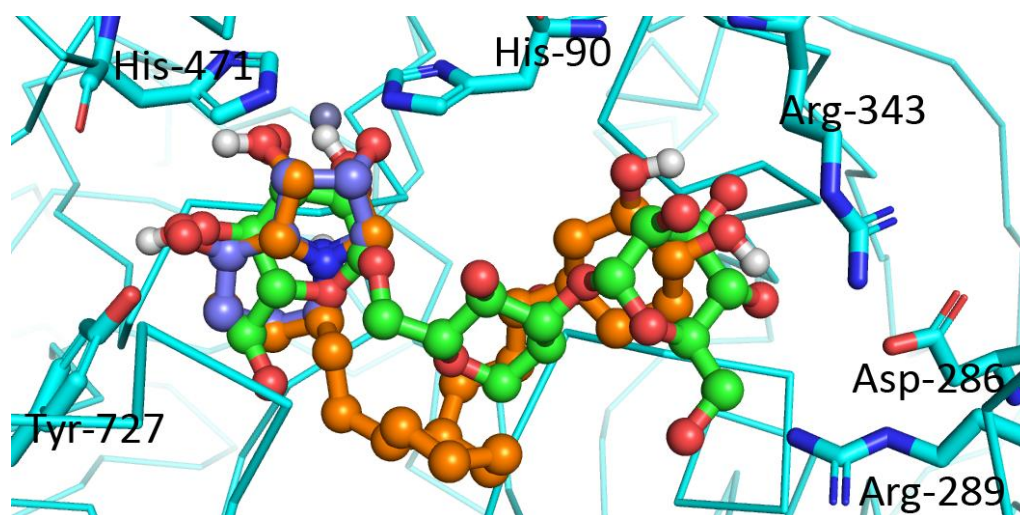


Figura 41- Representação de um fragmento do substrato Man₃ a verde (código PDB:3CZN), a swainsonina a roxo (estrutura 3BLB) e um modelo das novas swainsoninas propostas (laranja). A azul está a estrutura da GMII (código PDB: 3BLB).

Para além dos derivados da swainsonina criados, também se testaram várias moléculas da base de dados PubChem e outros alcalóides extraídos de produtos naturais referenciados na literatura com sendo inibidores de glicosidases, sendo alguns anticancerígenos comprovados.

O *docking* foi realizado sob dois conjuntos de estruturas proteicas: um conjunto de dez estruturas de menor energia obtidas através de uma simulação de dinâmica molecular e consequente análise por PCA (*Principal Component Analysis*).

Neste trabalho realizou-se uma simulação de dinâmica molecular da GMII durante 130ns e utilizaram-se 5 componentes principais para caracterizar o espaço conformacional da proteína. Com estes vetores conseguiu-se encontrar 21 *basins* (locais de menor energia na *landscape* energética). No *basin* de menor energia conseguiu-se amostrar 41,5% da população conformacional. Acredita-se que o uso de um maior número de dimensões poderia capturar uma maior quantidade de conformações, porém tal revelou-se impossível tal análise com o poder computacional existente, devido à elevada dimensão do sistema. Outra alternativa seria o uso de uma trajetória maior, porém também se revelou impossível devido às mesmas limitações atrás referidas.

6.2 Comparação das estruturas obtidas por DM com as cristalográficas

Ao comparar a estrutura com o mínimo de energia obtida a partir do *basin* escolhido com as estruturas cristalográficas da forma apo (a verde figura 42) e da estrutura ligada à swainsonina (a laranja figura 42) é possível constatar que não houve desvios significativos dos aminoácidos do centro ativo mais relevantes para a ligação, da estrutura obtida por dinâmica molecular e as estruturas cristalográficas. Porém, observa-se que o triptofano 95, a histidina 471 e as tirosinas 727 e 269 estão um pouco desviados em comparação com as estruturas cristalinas. Isto observa-se porque as estruturas cristalinas são rígidas e

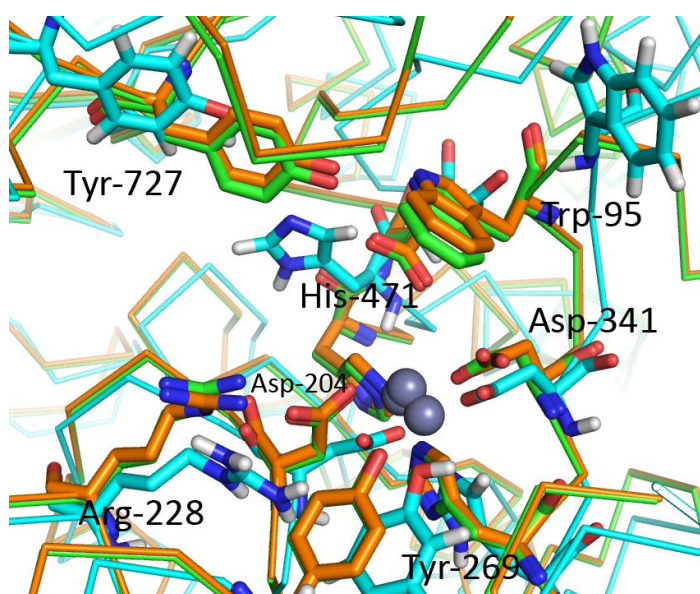


Figura 42-Sobreposição do mínimo de menor energia retirado do *basin* (a azul), da estrutura cristalográfica da forma apo (a verde-código PDB:3BUB) e da estrutura cristalográfica do complexo com a swainsonina (a laranja-código PDB:3BLB)

apenas representam uma conformação da proteína, não significando que seja a de menor energia e em princípio a mais provável. Desta forma, apesar de estes aminoácidos estarem mais afastados, acredita-se que o conjunto das estruturas obtidas por DM /MM seja o mais verosímil.

6.3 Resultados do docking realizado

Ao todo sujeitaram-se a *docking* 138 moléculas (anexo 2) contra 19 estruturas da Golgi α -manosidase. Esta análise focou-se principalmente nos derivados mais promíscuos, i.e, os que possuem maior afinidade para todas as estruturas testadas.

No *docking* realizado verificou-se que, apesar das diferenças estruturais entre as várias conformações usadas, as afinidades dos ligandos foram, em geral, bastante semelhantes para todas as conformações (ver tabela I anexo 1), havendo na maior parte dos casos, apenas uma diferença máxima de $\approx 1,5$ kcal/mol, o que significa que as diferenças conformacionais tanto nos modelos obtidos por raios-x como nos que foram obtidos por DM/MM não condicionam em demasia o comportamento dos ligandos. Porém, para as conformações obtidas por cristalografia de raios-x verifica-se uma maior diferença dos valores de afinidade entre os vários modelos, indicando assim, uma maior dissemelhança entre as conformações.

Relativamente aos primeiros 25 ligandos que aparecem no *ranking* (tabela I, anexo 1- a verde), verifica-se que a maior parte são derivados da swainsonina, exceto 5, sendo os restantes moléculas retiradas da base de dados PubChem. A maior parte dos derivados da swainsonina nesta situação possuem cadeias laterais longas capazes de alcançar o local de *holding* da enzima.

Para este tipo de derivados da swainsonina, o seu *posing* possui duas variáveis:

- A possibilidade de o *core* da swainsonina se ligar no local correto do centro ativo (no local catalítico)
- No caso de o *core* swainsonínico se ligar corretamente ao local catalítico, o facto de a ligação ser estabelecida como previsto ao local de *holding*.

Na maior parte dos casos, constatou-se que estes derivados se ligavam na orientação contrária à suposta, i.e, o núcleo de swainsonina orientado para o local de *holding* e a porção que mimetiza a manose do substrato ligada ao local catalítico (figura 43). De facto, esta é uma hipótese de ligação verosímil que deve ser considerada, uma vez que esta porção da molécula é bastante similar à manose pertencente ao substrato e consegue realizar todas as interações importantes para a inibição como visto no capítulo anterior: a ligação ao zinco, várias pontes de hidrogénio com os resíduos circundantes e interações hidrófobas com o triptofano 95. Este comportamento observou-se tanto nas estruturas obtidas por modelação molecular como para as obtidas experimentalmente. Porém, é de notar que houve uma maior quantidade de orientações corretas, apesar de alguns serem menos prováveis, para as estruturas obtidas por DM. Apesar disso, é de notar que a grande maioria destes orientações corretas, apenas o núcleo swainsoninínico se ligou na orientação prevista ao local catalítico enquanto que a cadeia lateral não se ligou no local previsto e em vez disso, ou ficou projetada para o exterior do centro ativo ou se ligou por cima do núcleo swainsonínico, como consequência da ausência do triptofano 95 na naquela posição (figura 44). Também é de realçar que estas moléculas, devido ao seu grande tamanho possuem bastante flexibilidade que se reflete em orientações mais variáveis.

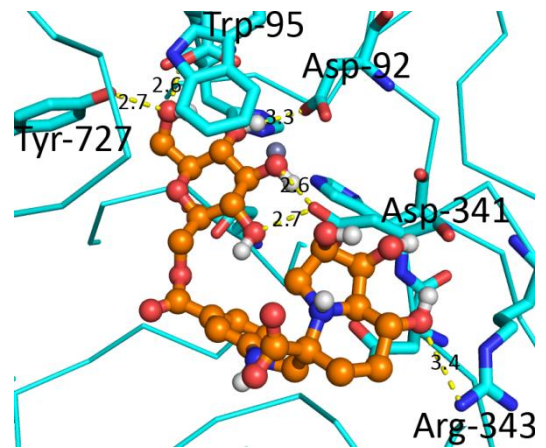


Figura 43-Ligação de um derivado da swainsonina (SC17) à estrutura 3EJ1. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

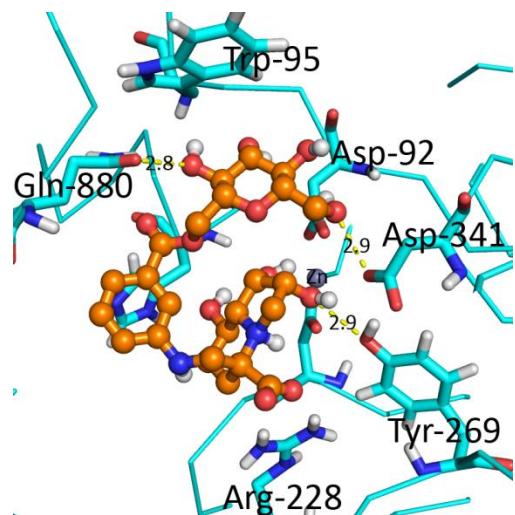


Figura 44-Ligação de um derivado da swainsonina (SC1) à conformação 98586. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

As azaswainsoninas com cadeias desta extensão orientaram-se da forma prevista no docking contra as estruturas experimentais, (figura 45) na medida em que a sua ligação ocorreu da melhor forma previsível, em que o núcleo swainsonínico se ligou à porção catalítica e o outro grupo na porção de *holding* como previsto. Para além de mostrarem elevada afinidade.

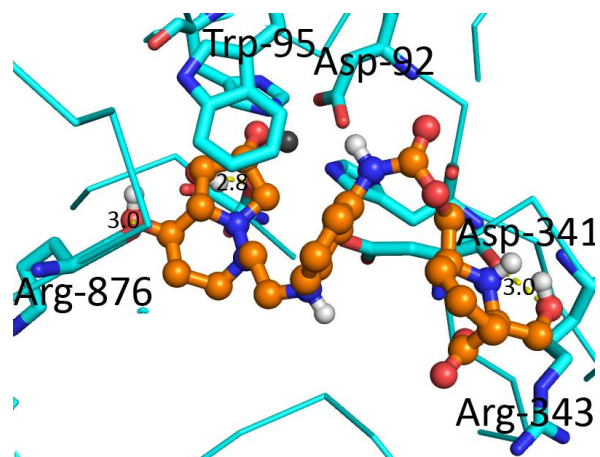


Figura 45-Ligação de uma azaswainsonina (AC1) à estrutura 1HXK. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

É importante referir que estes derivados complexos mostram elevada afinidade e estão nos primeiros lugares do *ranking*. Apesar disto, não significa que sejam verdadeiramente mais ativos, uma vez que o *docking* tem tendência para sobrestimar a afinidade das moléculas, uma vez que esta afinidade de ligação está intimamente relacionada com o tamanho molecular e é uma função aditiva, ou seja, há tendência para que quanto maior o ligando, maior a afinidade, sem incluir efeitos de cooperatividade positivos ou negativos.[62-64] Também é importante salientar que apesar de uma molécula mostrar elevada afinidade, não implica necessariamente ligar-se na orientação mais correta.

Relativamente aos restantes derivados da swainsonina, constatou-se que para as azaswainsoninas em geral, necessitam da presença do triptofano 95 para fixarem-se numa posição correta para a ligação no centro ativo, assim, as interações hidrófobas entre os dois grupos são essenciais para a ligação à enzima. Os derivados da swainsonina ligaram-se da forma previsível às estruturas que não possuíam o triptofano 95 nessa posição. Verificou-se que uma grande parte dos derivados desta molécula possui uma maior afinidade do que a swainsonina. Para os derivados que possuem cadeias laterais com anéis aromáticos, algumas *binding poses* ocorrem na orientação não prevista em que o anel aromático ocorre para a direção do átomo do zinco em vez de se ligar para o exterior do centro ativo, realizando interações π - π com o triptofano 95.

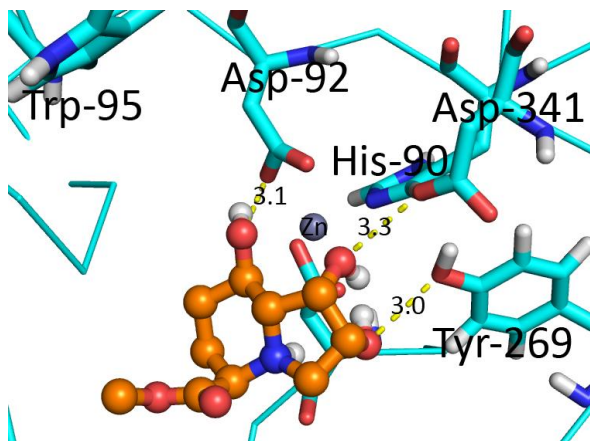


Figura 46-Ligação de um derivado da swainsonina (S17) à estrutura 98568. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

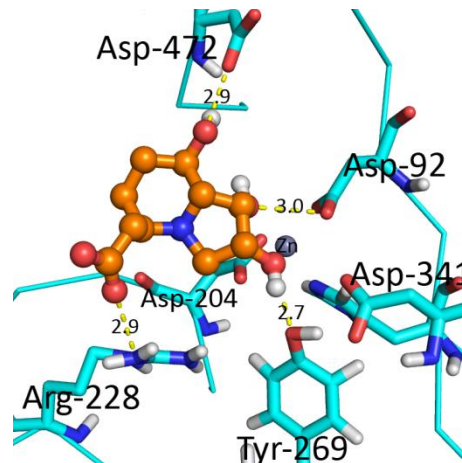


Figura 47-Ligação de um derivado da swainsonina (S19) à estrutura 98566. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

Para os derivados da swainsonina substituídos na posição 5 verificou-se que nas cadeias laterais com o carbonilo na posição α , este não realiza interações em particular com nenhum aminoácido. (figura 46) Porém se estiver na posição β , já consegue interagir com alguns resíduos como a arginina 228. Outros grupos na posição β também contribuem para a atividade como grupos hidroxilo ou amina em que podem realizar pontes de hidrogénio com resíduos como o aspartato 341 e a tirosina 269 (figura 47).

No caso do análogo que possui uma cadeia lateral amina CH_2NH_2 é de notar que esta molécula possui três protómeros que existem em proporções semelhantes ($\approx 30\%$ cada), que são os seguintes:

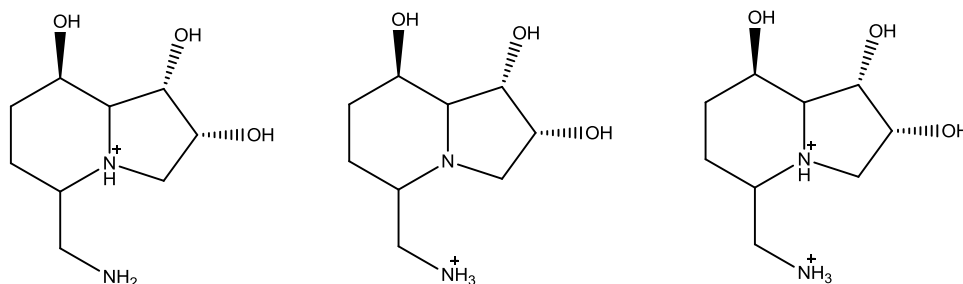


Figura 48-Protómeros existentes para o derivado com a cadeia lateral CH_2NH_2 .

Estes três protómeros mostram afinidades bastante semelhantes com diferenças na ordem de 0,1 kcal/mol, mas a primeira forma é mais favorecida nas conformações obtidas experimentalmente.

Para a swainsonina, é possível ter ligandos dissubstituídos na posição 5. Neste caso verificou-se que o grupo CH₂OH realiza várias interações com aminoácidos mais afastados do centro ativo e nalguns casos, ocorre um ligeiro deslocamento da molécula do local catalítico onde está o zinco levando assim a uma menor afinidade (figura 49). Os análogos 33 e 34 (figura 50) da swainsonina são dissubstituídos, mas com um segundo anel. Ambos os derivados não usam o anel para realizar interações significativas com a proteína. O análogo 33 mostrou maior afinidade de que o 34, porém isso deve-se ao facto de o análogo 33 ser mais volumoso e haver uma sobrestimação da afinidade.

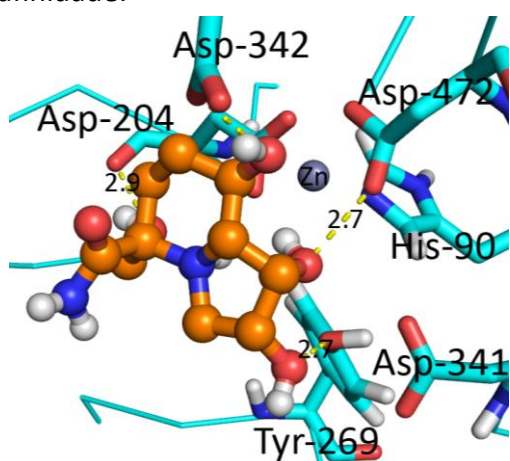


Figura 49-Ligação de um derivado dissubstituído (S30) à estrutura 98571. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

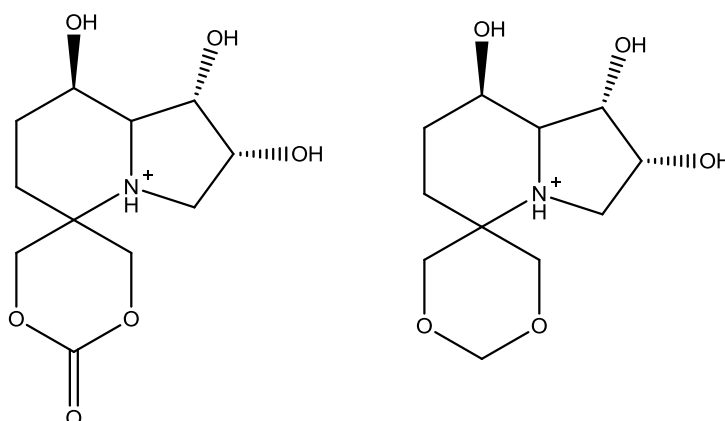


Figura 50-Estruturas dos análogos 33 e 34, respetivamente

Os derivados com cadeias alifáticas também não estabelecem interações relevantes para a atividade, havendo mesmo o risco de perturbarem a esfera de hidratação da enzima, devido ao efeito hidrófobo.

Em relação aos inibidores já caracterizados foi possível observar que, para as moléculas com cadeias laterais longas e que possuem grupos aromáticos como a swainsonina, a pirrolidina e o anel lactâmico substituídos na posição 5, as conformações obtidas foram bastante variáveis para todas as conformações usadas, sendo algumas bastante similares às experimentais (figura 51).

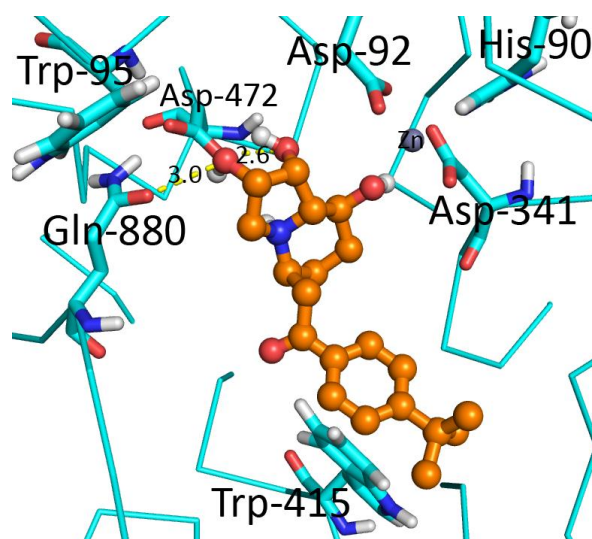


Figura 51-Swainsonina 5-substituída ligada à estrutura 98570. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

Para a glucoxima, o derivado de manostatina e ao manoimidazole, verificou-se que a presença do resíduo de triptofano 95 é essencial para a sua fixação correta no centro ativo de forma a realizar as interações que conduzem à maior afinidade possível para a enzima, porque as conformações ocorridas nas estruturas obtidas experimentalmente são mais próximas das estruturas experimentais. Inversamente, verificou-se que a swainsonina mostrou conformações corretas com alta probabilidade em quase todas as estruturas testadas (incluindo as que foram obtidas por PCA), justificando assim a elevada afinidade da mesma comparativamente aos outros inibidores, uma vez que é uma molécula suficientemente plástica para se ligar a várias estruturas proteicas (figura 52). No capítulo anterior verificou-se que a interação iónica e ponte de hidrogénio da swainsonina com o aspartato 204 é particularmente próxima, sendo

possivelmente essa a razão para essa promiscuidade. Para a tioswainsonina, a maior parte das conformações obtidas mostram-na ligada ao zinco por um grupo hidroxilo em posições variáveis, como também ocorre na literatura. Porém, as orientações mais prováveis a seguir às primeiras, mostram a molécula a afastar-se do local catalítico como ocorreu nas simulações de DM/MM. Para a glucoxima, verificou-se que havia modos de ligação em que se ligava ao zinco por dois grupos hidroxilo mais afastados, que o costume, tendo, porém, uma afinidade semelhante à da swainsonina. No

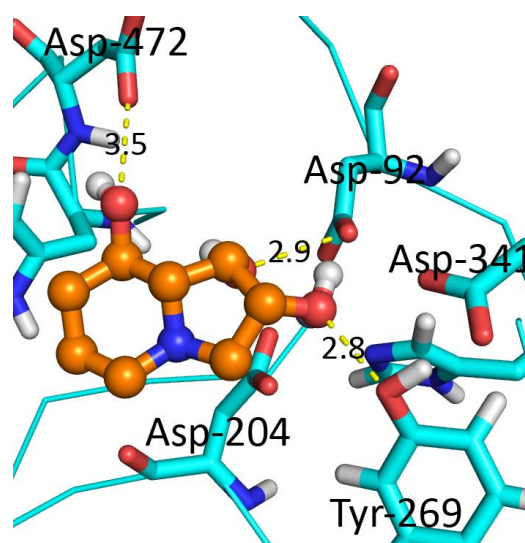


Figura 52-Swainsonina ligada à estrutura 98568.

que diz respeito às afinidades, foi interessantes verificar que as moléculas não mostraram o máximo de afinidade para as correspondentes estruturas. Para além disso, ocorreu na mesma um ligeiro aumento de afinidade para os ligandos que possuem cadeias laterais mais longas devido ao seu tamanho molecular. O que significa que o facto de o inibidor ser carregado não é uma condicionante para a inibição, apesar de ajudar à inibição uma vez que mimetiza a carga do estado de transição.

No que respeita às moléculas retiradas da base de dados do PubChem, a maior parte não teve uma afinidade relevante. Porém, observaram-se as mesmas condicionantes que nas demais, como por exemplo pelo triptofano 95, que é útil para fixar as moléculas na melhor posição de ligação e os ligandos com grupos aromáticos também tem tendência a ligar-se na orientação inversa à prevista.

Um ligando interessante é o CID 449437 (figura 53), que consiste num derivado de dextrano e pode cobrir uma grande área do centro ativo, chegando nalgumas orientações a atingir zona de *holding* da proteína. Outro ligando interessante é o CID 124021 (figura 54), que é a β -glucogalina e é isolada de uma planta e já foi testada contra a aldose reductase envolvida na diabetes [65]. O importante desta molécula é que tem dois anéis com vários grupos hidroxilo, mas um é alifático (anel de glucose) e outro aromático. O docking mostra que o principal modo de ligação, nas conformações obtidas por cristalografia é com o grupo aromático no local catalítico e o anel de glucose interage com os aminoácidos do restante centro ativo chegando a atingir alguns no local de *holding*. Nas conformações obtidas por dinâmica molecular, liga-se de forma inversa, mas o anel aromático também interage com a região de *holding*, tendo assim potencial para ser otimizado de forma a ser seletivo. Um fragmento também passível de otimização é o CID 441437 (figura 55), que é o quercitol e é uma molécula que já foi testada contra a α -glucosidase [66], esta molécula liga-se de uma forma previsível à enzima no centro ativo, para todas as conformações obtidas experimentalmente e em algumas das conformações obtidas por PCA.

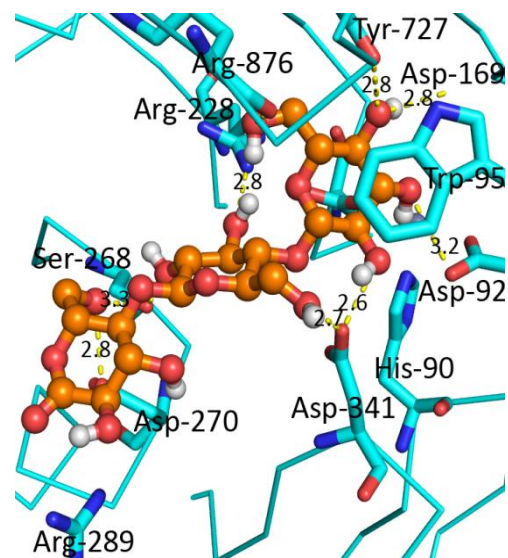


Figura 53- CID 449437 ligado à estrutura 3D4Y.

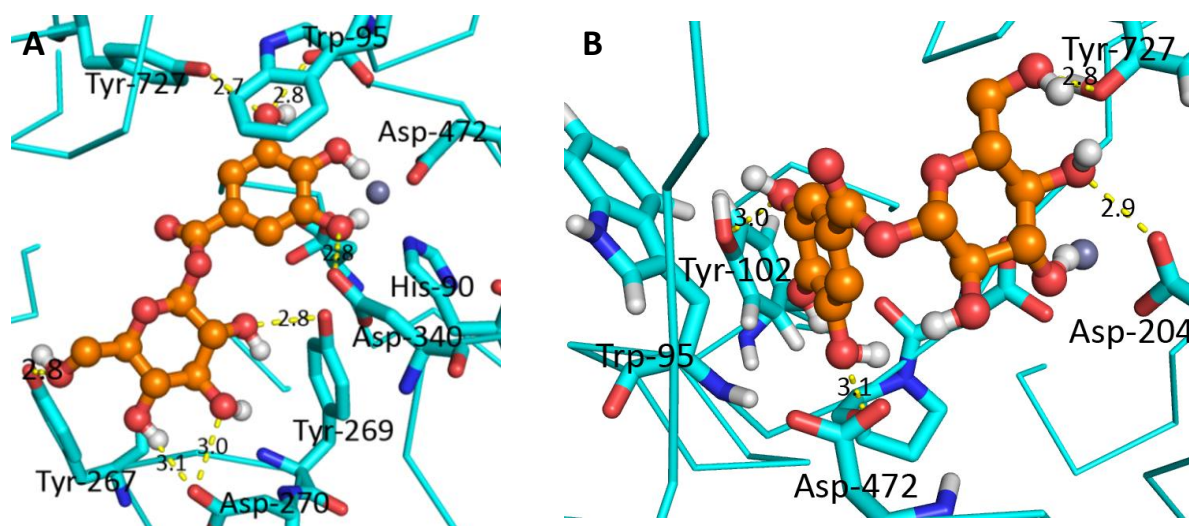


Figura 54- A-CID 124021 ligado à estrutura 1HXK. B-CID 124021 ligado à estrutura 98572. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

Por fim, relativamente aos alcaloídes encontrados na literatura, ficaram nos últimos lugares do ranking global, porque a maior parte não se ligou de uma forma favorável ao local ativo e os poucos que se ligaram mostraram uma afinidade fraca que está correlacionada com o modo de ligação. Por exemplo, a pirrolidina 6 apenas se liga com um grupo hidroxilo ao zinco e a indolisina 1 (figura 56) até se liga com dois hidroxilos, mas a está muito distante e os hidroxilos estão muito longe um do outro e a ligação acaba por ser fraca.

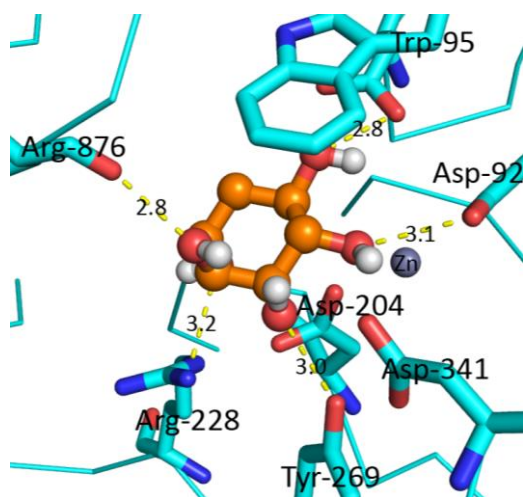


Figura 55- CID 441437 ligado à estrutura 3BLB. A amarelo estão as pontes de hidrogénio.

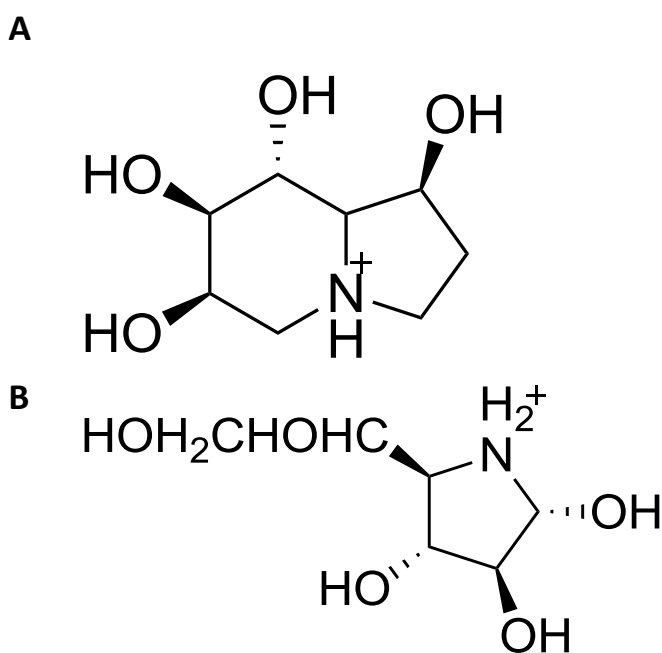


Figura 56- A-Estrutura da indolisina 6. B- Estrutura da pirrolidina 1.

7. Cálculos de energia livre

7.1 Cálculos de Interação termodinâmica

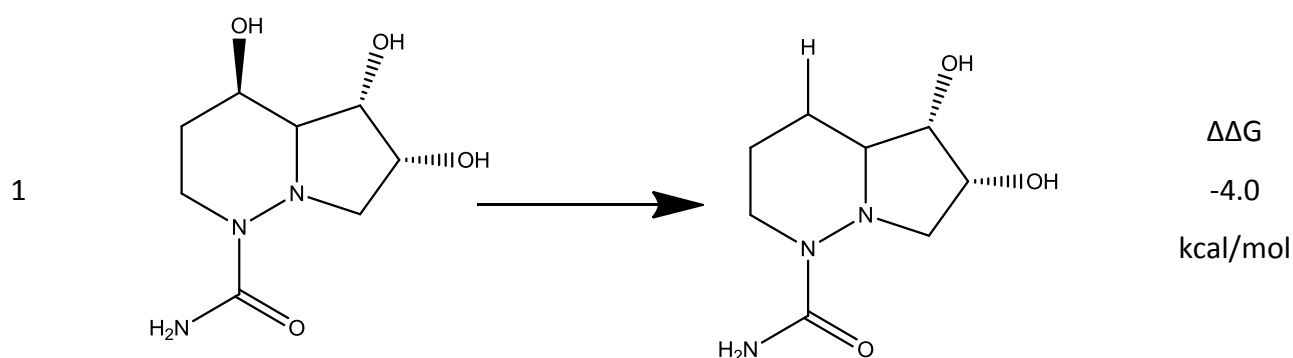
Esta parte do trabalho focou-se no estudo de relações estrutura-atividade e continuar a avaliação a atividade de vários derivados da swainsonina com o objetivo de encontrar novos derivados com maior atividade e eventualmente maior seletividade para a GMII.

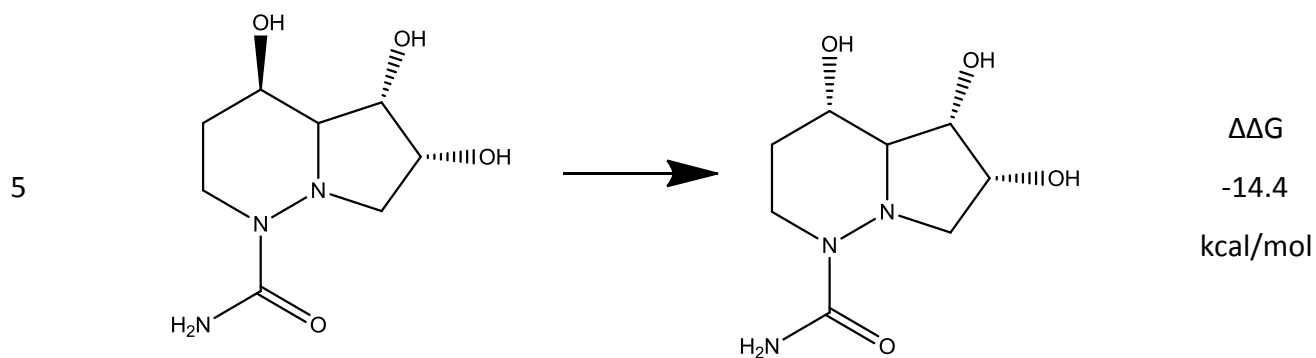
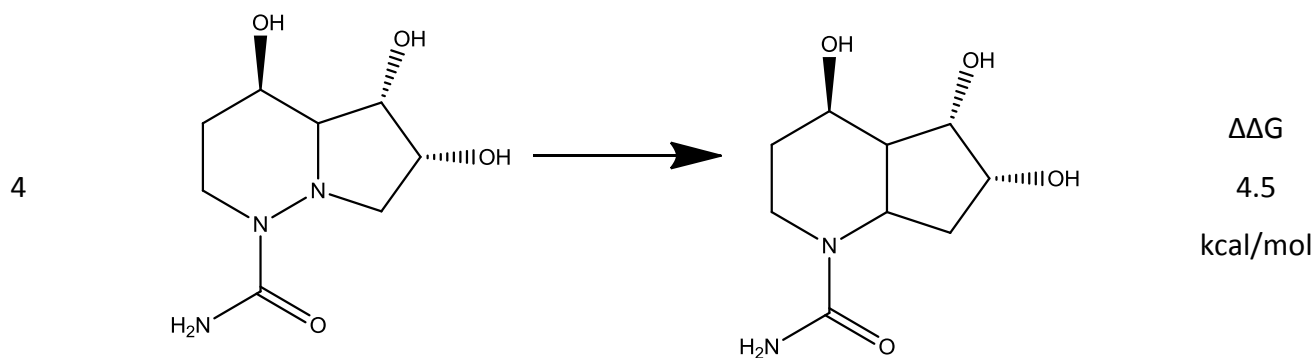
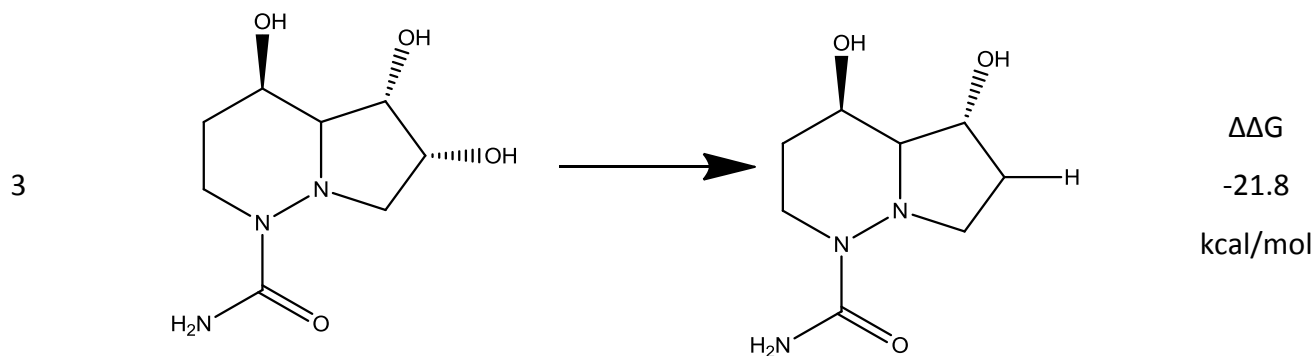
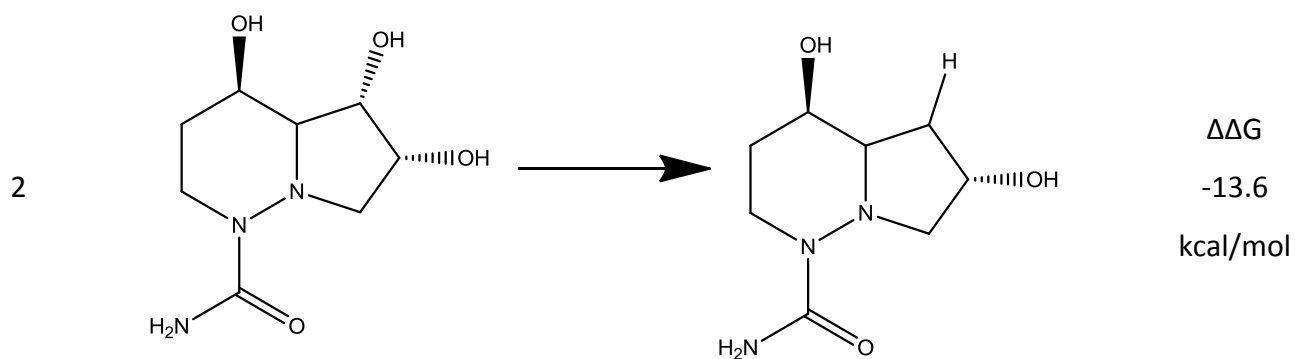
Os derivados da swainsonina testados por esta metodologia foram as azaswainsoninas. Estas moléculas possuem um azoto extra na posição 5 e uma cadeia lateral variável.

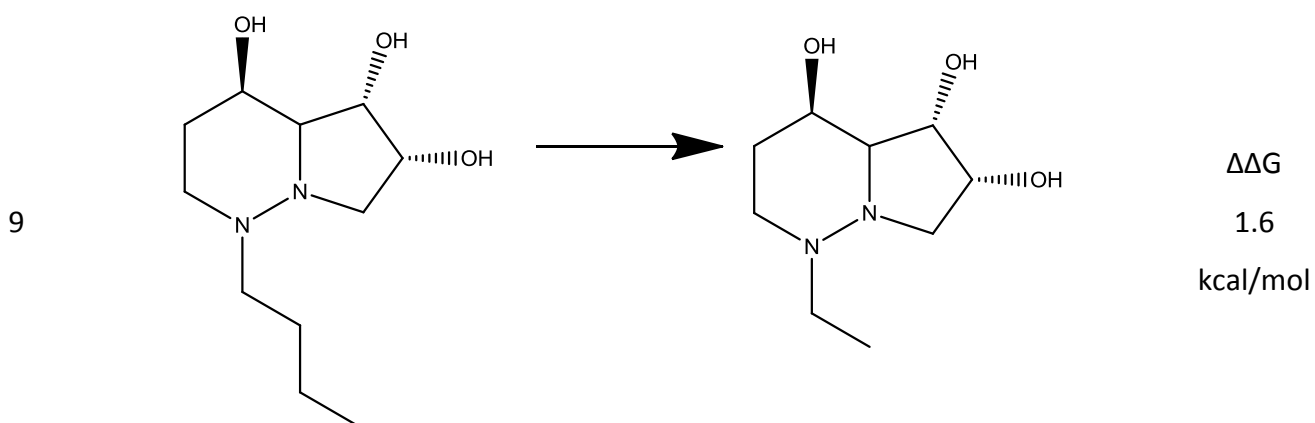
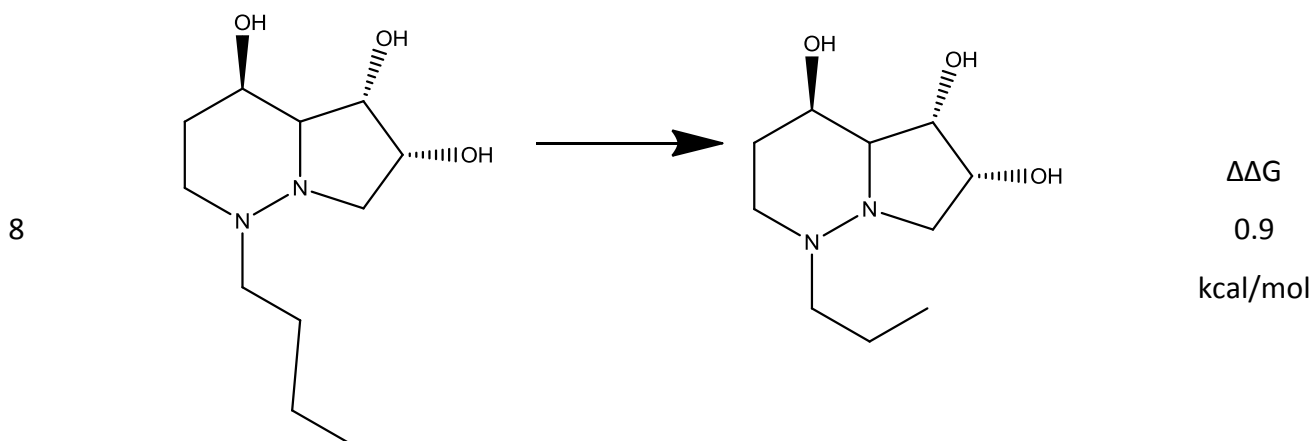
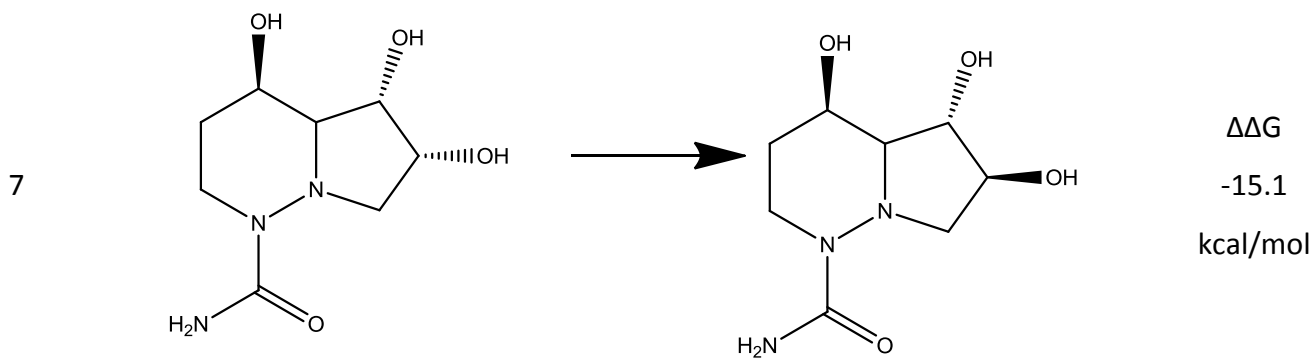
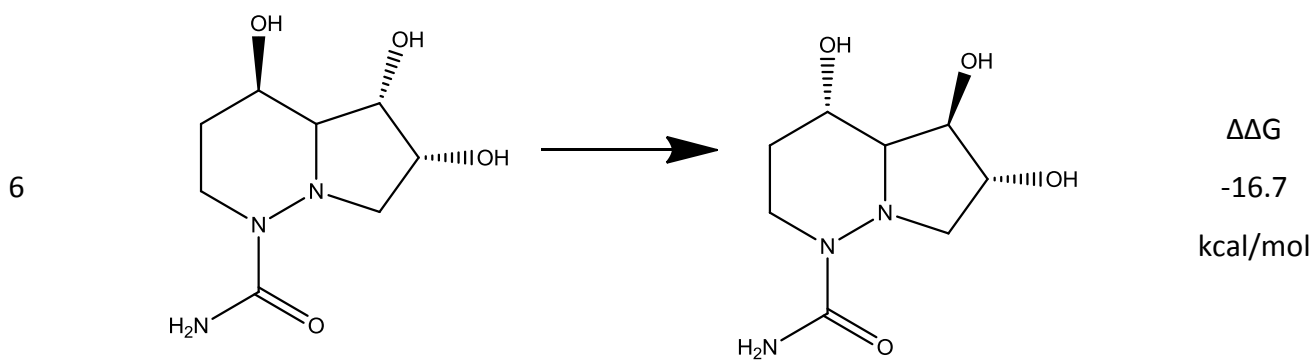
Para os cálculos de interação termodinâmica utilizou-se um ciclo termodinâmico, como explicado no capítulo 2. Assim, é possível quantificar a diferença energética entre um estado inicial e final. É de realçar que esta metodologia apenas permite calcular a diferença de energia livre relativa entre dois estados e não a energia livre absoluta de ligação. Como indicado no capítulo 2, um valor de $\Delta\Delta G$ negativo indica que o primeiro estado é mais favorecido energeticamente, enquanto que um valor de $\Delta\Delta G$ positivo indica que o segundo estado é mais favorecido. Este método é o mais rigoroso que existe para calcular a energia livre de ligação de moléculas.

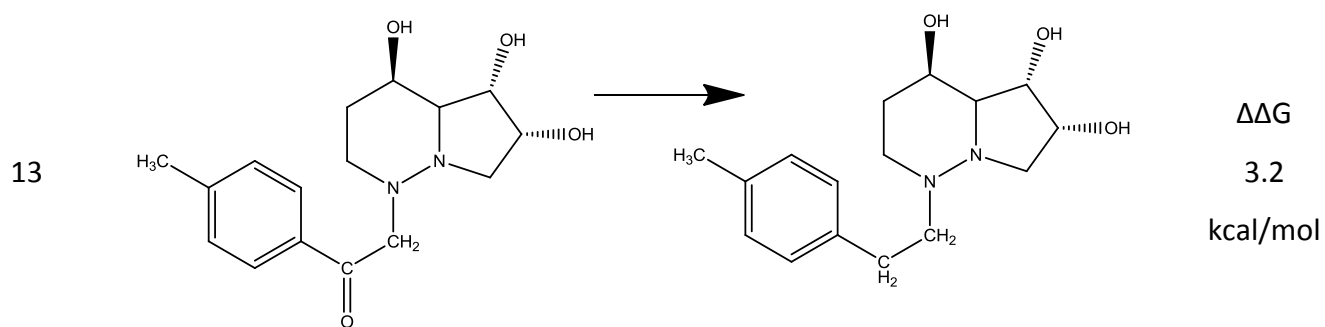
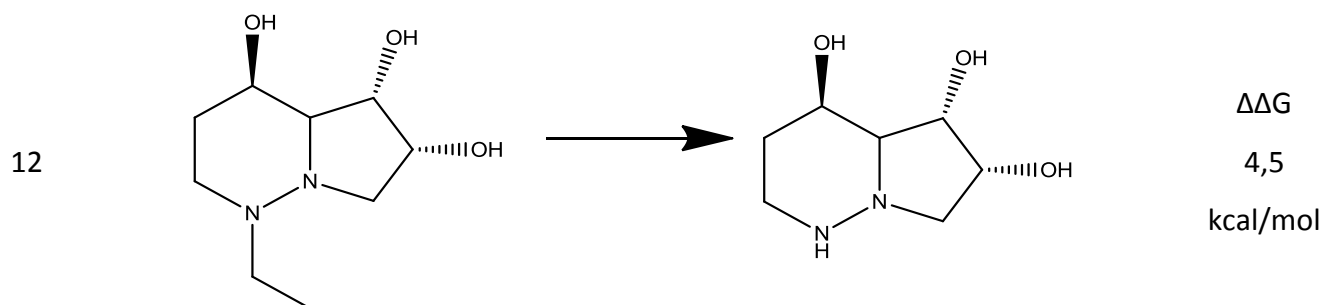
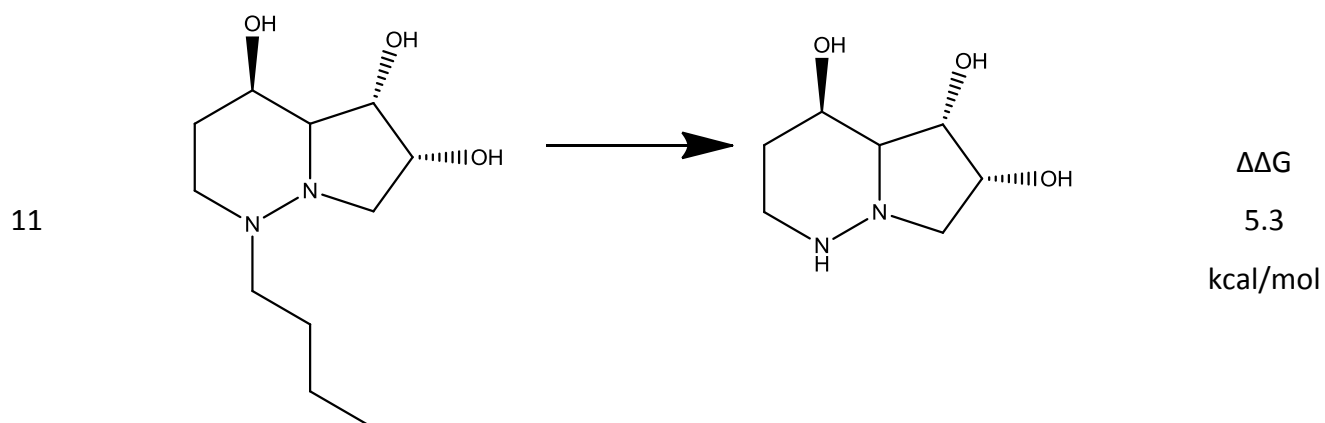
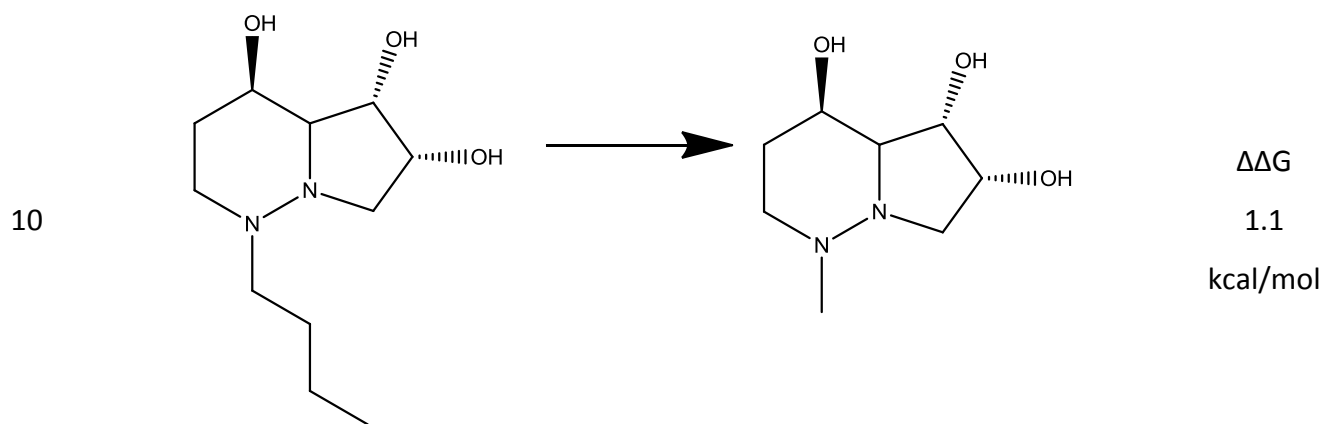
Desta forma testou-se a contribuição energética para a afinidade de várias cadeias laterais possíveis e o efeito de várias modificações nas mesmas. As conclusões obtidas são aplicáveis tanto a swainsoninas como azaswainsoninas.

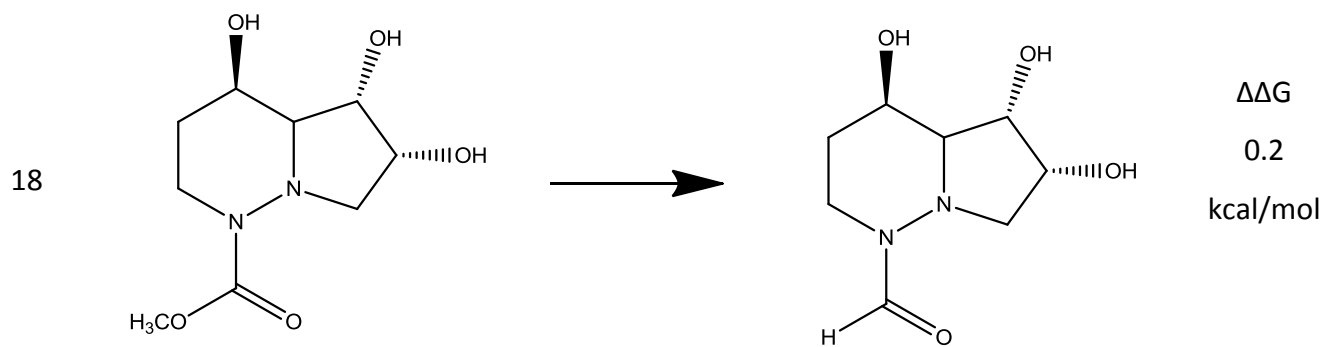
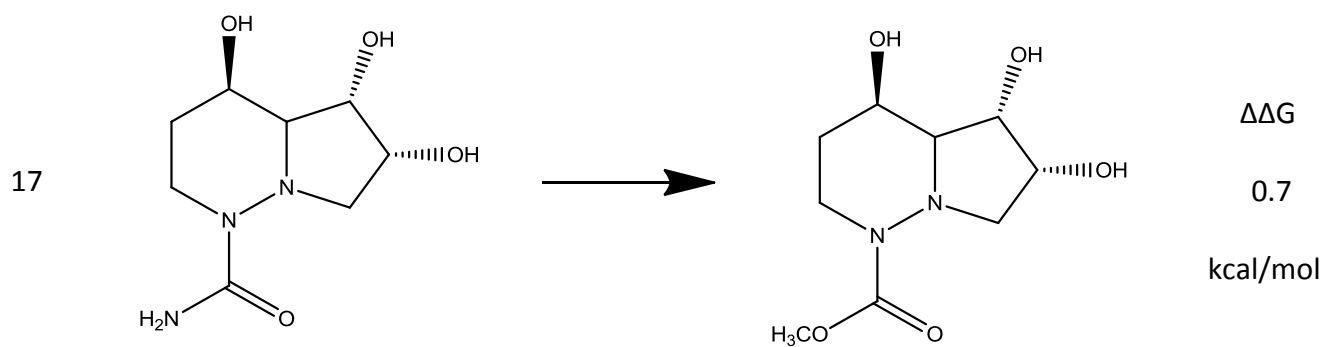
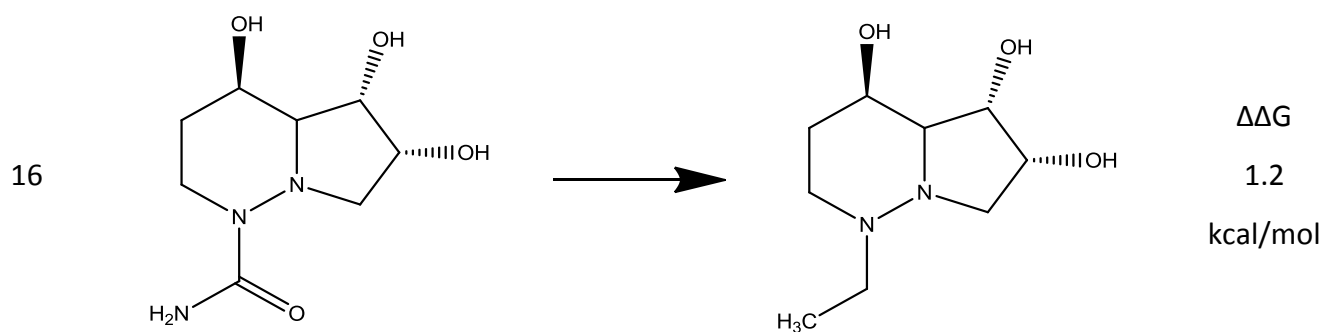
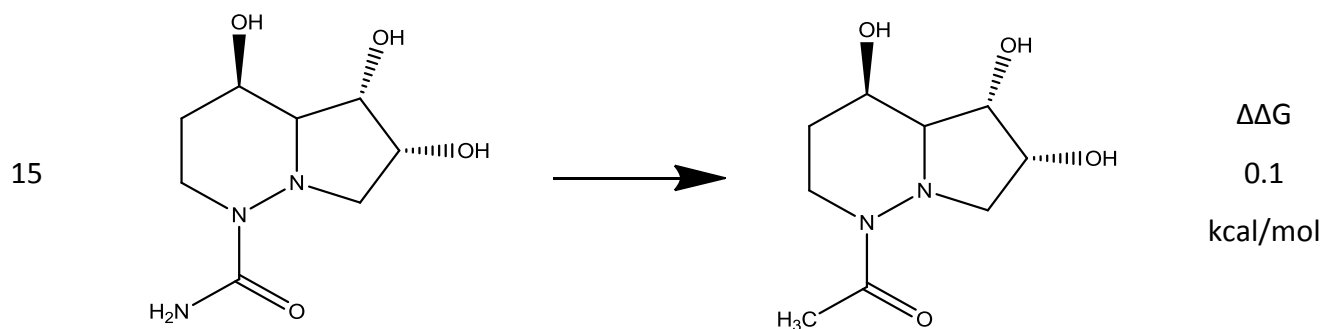
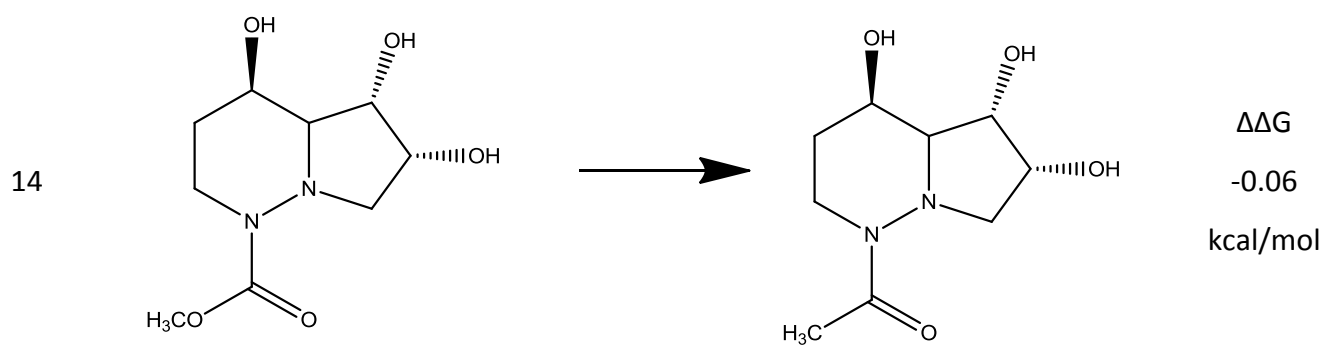
Tabela III- Transformações de integração termodinâmica realizadas com azaswainsoninas possuindo várias cadeias laterais e respetivo $\Delta\Delta G$

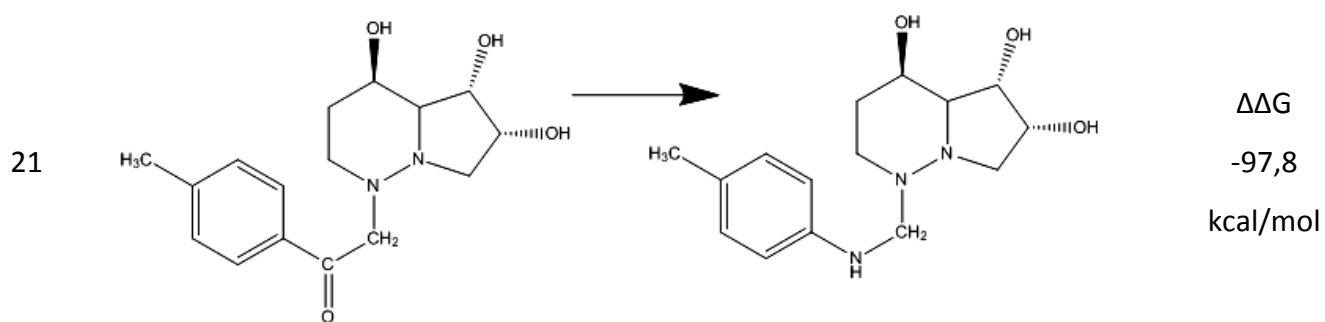
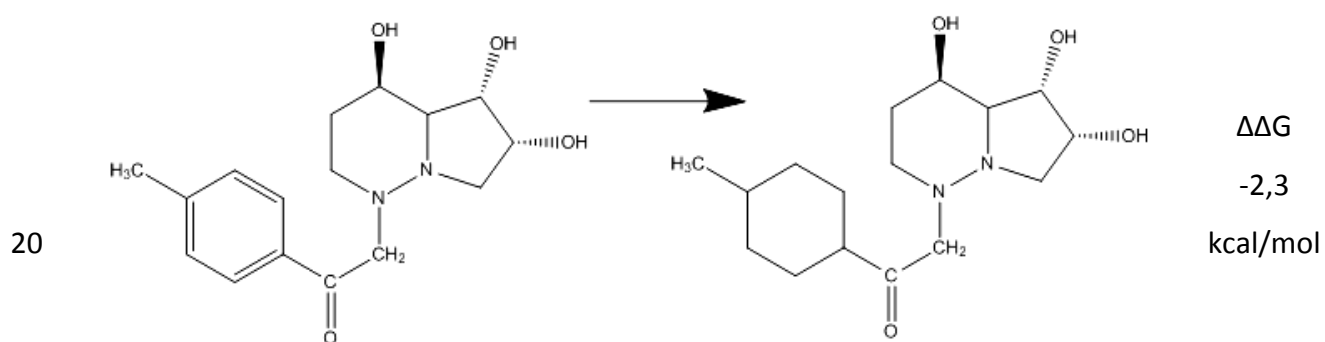
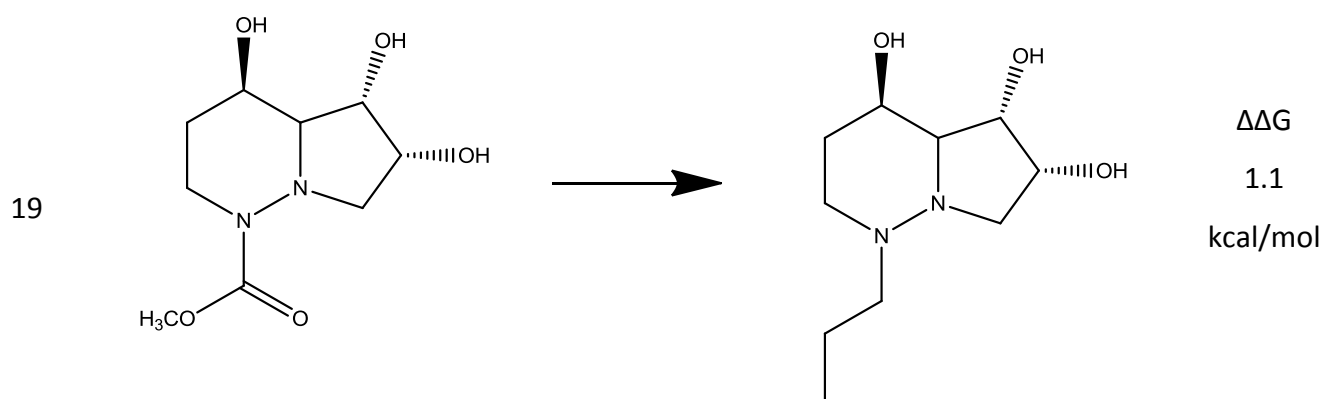


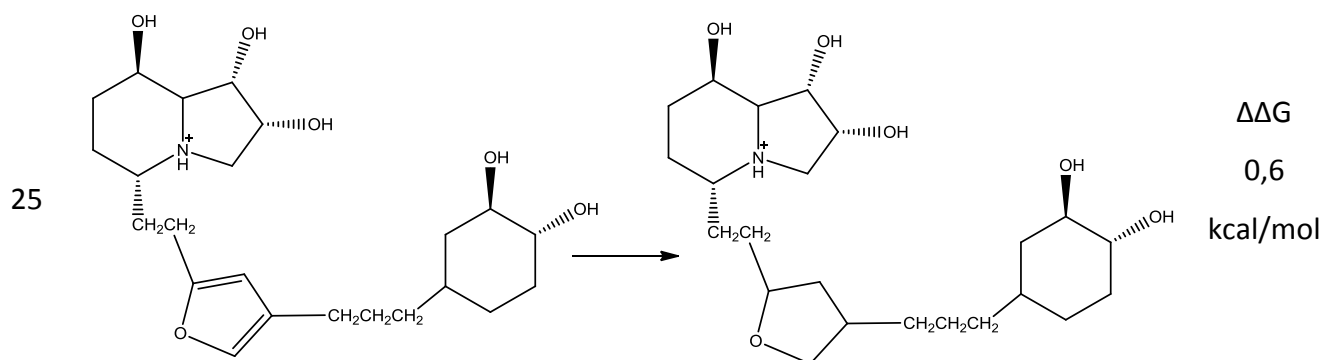
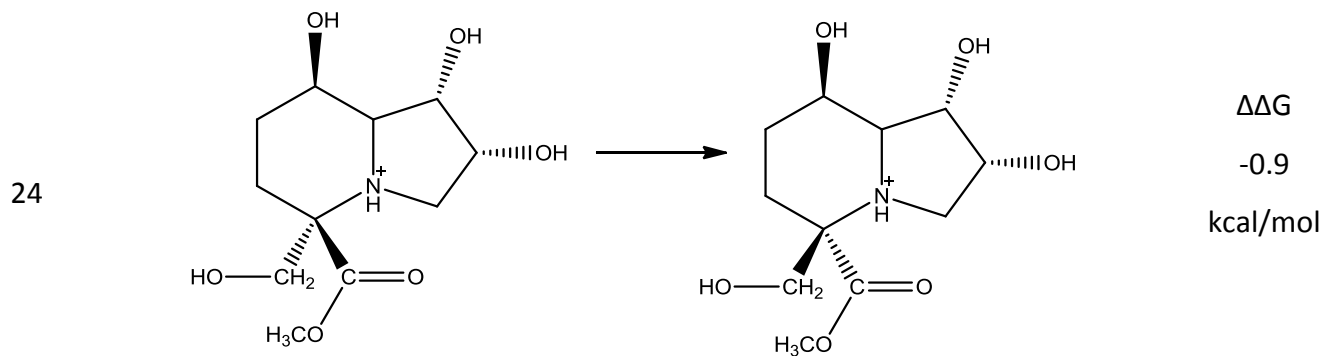
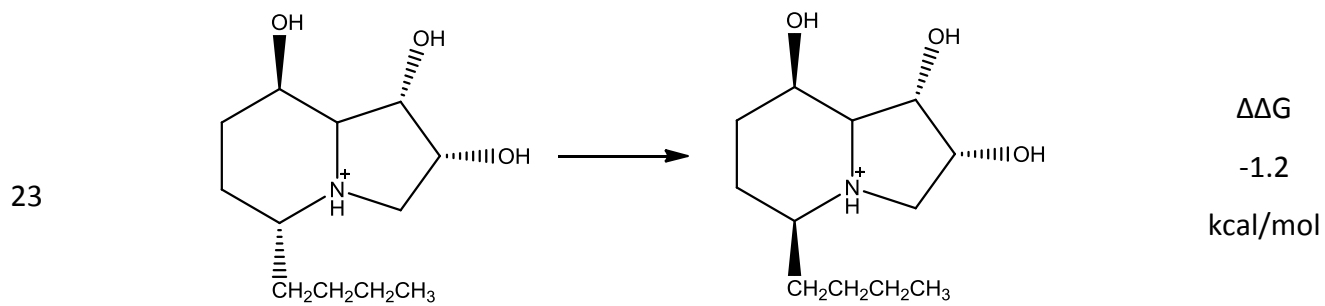
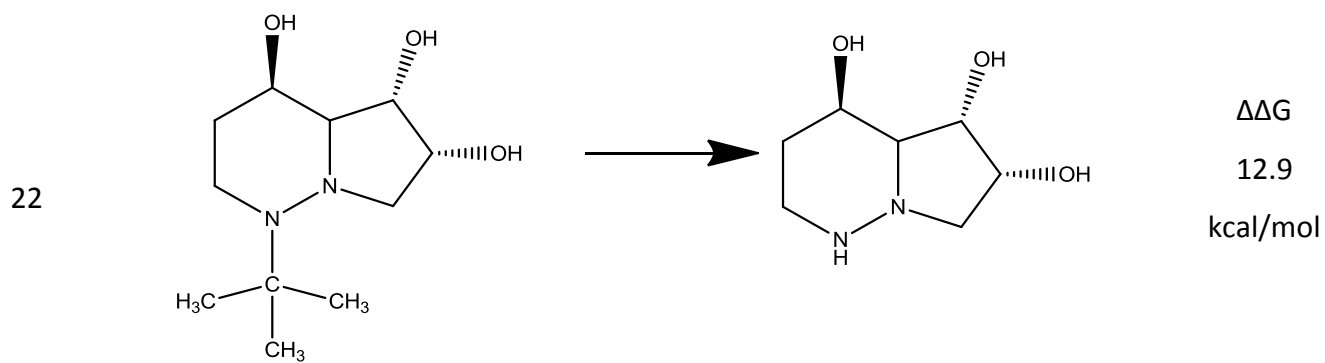


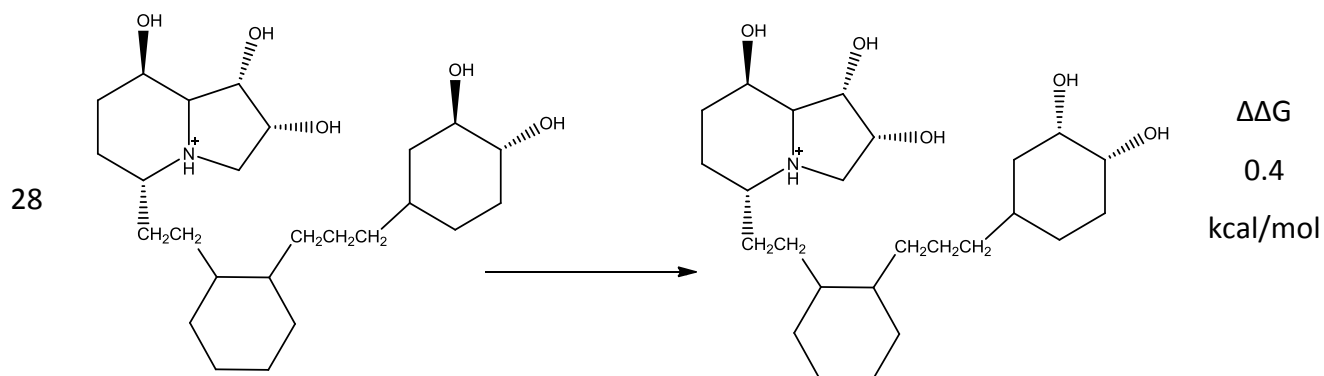
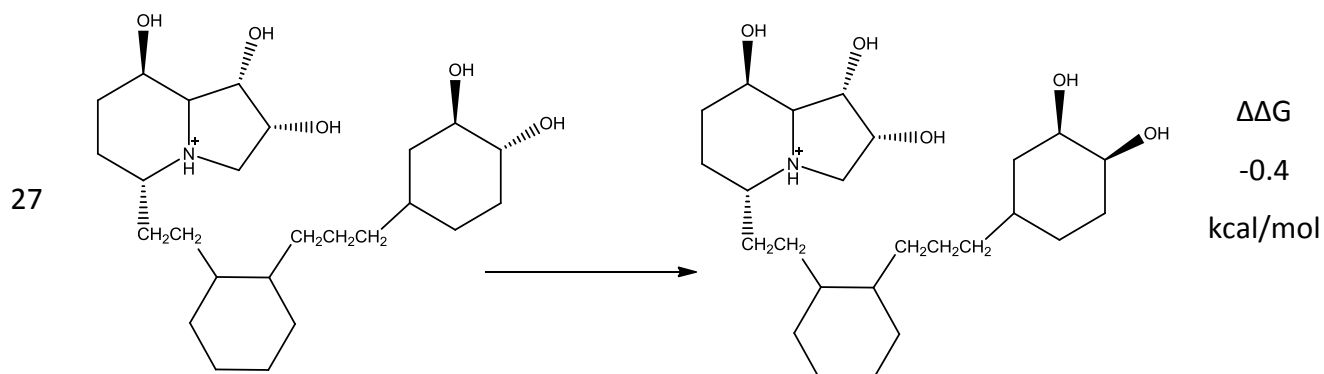
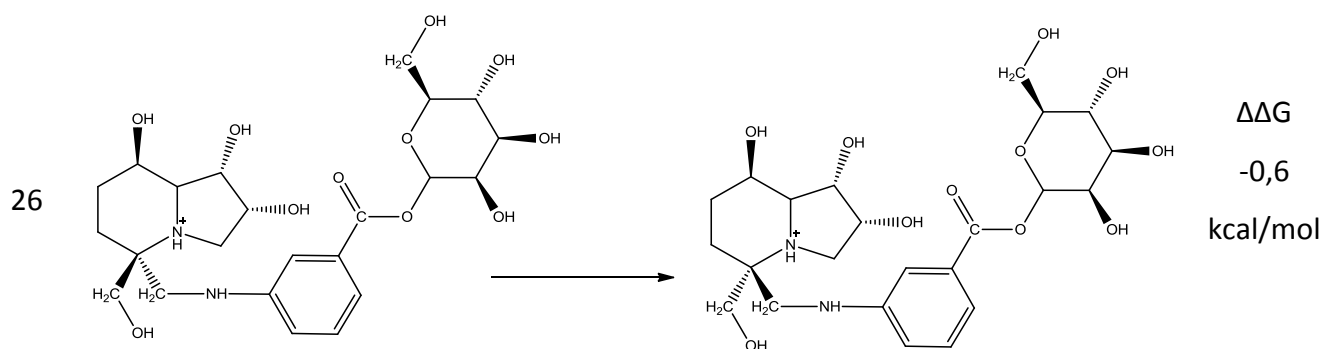












Através das experiências acima realizadas é possível concluir que:

Os grupos hidroxilo nas posições 1 e 2 são importantes para a ligação à enzima, como se pode observar nas transformações 1, 2 e 3. A sua estereoquímica também é importante, sendo que para os grupos nas posições 1 e 2, a estereoquímica mais favorecida é para trás e para o grupo na posição 8 é para a frente (transformações 1 a 6).

Para cadeias laterais alquílicas, quanto menor o seu tamanho mais favorável é a ligação da molécula), traduzindo-se em $\Delta\Delta G$ mais positivos à medida que o tamanho da cadeia alquílica diminui. Isto acontece devido ao efeito hidrófobo, uma vez que as cadeias alquílicas são hidrofóbicas e não interagem com as moléculas de água perturbando a esfera de hidratação da

proteína. Assim, qualquer cadeia alifática contribui para uma menor afinidade do que a sua ausência (transformações 8, 9, 10 e 11).

Relativamente às moléculas com cadeias laterais cetona, amida e aldeído, as transformações 14, 15, 17, 18 mostram que a diferença energética entre as várias cadeias laterais é bastante pequena (menos de 1 kcal/mol). Isto justifica-se porque os grupos amida, éster e cetona não realizam interações significativas com a proteína, perturbando apenas a esfera de hidratação (figura 57). Por isso, o aldeído como possui um grupo menos volumoso, a sua existência acaba por ser ligeiramente favorecida. No caso da transformação 19, uma cadeia alquílica acaba por ser ligeiramente mais favorecida porque ocupa um volume ligeiramente menor devido à ausência do grupo carbonilo.

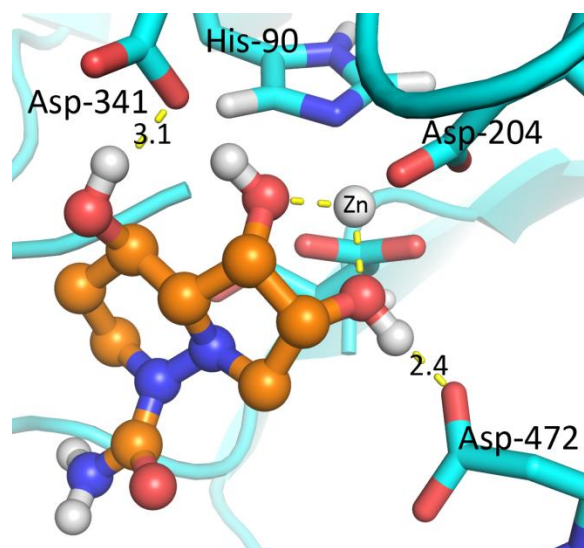


Figura 57- Ligação do derivado da azaswainsonina com uma cadeia lateral amida. As pontes de hidrogénio estão a amarelo.

Resolveu-se testar a cadeia $\text{CH}_2\text{COC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ nas transformações 13 e 20, porque Kuntz *et al* já tinham reportado que este tipo de cadeia lateral na swainsonina permitia aumentar a seletividade entre GMII e LM.

Para a transformação 13, os cálculos de IT mostraram que a ausência do grupo carboxilo naquela posição é favorecida, apesar de na literatura relatarem o contrário. Kuntz *et al* mostraram que o grupo carbonilo realiza pontes de hidrogénio com uma molécula de água do centro ativo, que por sua vez interage com o resíduo de Arg228. Nos cálculos de IT verificou-se um afastamento do grupo carbonilo dessa região. Assim, pode-se constatar que neste caso se observou uma fraca amostragem (figura 58).

Na transformação 20 verificou-se que a presença de um anel aromático permite uma maior afinidade do que um anel alifático, porque o ultimo possui um maior volume e acaba por realizar uma maior perturbação na esfera de hidratação.

Na transformação 21, quis-se testar o efeito de um dador de pontes de hidrogénio na posição previamente ocupada pelo grupo carbonilo e verificou-se que a sua existência é bastante desfavorável em comparação com o grupo carbonilo. Isto é devido ao facto de que o grupo amina realiza pontes de hidrogénio com várias moléculas de água circundantes e que acabam por perturbar a rede de moléculas de água.

Na transformação 23 constatou-se os que a estereoquímica dos substituintes na posição 5 da swainsonina é ligeiramente mais favorecida se estiver para trás e para os análogos dissustituídos, a estereoquímica é quase indiferente, sendo o grupo hidroxilo ligeiramente favorecido se estiver para trás. Isto acontece porque o grupo CH_2OH pode interagir com resíduos que estejam abaixo do plano, como o aspartato 204. Enquanto que as cadeias alifáticas são hidrófobas e se estiverem para cima vão perturbar mais a esfera de hidratação, do que se estiverem enterradas nos resíduos do centro ativo.

Para os anéis de 5 membros, nas swainsoninas com cadeias laterais mais complexas, os anéis alifáticos são ligeiramente mais favorecidos do que os aromáticos (transformação 25).

Os grupos hidroxilo no anel terminal (transformações 26 e 27) são essenciais para se ligarem ao local de *holding* mimetizando assim os mesmos grupos no substrato. A sua estereoquímica inicial é a mesma que existia no substrato, mas os cálculos de IT mostram que as diferenças energética entre a estereoquímica dos grupos e a inversa é bastante pequena, sendo assim indiferente o tipo de estereoquímica destes grupos.

7.2- Cálculos de MM-PBSA

Nesta fase do trabalho realizaram-se cálculos de MM-PBSA de alguns dos derivados da swainsonina. Os derivados testados foram aqueles que apresentaram maiores afinidades no procedimento de *docking*, principalmente os derivados mais complexos. Esta abordagem foi usada porque é um método mais rigoroso que o *docking*, mas menos rigoroso que a integração

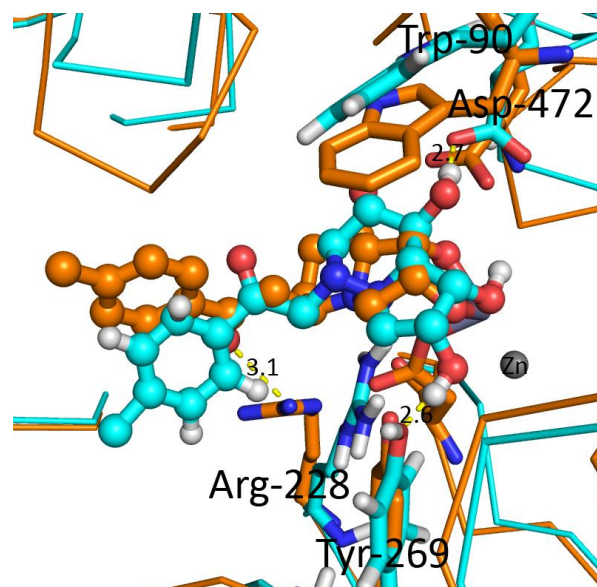


Figura 58- Ligação do derivado da azaswainsonina com a cadeia lateral $\text{CH}_2\text{COC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ com a estrutura 3EJQ obtida experimentalmente. As pontes de hidrogénio estão a amarelo.

termodinâmica, uma vez que faz uso de simulações de dinâmica molecular e assim todos os valores dão médias de um *ensemble* (de um conjunto grande de conformações), incorpora termos entrópicos e de solvatação. Para além disso, permite obter uma visão dinâmica do sistema. Através deste método é possível obter uma energia de ligação absoluta, ao contrário do método de integração termodinâmica. [36]

Porém, neste caso, observou-se que a maior parte das afinidades de ligação obtidas usando este método eram bastante baixas, não tendo significado físico (≈ 600 kcal/mol), desta forma, não podem ser usadas para estabelecer comparações a nível de afinidade. De fato, já tem sido reportado que este método pode apresentar alguns problemas na convergência de parâmetros energéticos, como a energia de solvatação e a energia interna e que estas energias podem apresentar erro devido às flutuações de energia devidas ao movimento do ligando e do local ativo e de outras partes da proteína mais afastadas do local ativo [36]. Neste caso, a grande fonte de erro, proveio dos cálculos eletrostáticos para calcular as energias de solvatação, especialmente no caso de ligandos carregados. Aconteceu que as energias de solvatação da proteína e do complexo eram bastante divergentes. Para minorar este problema, calcularam-se as várias parcelas energéticas da proteína e do complexo a partir da mesma simulação e utilizaram-se as estruturas obtidas a partir da titulação de resíduos, já feita anteriormente. Porém, o problema persistiu, concluindo-se que a sua causa seria o fato de os ligandos usados serem carregados. Para calcular a energia de solvatação utiliza-se o modelo de Poisson-Boltzmann, que faz uso da constante dielétrica do meio e da força iónica. A constante dielétrica é uma medida da capacidade de uma molécula se alinhar perante um campo eléctrico e a força iónica traduz a concentração de iões num dado meio. Considera-se que o meio é contínuo, ou seja, o solvente e os iões são implícitos. Assim, para uma proteína em solução existe uma constante dielétrica para a proteína e outra para o meio e o meio possui uma determinada força iónica. Geralmente a constante dielétrica de uma proteína oscila entre 2-5 e assume-se a mesma constante para toda a proteína.[67] Porém, podem existir regiões com um dielétrico diferente devido à presença ou a ausência de resíduos carregados, desta forma, pode acontecer o mesmo para os ligandos. Assim, para ligandos carregados, o dielétrico local vai ser alterado.[68] Uma das hipóteses experimentadas foi alterar a força iónica de forma a normalizar a contribuição do ligando, mas não resultou. Consultando a literatura atual, verifica-se que ainda não existe uma solução definida para este problema. Porém, Vinter *et al* estão a desenvolver um método para aumentar a precisão deste tipo de cálculos que consiste em estimar primeiro a

acessibilidade de resíduos carregados ao solvente e aplicar um dielétrico diferente aos mesmos com base nesta estimativa. Outro método em desenvolvimento por este grupo é aplicar vários dielétricos dependentes da distância, para reduzir o impacto dos resíduos mais carregados e distantes do centro ativo, apesar disto, tem como desvantagens reduzir o momento dipolar de hélices- α . [69]

Pelos motivos acima referidos, não vai ser referida a afinidade dos ligandos, mas a análise vai apenas ser focada no comportamento dinâmico dos derivados da swainsonina ligados à GMII, no caso de se ligarem na orientação prevista.

Para as azaswainsoninas verifica-se que não se deslocaram do local ativo. Todos os derivados realizam a ligação com o zinco através dos grupos hidroxilo, pontes de hidrogénio com a tirosina 727, o aspartato 472, 92 e 341 como aconteceu no *docking*. O carbonilo na posição α não realiza interações com nenhum resíduo como já tinha sido visto no *docking*, porém o grupo carboxilo e amida ainda realizam interações com a arginina 228 através de interações electrostáticas e pontes de hidrogénio, respetivamente (figura 59).

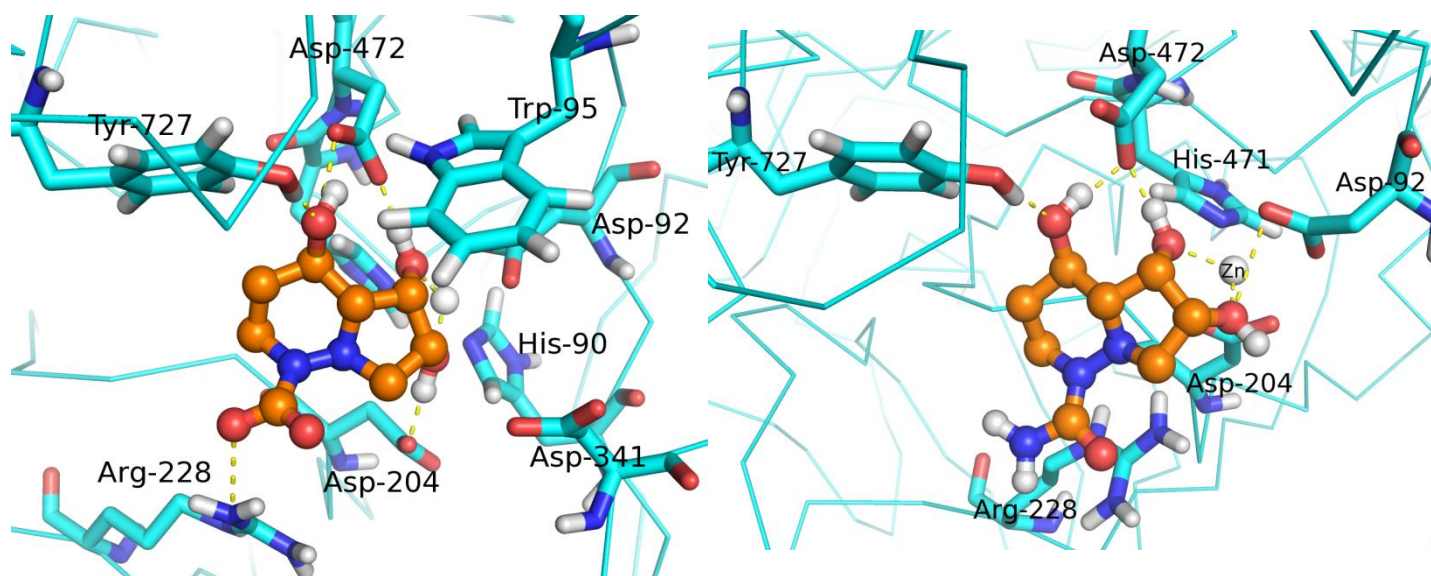


Figura 59-Modo de ligação das azaswainsoninas com grupos carboxilo e amida após 10ns de simulação

Para as azaswainsoninas com cadeias laterais adaptadas de moléculas já existentes e com anéis aromáticos, observa-se que estas cadeias laterais possuem maior flexibilidade e o grupo aromático pode realizar interações *edge-to-face* (π - π) com a Tyr-727, para a cadeia CONHC_6H_5 (figura 60).

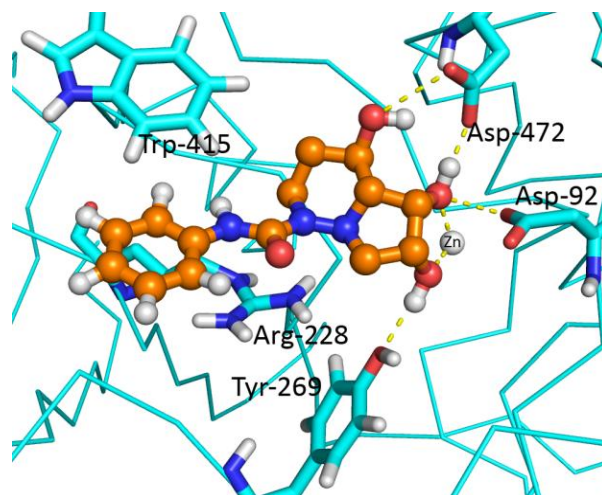


Figura 60-Modo de ligação da azaswainsonina com a cadeia lateral CONHC_6H_5 após 10ns de simulação.

O derivado que possui a cadeia lateral $\text{CH}_2\text{COC}_6\text{H}_5$ realiza interações catião- π com a Arg-228 e interações *edge-to-face* (π - π) com a Tyr-727. Para a cadeia lateral $\text{CH}_2\text{NHC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$ apenas interage com a Arg-228, por interações catião- π , para além das restantes interações comuns aos outros derivados (figura 61).

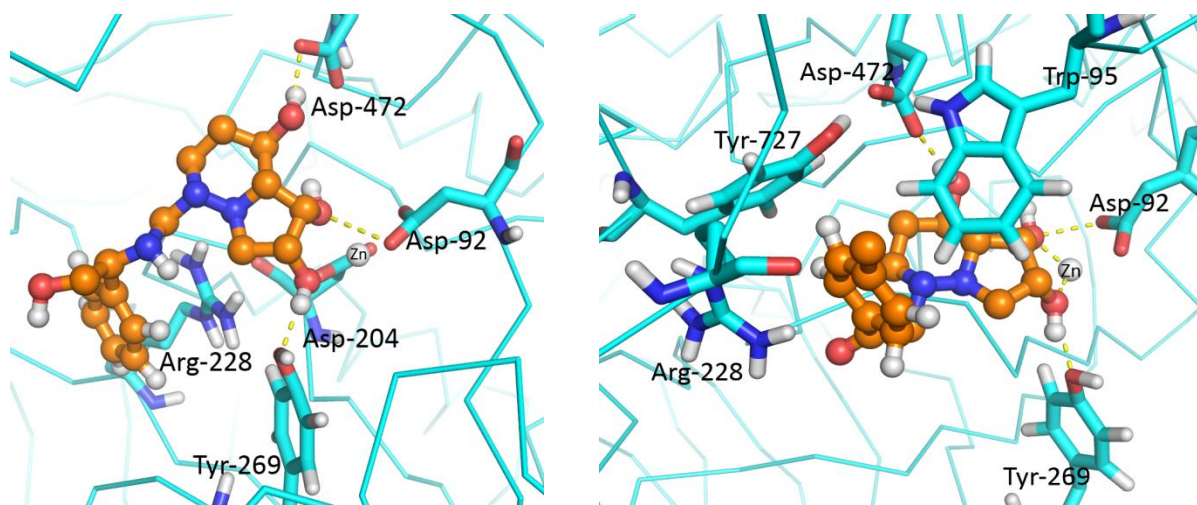


Figura 61-Modo de ligação das azaswainsoninas com as cadeias laterais $\text{CH}_2\text{NHC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$ e $\text{CH}_2\text{COC}_6\text{H}_5$, após 10ns de simulação.

Para os análogos da swainsonina observou-se também que realizam todas as interações importante para a ligação como a ligação com o zinco através dos grupos hidroxilo, pontes de hidrogénio com vários resíduos como a tirosina 727, o aspartato 472, 92 e 341 e ainda as interações iónicas com o aspartato 204 e interações catião $-\pi$ e $\pi-\pi$ com o triptofano 95 (figura 62). Assim, é possível constatar que os resultados são concordantes com o *docking*. As conformações finais obtidas entre swainsoninas e azaswainsoninas com as mesmas cadeias laterais foram semelhantes.

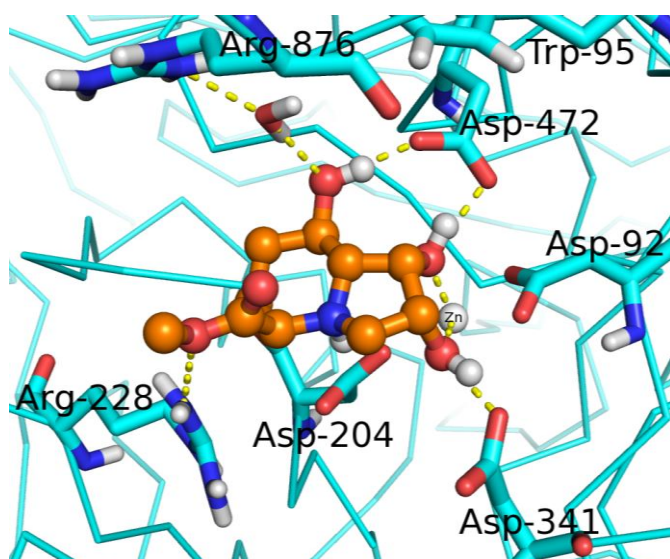


Figura 62-Modo de ligação da swainsonina com uma cadeia lateral éster.

Mais uma vez, verifica-se que a presença de um grupo funcional na posição β é mais favorecida em relação à posição α , porque permite que os grupos realizem interações mais intensas com resíduos mais distantes. Na figura 63 observa-se, por exemplo, o grupo carboxilo na posição β em que pode realizar interações iónicas com as argininas 228 e 876.

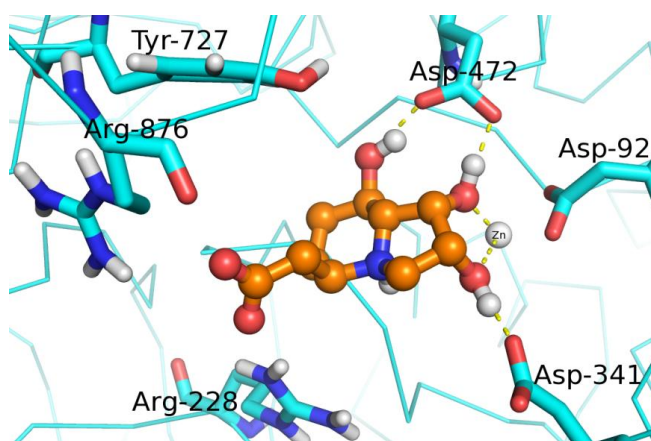


Figura 63-Modo de ligação da swainsonina com uma cadeia lateral CH_2COO^- após 10ns de simulação.

Para ligandos dissustituídos, um dos substituintes possíveis seria um grupo CH_2OH , juntamente com uma variedade de grupos como amida, aldeído, éster, carboxilo e mesmo outro grupo CH_2OH . O grupo CH_2OH que está para baixo do plano pode interagir com outros resíduos como o aspartato 204, a arginina 228 ou pode ainda realizar pontes de hidrogénio com moléculas de água que se ligam a resíduos na proteína. (figura 64)

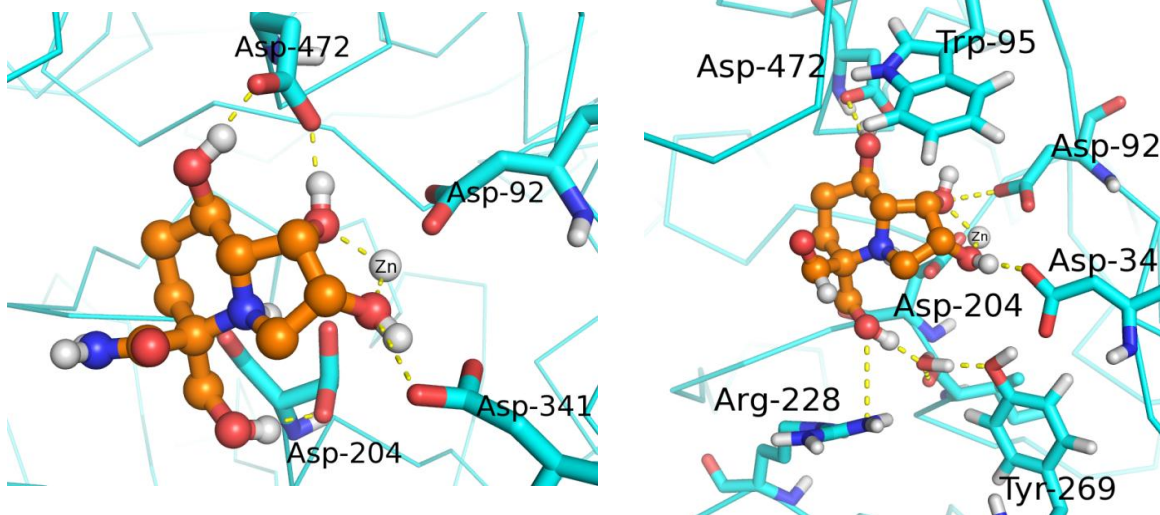


Figura 64-Modo de ligação de dois derivados da swainsonina dissustituidos com uma cadeia lateral CH_2OH .

Também podem existir derivados dissustituídos, mas cíclicos, que formam um anel. Estas cadeias laterais não estabelecem interações muito significativas com a proteína, exceto os átomos de oxigênio que servem de aceptores de pontes de hidrogênio (figura 65).

Relativamente aos derivados mais complexos da swainsonina, os que permitem alcançar o local de *holding*, observou-se que a probabilidade de alcançar esta parte da enzima

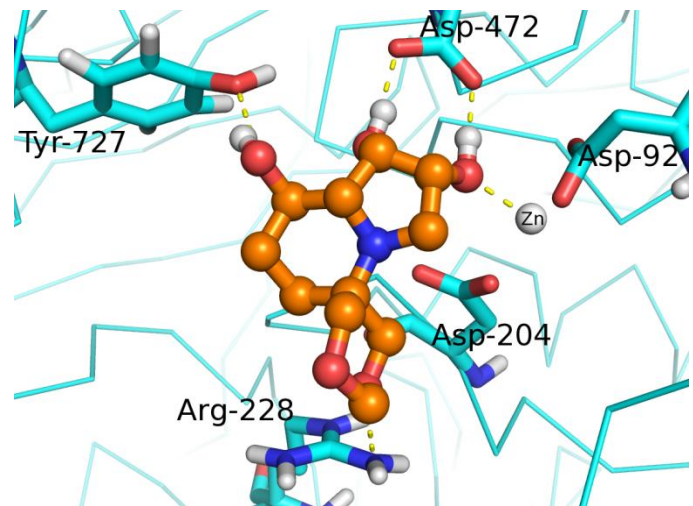


Figura 65-Modo de ligação de um derivado da swainsonina dissustituído com uma cadeia lateral cíclica.

dependia e do tipo de cadeia lateral e da sua flexibilidade, e por consequência a capacidade do grupo terminal realizar interações com os aminoácidos presentes na região de *holding*.

Portanto, o estudo focou-se na capacidade de as cadeias laterais alcançarem essa parte da enzima e de permanecerem lá.

O derivado representado na figura 66 conseguiu alcançar o local de *holding* e permanecer lá durante a simulação inteira e a parte terminal interage com os resíduos lá presentes: aspartato 340, arginina 343, aspartato 270 e arginina 289.

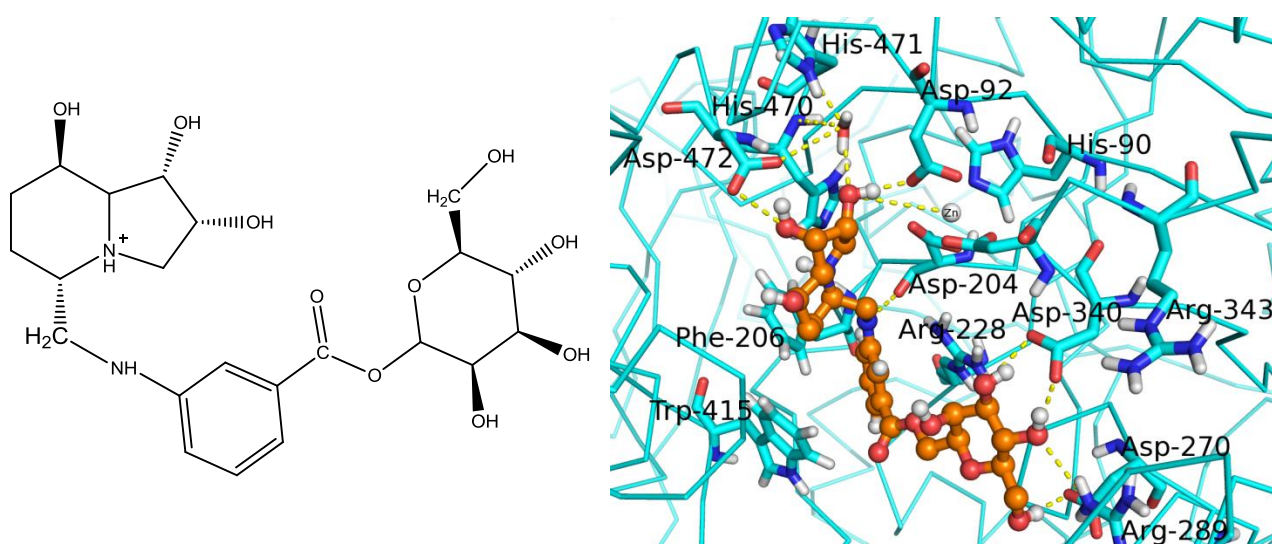


Figura 66-Estrutura e modo de ligação de um derivado da swainsonina com uma cadeia lateral mais longa, capaz de alcançar o local de holding.

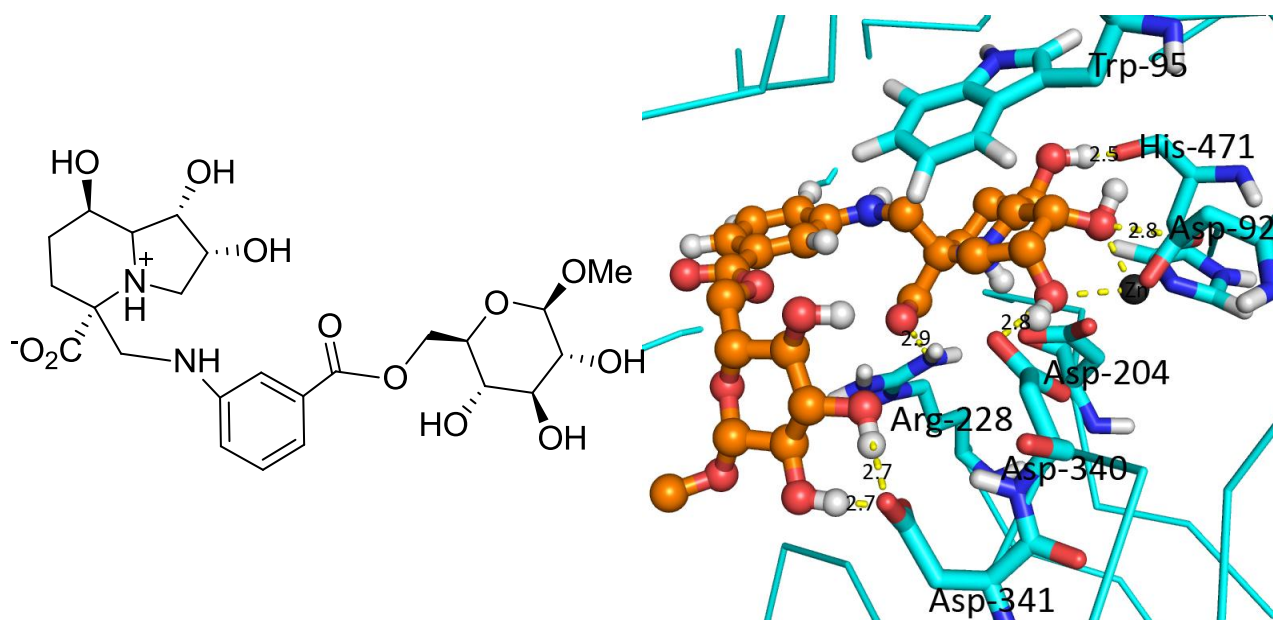


Figura 67-Estrutura e modo de ligação de um derivado da swainsonina com uma cadeia lateral que possui um grupo carboxilo mais longa, capaz de alcançar o local de holding.

O derivado dissustituído da swainsonina com esse tipo de cadeia lateral também conseguiu alcançar este local e permanecer lá. Porém um derivado de azaswainsonina com uma cadeia que era uma unidade mais longa apresentou maior flexibilidade e mobilidade para fora do local de *holding*, chegando a ser até projetada para o exterior do local ativo. Os grupos carboxilo no *linker* e não realizam interações relevantes com nenhum resíduo, já o que está no núcleo de swainsonina pode interagir com o resíduo de arginina 228. (figura 67)

Para a cadeia lateral abaixo mostrada verificou-se o grupo terminal não estabelece interações com a proteína no local de holding sendo projetado para fora do centro ativo. Neste caso, para além do maior comprimento da cadeia lateral do derivado da swainsonina, é provável que o grupo terminal não possua grupos funcionais que permitam realizar interações fortes com os aminoácidos do local de holding (figuras 68 e 69).

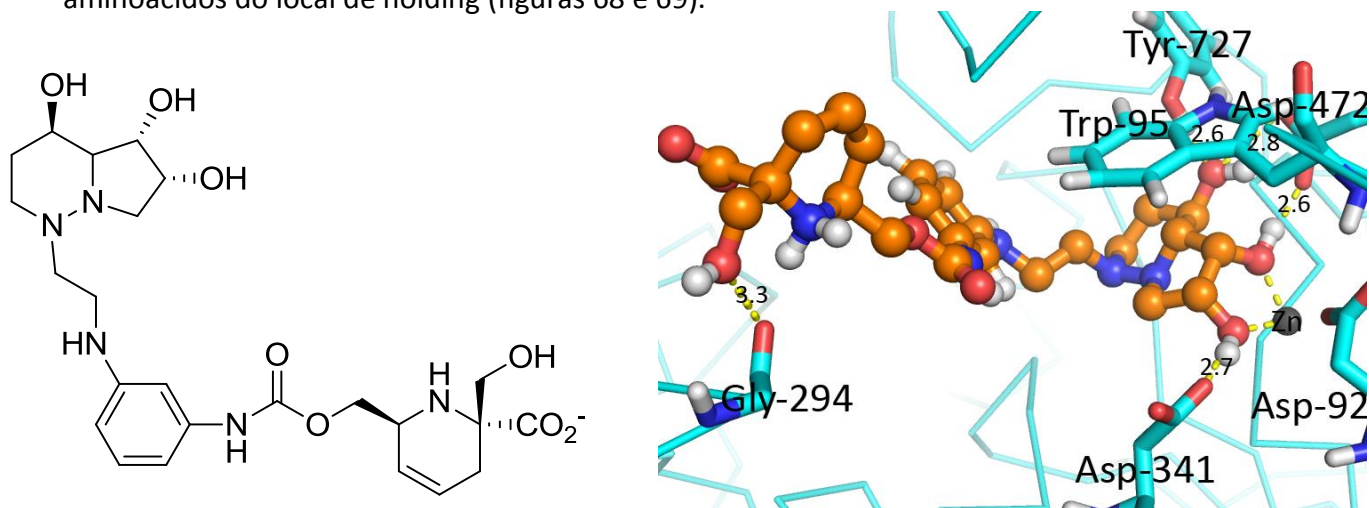


Figura 68-Estrutura e modo de ligação de um derivado da swainsonina com um grupo terminal que possui um grupo carboxilo.

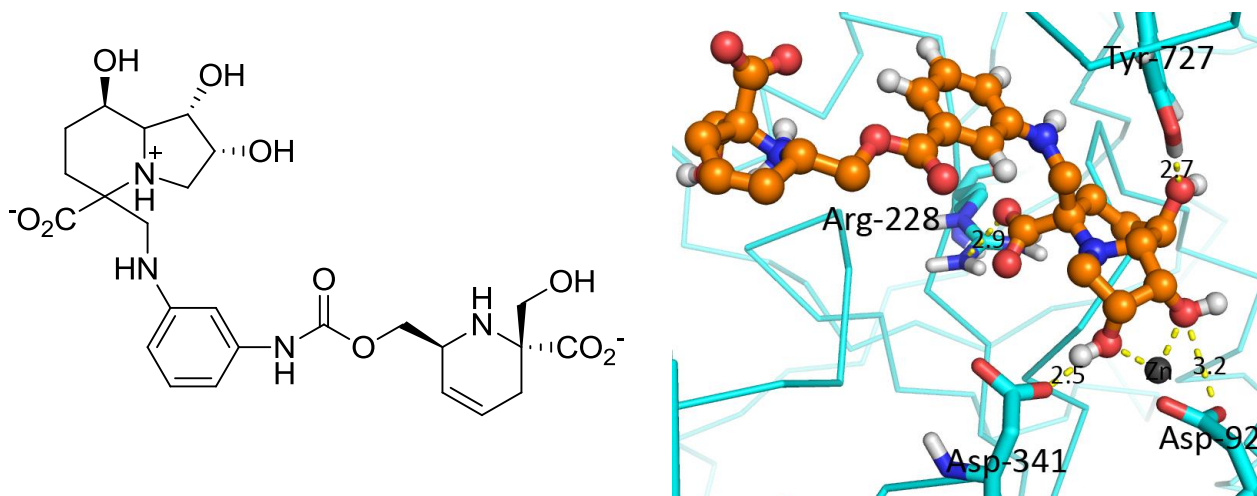


Figura 69-Estrutura e modo de ligação de um derivado da swainsonina com um grupo terminal que possui um grupo carboxilo.

As moléculas representadas nas figuras 70 e 71 também se ligam ao local de holding permanentemente, apesar de o derivado da swainsonina ter uma unidade extra. Tal se deve ao fato de os grupos do anel alifático que serve de *linker* estarem adjacentes. Contudo, para o derivado monosubstituído da swainsonina, apesar não possuir grupos amina, na maior parte do tempo, a molécula é projetada para o exterior do local ativo, havendo algumas conformações ainda interagem ligeiramente com o local de âncoragem, (figura 72) mas analisando a trajetória final é notório que essas não são as conformações mais frequentes. A diferença nestes comportamentos, pode ser que os grupos amina não permitam uma flexibilidade tão grande como as cadeias alifáticas ou pode ser um problema de amostragem insuficiente, uma vez que, para a swainsonina dissubstituída, no final da trajetória ela começa a mostrar outro tipo de conformação.

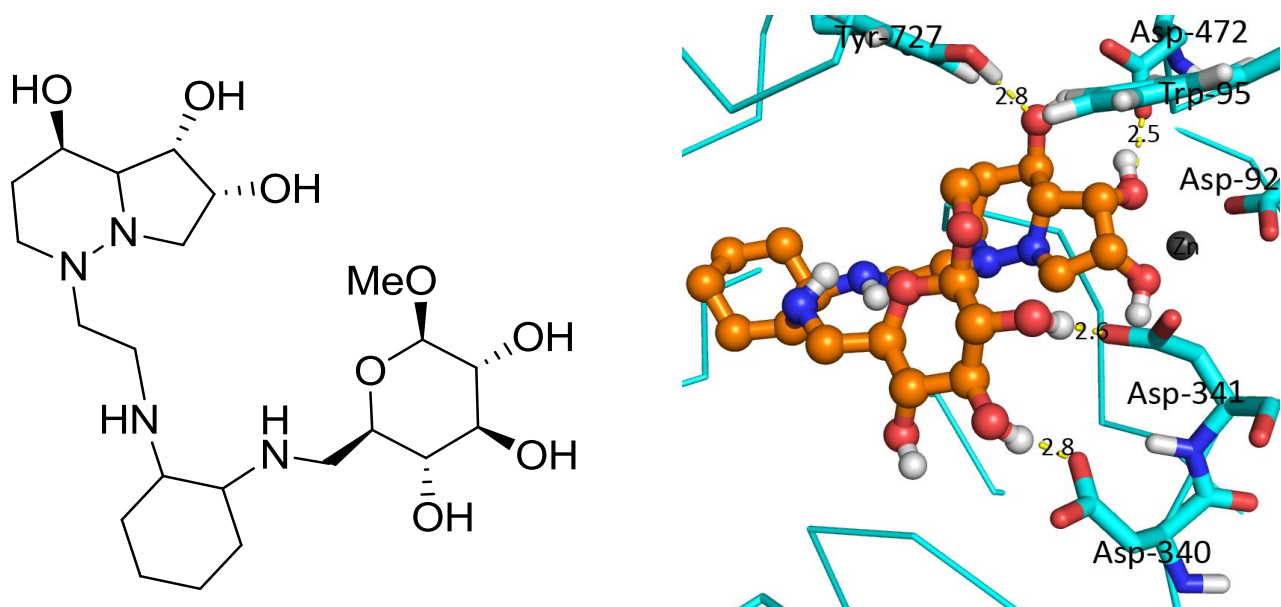


Figura 70-Estrutura e modo de ligação de um derivado da azaswainsonina.

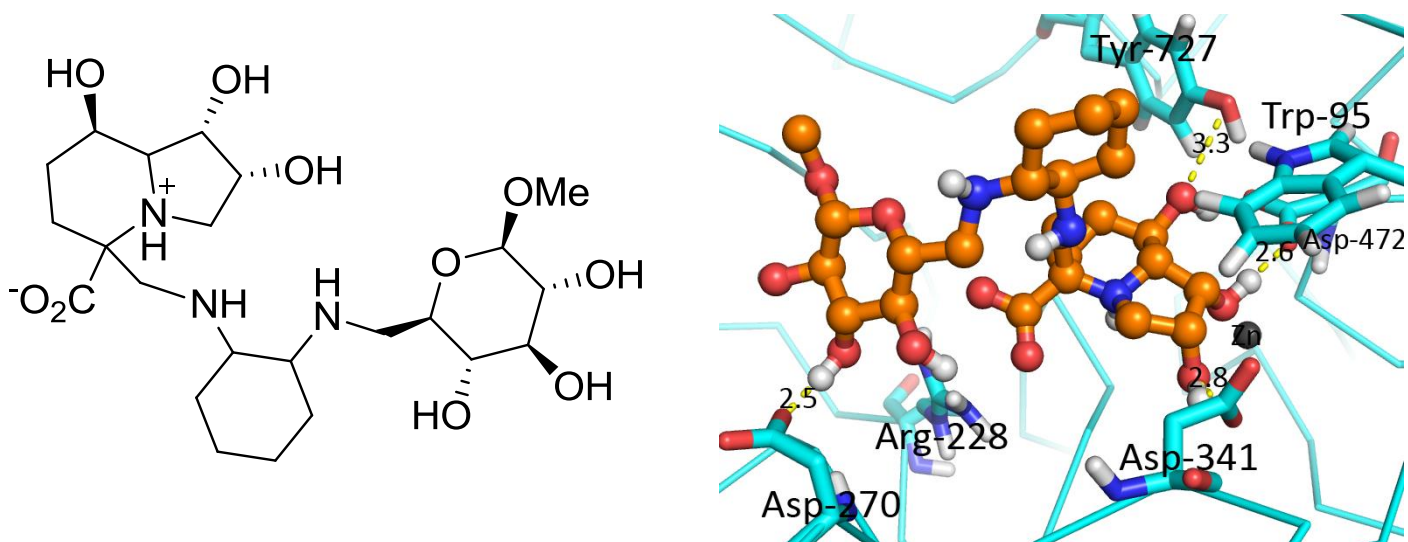


Figura 71-Estrutura e modo de ligação de um derivado dissustituído da azaswainsonina, em que o linker possui um anel alifático substituído em posições adjacentes.

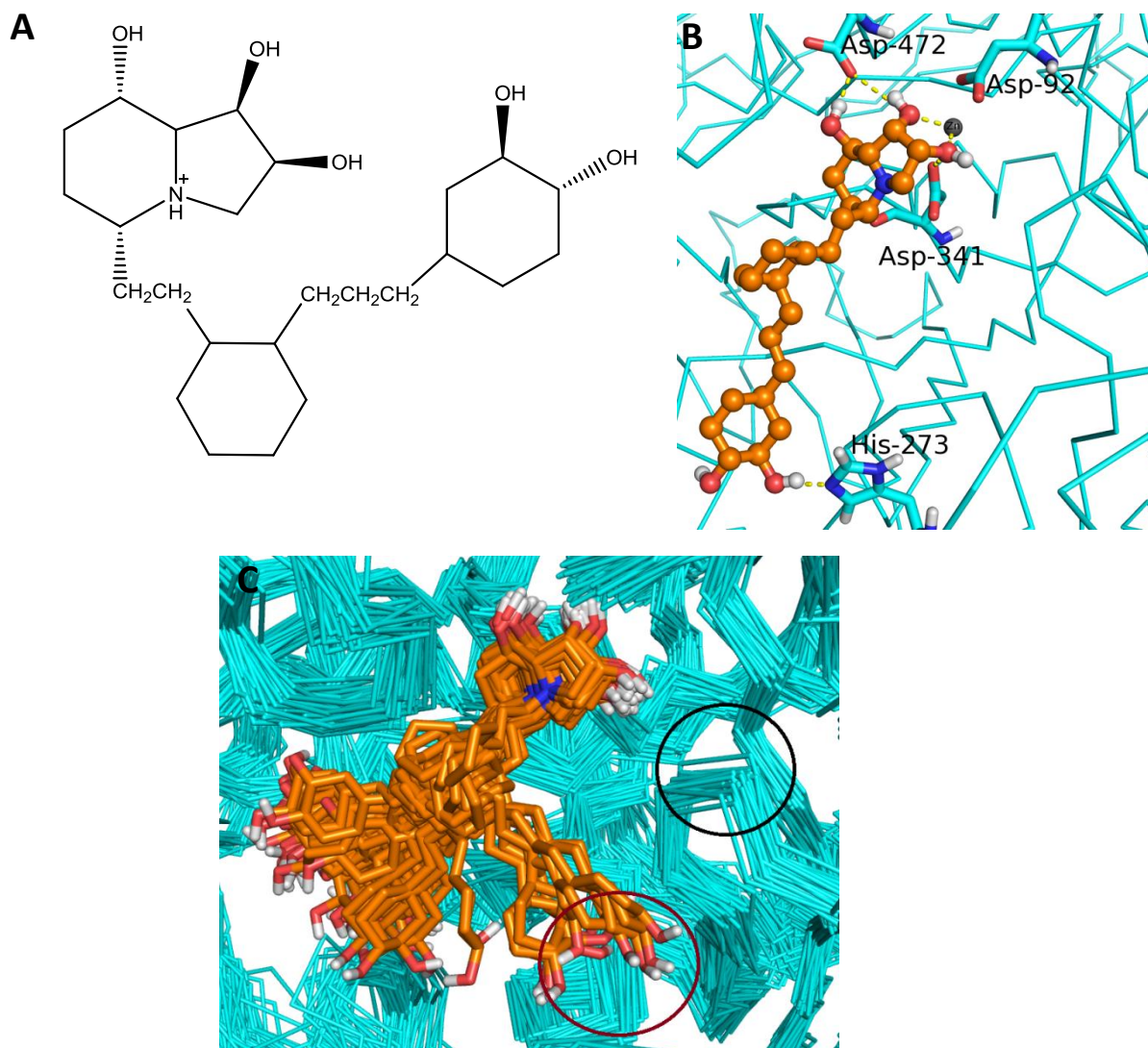


Figura 72-Estrutura e encaixe do derivado da swainsonina monosustituído em que o linker possui um anel alifático substituído em posições adjacentes. A- Estrutura do derivado da swainsonina, B- Interações que a molécula realiza com a proteína, C-Conformções obtidas ao longo de 10ns de simulação, o local de âncoragem está demarcado com um círculo vermelho e o local de holding com um círculo preto. A amarelo estão representadas todas as interações por pontes de hidrogénio e as ligações da molécula ao metal.

Também foi testada a possibilidade de os substituintes do anel alifático estarem mais afastados como na figura 73. Neste caso, verificou-se que os substituintes nestas posições não favoreciam a seletividade, uma vez que a cadeia lateral tornou-se demasiado flexível e foi projetada para fora da enzima.

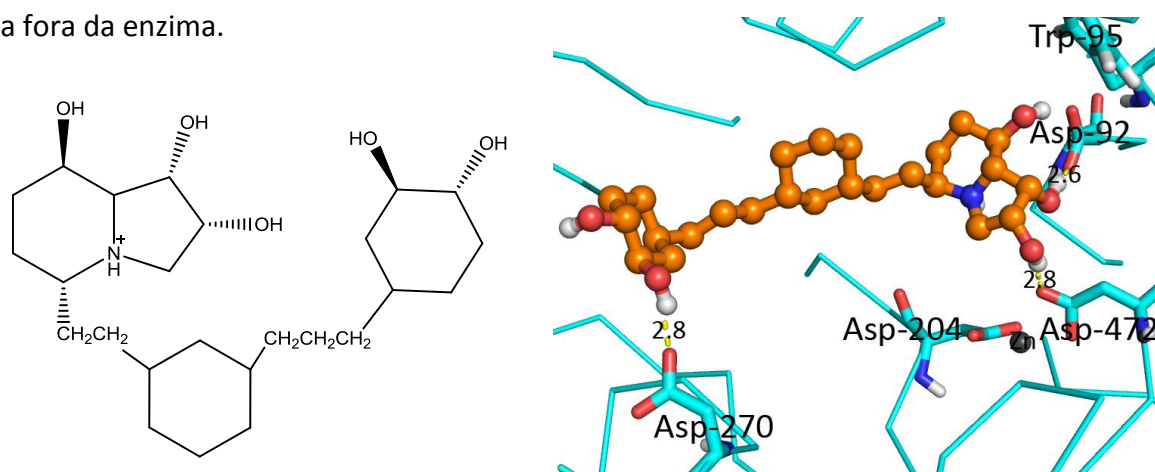


Figura 73-Estrutura e modo de ligação de um derivado de swainsonina, em que o linker possui um anel alifático substituído em posições 1,3.

Nas figuras 74 e 75 observam-se outros análogos em que a unidade central no *linker* é um anel aromático substituído em *orto* e em *meta*. O *linker* que possuem é $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$. Na molécula de swainsonina, este espaçamento encontrava-se em *orto*, o que fez com que o anel aromático ficasse “aprisionado” entre os resíduos arginina 876, arginina 228 e tirosina 267, onde interage por interações catião- π e *edge-to-face* ($\pi-\pi$) (figura 73). Esta molécula já não apresenta seletividade. Por isso, a substituição em *orto* em anéis aromáticos não favorece a seletividade.

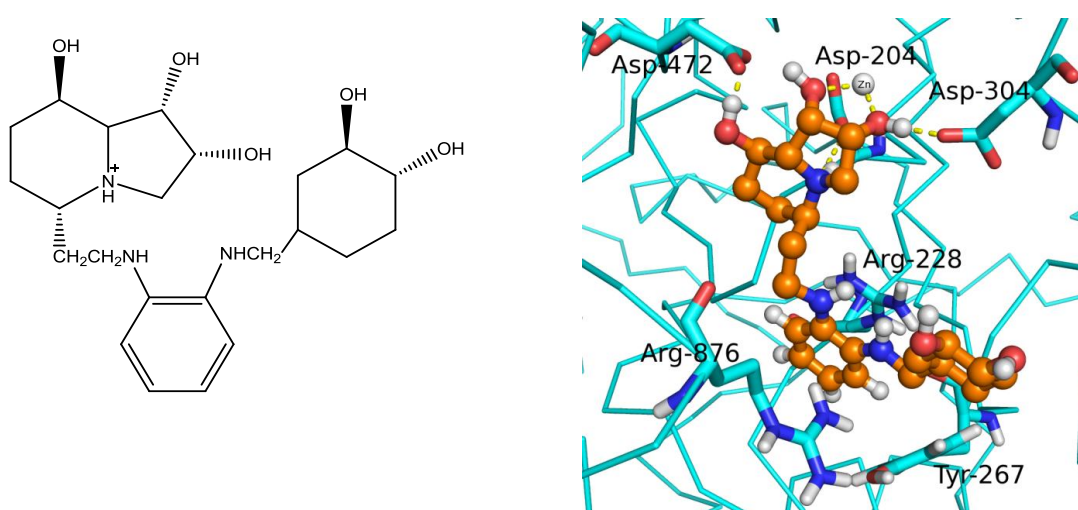


Figura 74-Estrutura e modo de ligação de um derivado de swainsonina, com o linker $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$.

Na figura 75, o análogo da azaswainsonina com os substituintes em *meta* consegue alcançar o local de *holding* realizando pontes de hidrogênio com os resíduos de aspartato 270, 340 e 341.

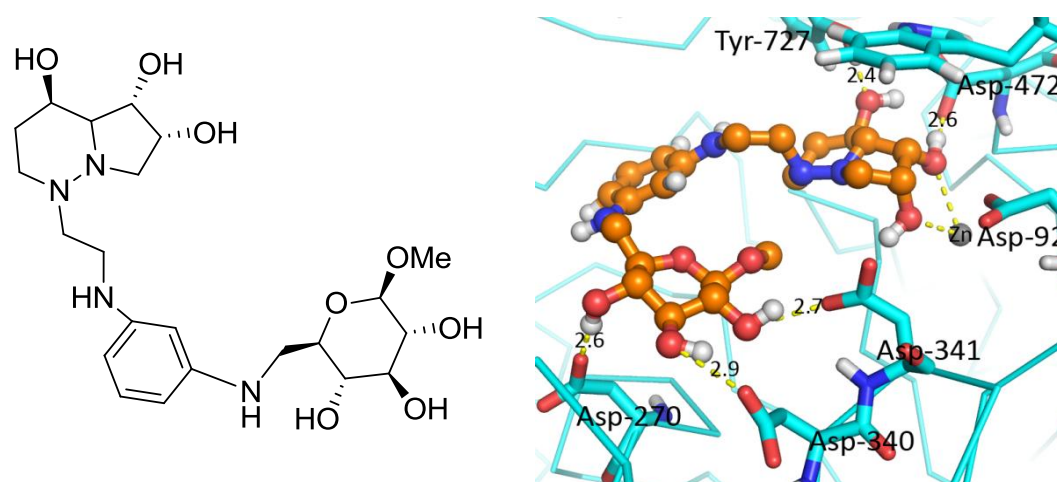


Figura 75-Estrutura e modo de ligação de um derivado de azaswainsonina, com o linker $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$ substituído em *meta*.

Para os derivados que possuem o *linker* $\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$, um dos derivados da swainsonina consegue alcançar o local de *holding* (figuras 76 e 77), enquanto o outro é projetado para fora da enzima. Porém esta diferença no comportamento poder-se-á dever ao grupo CH_2COO^- presente no anel terminal, uma vez que este grupo não só é mais volumoso, como também o grupo não é adequado para realizar interações naquele local (figura 77).

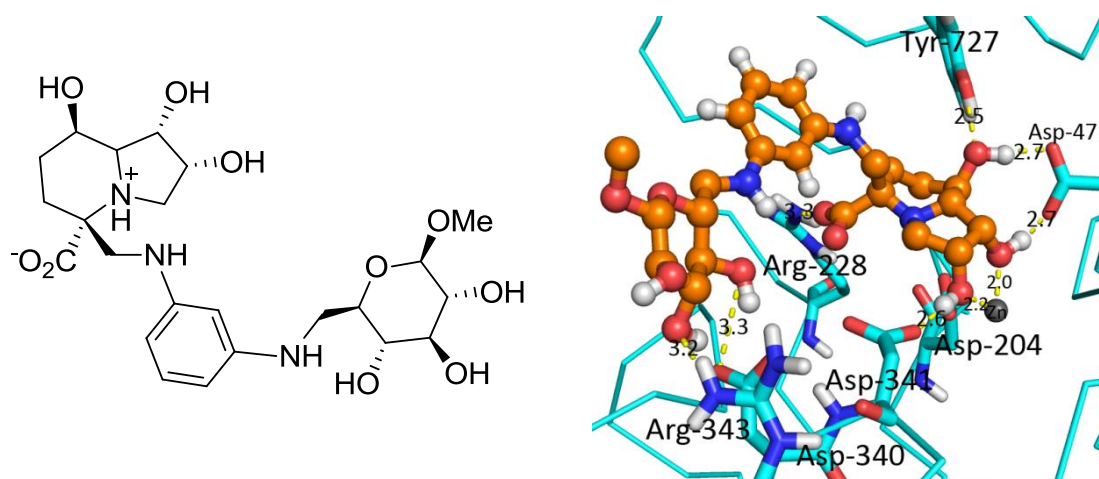


Figura 76-Estrutura e modo de ligação de um derivado de swainsonina, que possui o linker $\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2$.

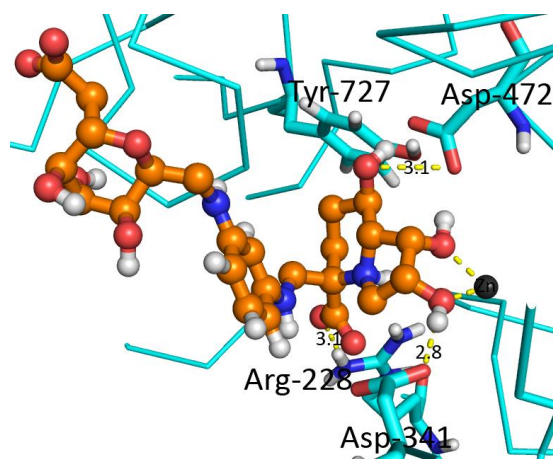
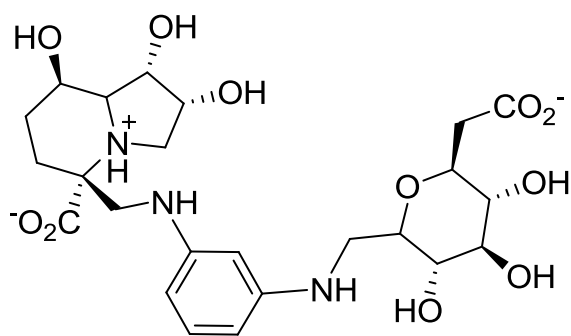


Figura 77-Estrutura e modo de ligação de um derivado de swainsonina, que possui o linker $CH_2NH-C_6H_4-NHCH_2$, mas uma unidade terminal diferente.

Por fim, para o linker $CH_2NH-C_6H_4-NHCH_2CH_2$, ambos os derivados da swainsonina se ligam fortemente ao local de *holding* (figuras 78,79 e 80). Uma das moléculas concebidas (figura 80) ainda se liga no local de ancoragem.

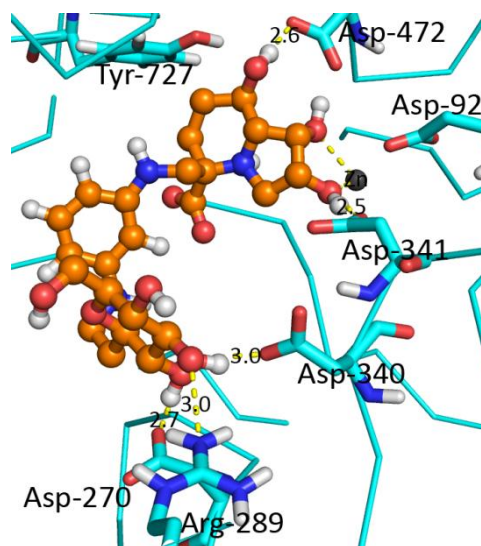
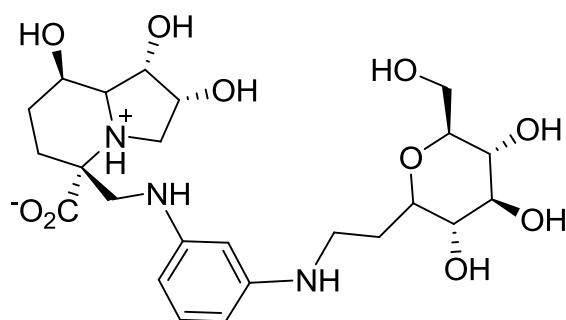


Figura 78-Estrutura e modo de ligação de um derivado dissustituído de swainsonina, que possui o linker $CH_2NH-C_6H_4-NHCH_2CH_2$.

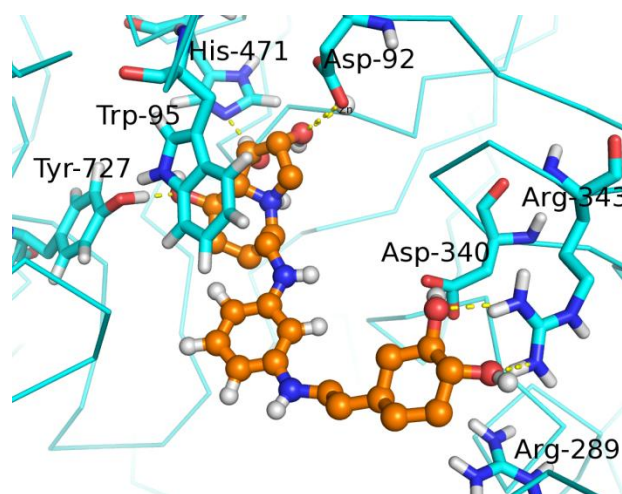
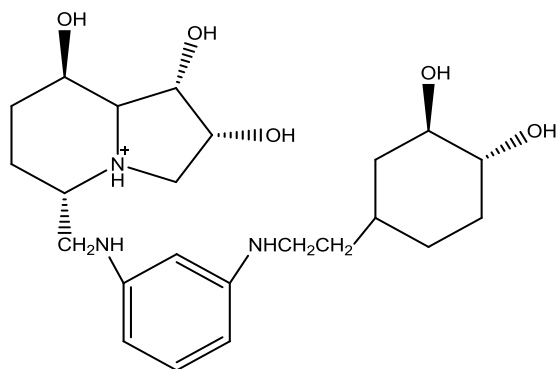


Figura 79-Estrutura e modo de ligação ao local de *holding* de um derivado monosustituído de swainsonina, que possui o linker $CH_2NH-C_6H_4-NHCH_2CH_2$.

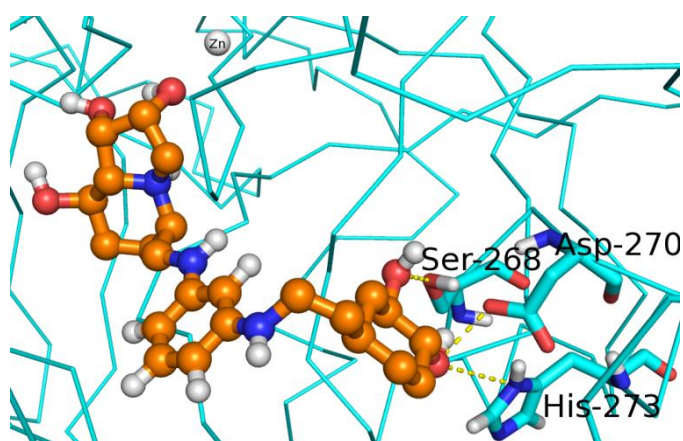


Figura 80-Estrutura e modo de ligação ao local de ancoragem do derivado acima mostrado que possui o linker $\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NHCH}_2\text{CH}_2$.

Também se testou a presença de anéis de cinco membros no *linker* central e constatou-se que a seletividade é mais favorecida quando os substituintes estão nas posições 2,4 do que 2,3. A substituição em 2,3 aumenta a probabilidade da cadeia lateral ser projetada para fora da enzima. Enquanto que em 2,4, os substituintes estão posicionados para interagir de forma correta. Isto, considerando que existem duas unidades de carbono e em 2 e 3 e na posição 3 ou 4.

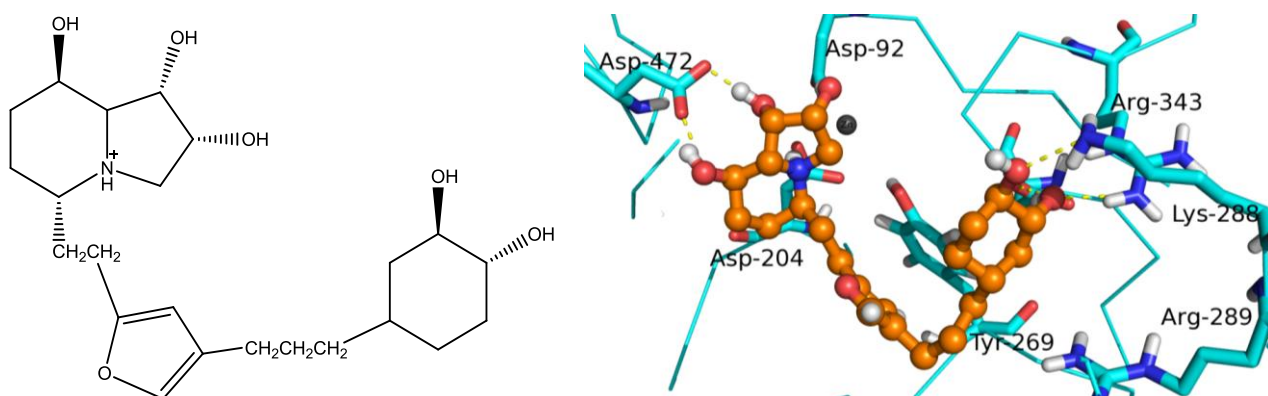


Figura 81-Estrutura e modo de ligação ao local de ancoragem do derivado da swainsonina que possui com o linker que contém um anel de cinco membros substituído nas posições 2,4.

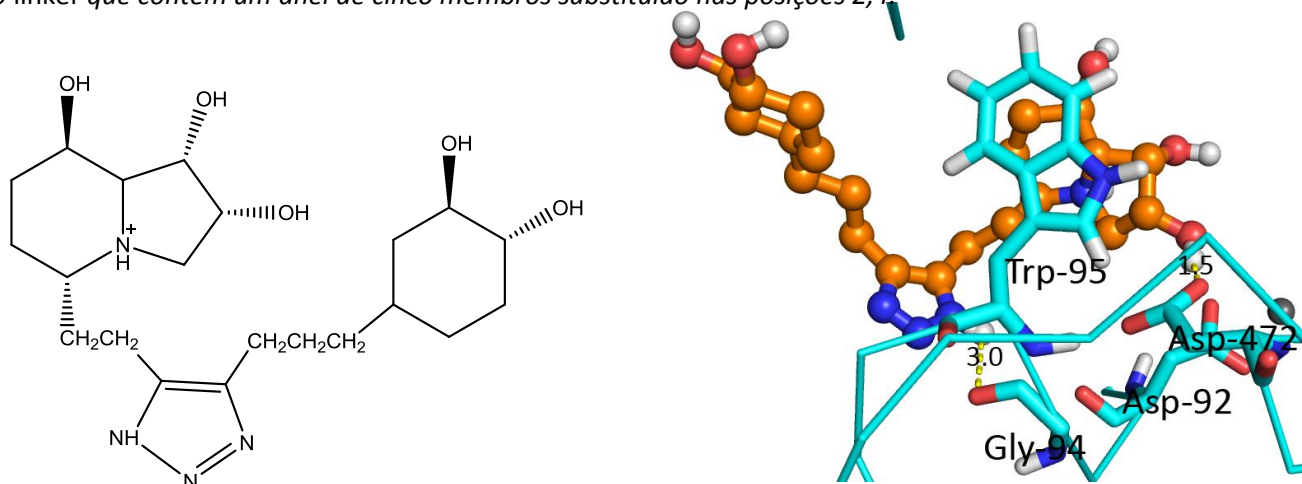


Figura 82-Estrutura e modo de ligação ao local de ancoragem do derivado da swainsonina que possui com o linker que contém um anel de cinco membros substituído nas posições 2,3.

Não se realizou nenhum teste com *linkers* que tivessem anéis de cinco membros alifáticos porque já tinha sido concluído através de cálculos de integração termodinâmica que a diferença energética entre os anéis aromáticos e os alifáticos era bastante baixa, acabando por ser indiferente a presença de anéis aromáticos ou alifáticos.

Concluindo, é possível afirmar que as simulações de dinâmica molecular permitem prever o comportamento dinâmico destes derivados da swainsonina, sendo possível prever a sua seletividade no caso de se ligarem à proteína de forma prevista.

8- Conclusão

A Golgi α -manosidase II é um potencial alvo terapêutico no tratamento de tumores uma vez que a sua inibição leva à diminuição da progressão dos tumores [11]. A swainsonina é o inibidor mais potente até hoje encontrado, porém carece de seletividade contra a α -manosidase lisossomal. [17]

Neste estudo realizou-se a titulação de cadeias laterais de aminoácidos protonáveis para obter uma estrutura com os estados de protonação a pH 6.6 para realizar cálculos de energia livre. Realizaram-se simulações de dinâmica molecular de vários complexos proteína-ligando determinados experimentalmente para perceber quais as interações essenciais para a ligação dos inibidores. Também se conceberam vários análogos da swainsonina e tentou-se avaliar a sua atividade e potencial seletividade. O *docking* de todos os análogos concebidos e mais um pequeno conjunto de moléculas foi feito contra um conjunto de alvos determinados experimentalmente, juntamente com um modelo flexível obtido por simulações de dinâmica molecular e análises de componentes principais. Assim, verificou-se qual a afinidade das moléculas concebidas e o seu modo de ligação. Os cálculos de integração termodinâmica permitiram, de uma forma mais rigorosa, mostrar quais os grupos funcionais mais favorecidos e os cálculos de MM-PBSA mostraram o comportamento dinâmico dos derivados desenvolvidos. Assim, foi possível concluir que:

- Na titulação de cadeias laterais, verificou-se que a maior parte dos aminoácidos apresentam curvas de titulação bastante semelhantes para as várias conformações obtidas experimentalmente, apenas com pequenos desvios, o que significa que as diferentes conformações não induzem deslocamentos significativos que provoquem mudanças no ambiente químico que rodeia os resíduos. As únicas variações são apenas provocadas pela presença de resíduos adjacentes, mas também por mudanças na orientação das cadeias laterais, como é no caso da histidina. A maior parte dos ácidos carboxílicos encontra-se ionizada e as aminas também. Apenas as histidinas apresentam padrões de protonação mais variáveis.
- As interações essenciais para a ligação das moléculas à enzima são: a ligação ao átomo de zinco através de dois grupos hidroxilo, pontes de hidrogénio com os

resíduos do centro ativo (por exemplo, aspartato 472 e 341). As moléculas carregadas também realizam interações iônicas com o resíduo de aspartato 204 e catião- π com o resíduo de triptofano 95. Também podem ocorrer interações hidrófobas com o resíduo de triptofano 95. Observou-se que a swainsonina realiza interações iônicas e por pontes de hidrogénio muito próximas do resíduo de aspartato 204.

- O modelo flexível obtido por dinâmica molecular e PCA corresponde às estruturas de menor energia da proteína e verifica-se que difere das estruturas cristalográficas na posição de vários aminoácidos como o triptofano 95, histidina 471 e tirosina 727 e 269. O *docking* realizado mostrou que os derivados da azaswainsonina possuíam um orientações mais variável nas estruturas obtidas por DM e PCA, enquanto que os derivados de swainsonina apresentavam um modo de ligação mais próximo do experimental em todas as estruturas possivelmente devido às interações atrás referidas com o aspartato 204. Para os derivados mais complexos que se pretendia que chegassem ao local de *holding* verificou-se que a muitos se ligavam de forma inversa à esperada e quando se ligavam da forma esperada o grupo funcional podia não se ligar ao local de *holding*, especialmente nas conformações de menor energia. A maior parte dos derivados mostrou uma afinidade semelhante ou nalguns casos, até maior que a swainsonina. Verificou-se também que os grupos funcionais na posição β estabelecem mais interações do que na posição α .
- Os cálculos de intergração termodinâmica permitiram mostrar as várias relações entre os vários grupos escolhidos para cadeias laterais. Assim, concluiu-se que: a estereoquímica e presença dos grupos hidroxilo é importante para a atividade. Para cadeias alquílicas, quanto mais pequenas melhor, devido ao efeito hidrófobo, que também se verifica para cadeias ramificadas. Para as cadeias laterais éster, amida, aldeído e cetona não se verificam diferenças energéticas significativas energéticas entre elas. No que respeita às cadeias laterais, a estereoquímica é relativamente indiferente. Sendo que, para derivados monosubstituídos, a estereoquímica mais favorecida é para trás e para os disubstituídos, a estereoquímica mais favorável é com o grupo CH_2OH para trás. Os aneis alifáticos de cinco membros são ligeiramente mais favorecidos quando inseridos no *linker* e a diferença de estereoquímica dos

grupos hidroxilo essenciais para a ligação no local de *holding* também é energeticamente indiferente.

- Para os cálculos de MM-PBSA, não se conseguiu calcular a afinidade absoluta dos vários análogos devido às limitações deste método para moléculas carregadas. Porém, conseguiu-se analisar o comportamento dinâmico destas moléculas caso se liguem de forma prevista ao local ativo. Verificou-se que as moléculas que continham o *linker* $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NHCOO}$ conseguiam alcançar o local de *holding*, o *linker* $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}_6\text{H}_8\text{NHCH}_2$ com os substituintes em posições adjacentes também permitiu a dois derivados alcançar o local de *holding*, mas a um terceiro não, suspeitando-se assim que eventualmente poderá não ligar tão bem. Caso os substituintes estivessem em posições 1,3 já não ocorria a ligação ao local de *holding*. Para anéis aromáticos, com substituintes em posição *orto* ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NHCH}_2$), verificou-se que não chegavam ao local de *holding*, porque ficou aprisionado entre resíduos de arginina, realizando interações catião- π com os mesmos. Para o mesmo *linker*, mas em posição *meta*, verificou-se que conseguia alcançar o local de *holding*. Os *linkers* $\text{CH}_2\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NHCH}_2$ e $\text{CH}_2\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ também conseguem alcançar o local de *holding*. Para os anéis de cinco membros aromáticos, a seletividade é mais favorecida se os substituintes estiverem em posições 2,4 e não 2,3. Para o anel terminal verificou-se que pelo menos dois grupos hidroxilo são importantes e que não convém ter grupos carregados negativamente.
- Relativamente às várias formas aqui apresentadas de calcular a afinidade, já sabendo os prós e contras de cada uma, verificou-se que apesar de a integração termodinâmica ser a mais precisa e correta, é bastante limitada porque só permite realizar pequenas transformações e permite só comparar a afinidade entre dois estados. O *docking* permitiu calcular a afinidade absoluta, mas é menos rigoroso a calcular a afinidade e usa modelos rígidos. O método de MM-PBSA provou ser bastante limitado para moléculas carregadas, mas conta com o comportamento dinâmico das mesmas. Por isso, não existe um método perfeito, e para se obter uma análise detalhada das relações estrutura atividade destas moléculas, de fato, o ideal foi usar os três métodos que se complementam entre si.

9- Referências bibliográficas

- [1] Nelson, D., Cox, M., 2005. *Lehninger - Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 4th Edition, pgs: 239-260
- [2] Voet, D., Voet, J., Pratt, C., 2006. *Fundamentals of Biochemistry*, Wiley & Son Inc, 2nd Edition, pgs: 207-230
- [3] Taylor, M., Drickamer, K., 2006. *Introduction to Glycobiology Choice*: Oxford Academic Press, 3rd Edition, pgs:1-13
- [4] Ohtsubo, K.; Marth, J. D., Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **2006**, *126* (5), 855-867.
- [5] Gabius, H. J.; Andre, S.; Kaltner, H.; Siebert, H. C., The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et biophysica acta* **2002**, *1572* (2-3), 165-77.
- [6]- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman
- [7] Moremen, K. W., Golgi alpha-mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. *Bba-Gen Subjects* **2002**, *1573* (3), 225-235.
- [8] Schachter, H., Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Advances in experimental medicine and biology* **1986**, *205*, 53-85.
- [9] Dall'olio, F., Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *Clinical molecular pathology* **1996**, *49* (3), M126-35.
- [10] Dube, D. H.; Bertozzi, C. R., Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nature reviews. Drug discovery* **2005**, *4* (6), 477-88.

- [11] Dennis, J. W.; Granovsky, M.; Warren, C. E., Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochimica et biophysica acta* **1999**, *1473* (1), 21-34.
- [12] Hakomori, S., Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99* (16), 10231-3.
- [13] Dennis, J. W.; Carver, J. P.; Schachter, H., Asparagine-linked oligosaccharides in murine tumor cells: comparison of a WGA-resistant (WGAr) nonmetastatic mutant and a related WGA-sensitive (WGAs) metastatic line. *The Journal of cell biology* **1984**, *99* (3), 1034-44.
- [14] Wang, P., Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. *Journal of Cancer Molecules* **2005**, *1* (2):73-8
- [15] Goss, P. E.; Baker, M. A.; Carver, J. P.; Dennis, J. W., Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **1995**, *1* (9), 935-44.
- [16] Dennis, J. W.; Laferte, S., Recognition of asparagine-linked oligosaccharides on murine tumor cells by natural killer cells. *Cancer research* **1985**, *45* (12 Pt 1), 6034-40.
- [17] van den Elsen, J. M.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R., Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *The EMBO journal* **2001**, *20* (12), 3008-17.
- [18] Rose, D. R., Structure, mechanism and inhibition of Golgi alpha-mannosidase II. *Current opinion in structural biology* **2012**, *22* (5), 558-62.
- [19] Shah, N.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R., Golgi alpha-mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (28), 9570-5.

- [20] Davies, G.; Henrissat, B., Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **1995**, 3 (9), 853-9.
- [21] Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J., Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron-Asymmetr* **2000**, 11 (8), 1645-1680.
- [22] Lillelund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X. F.; Bols, M., Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin. *Chem Rev* **2002**, 102 (2), 515-553.
- [23] Kuntz, D. A.; Zhong, W.; Guo, J.; Rose, D. R.; Boons, G. J., The Molecular Basis of Inhibition of Golgi alpha-Mannosidase II by Mannostatin A. *Chembiochem* **2009**, 10 (2), 268-277.
- [24] Elbein, A. D., Inhibitors of the Biosynthesis and Processing of N-Linked Oligosaccharide Chains. *Annu Rev Biochem* **1987**, 56, 497-534.
- [25] Kumar, N. S.; Kuntz, D. A.; Wen, X.; Pinto, B. M.; Rose, D. R., Binding of sulfonium-ion analogues of Di-epi-swainsonine and 8-epi-lentiginosine to Drasaphila Golgi alpha-mannosidase II: The role of water in inhibitor binding. *Proteins* **2008**, 71 (3), 1484-1496.
- [26] Olden, K.; Breton, P.; Grzegorzewski, K.; Yasuda, Y.; Gause, B. L.; Oredipe, O. A.; Newton, S. A.; White, S. L., The Potential Importance of Swainsonine in Therapy for Cancers and Immunology. *Pharmacol Therapeut* **1991**, 50 (3), 285-290.
- [27] Das, P. C.; Roberts, J. D.; White, S. L.; Olden, K., Activation of Resident Tissue-Specific Macrophages by Swainsonine. *Oncol Res* **1995**, 7 (9), 425-433.
- [28] Watson, A. A.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J., Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry* **2001**, 56 (3), 265-295.

- [29] Shaheen, P. E.; Stadler, W.; Elson, P.; Knox, J.; Winkvist, E.; Bukowski, R. M., Phase II study of the efficacy and safety of oral GD0039 in patients with locally advanced or metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drug* **2005**, *23* (6), 577-581.
- [30] Venkatesan, M.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R., Human lysosomal alpha-mannosidases exhibit different inhibition and metal binding properties. *Protein Sci* **2009**, *18* (11), 2242-2251.
- [31] Dorling, P. R.; Huxtable, C. R.; Colegate, S. M., Inhibition of Lysosomal Alpha-Mannosidase by Swainsonine, an Indolizidine Alkaloid Isolated from Swainsona-Canescens. *Biochemical Journal* **1980**, *191* (2), 649-651.
- [32] Fiaux, H.; Kuntz, D. A.; Hoffman, D.; Janzer, R. C.; Gerber-Lemaire, S.; Rose, D. R.; Juillerat-Jeanneret, L., Functionalized pyrrolidine inhibitors of human type II alpha-mannosidases as anti-cancer agents: Optimizing the fit to the active site. *Bioorgan Med Chem* **2008**, *16* (15), 7337-7346.
- [33] Adcock, S. A.; McCammon, J. A., Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews* **2006**, *106* (5), 1589-615.
- [34] Leach, A.R. , 2001. *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Prentice-Hall, Essex, 2nd Edition, pgs:170-229; 563-573
- [35] Spoel, D. v. d.; Lindahl, E.; Hess, B.; Buuren, A. v.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Feenstra, K. A.; Drunen, R. v.; Berendsen, H. J. C., 2006, *Gromacs User Manual version 4.0*.
- [36] Gilson, M. K.; Zhou, H. X., Calculation of protein-ligand binding affinities. *Annu Rev Bioph Biom* **2007**, *36*, 21-42
- [37] Connolly, M. L., Computation of Molecular Volume. *J Am Chem Soc* **1985**, *107* (5), 1118-1124.

- [38] Computation of molecular volume: Michael L. Connolly. Acedido a 24 de Janeiro de 2014. <http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature14e.html>
- [39] Numata, J.; Wan, M.; Knapp, E. W., Conformational entropy of biomolecules: Beyond the quasi-harmonic approximation. *Genome Inform Ser* **2007**, *18*, 192-205.
- [40] Campos, S. R.; Baptista, A. M., Conformational analysis in a multidimensional energy landscape: study of an arginylglutamate repeat. *The journal of physical chemistry. B* **2009**, *113* (49), 15989-6001.
- [41] Teixeira, V. H.; Soares, C. M.; Baptista, A. M., Studies of the reduction and protonation behavior of tetraheme cytochromes using atomic detail. *J Biol Inorg Chem* **2002**, *7* (1-2), 200-216.
- [42] Baptista, A. M.; Soares, C. M., Some theoretical and computational aspects of the inclusion of proton isomerism in the protonation equilibrium of proteins. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (1), 293-309
- [43] Baptista, A. M.; Teixeira, V. H.; Soares, C. M., Constant-pH molecular dynamics using stochastic titration. *J Chem Phys* **2002**, *117* (9), 4184-4200.
- [44] Richards, F. M., Areas, Volumes, Packing, and Protein-Structure. *Annu Rev Biophys Bio* **1977**, *6*, 151-176.
- [45] Bashford, D.; Gerwert, K., Electrostatic Calculations of the Pka Values of Ionizable Groups in Bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* **1992**, *224* (2), 473-486.
- [46] Donald Bashford. " In Yutaka Ishikawa, Rodney R. Oldehoeft, John V. W. Reynders, and Marydell Tholburn, editors, "Scientific Computing in Object-Oriented Parallel Environments", *Lecture Notes in Computer Science*, Berlin, **1997**. 1343, 233--240.

- [47] Schuttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M., PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2004**, *60* (Pt 8), 1355-63.
- [48] Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A., General Atomic and Molecular Electronic-Structure System. *J Comput Chem* **1993**, *14* (11), 1347-1363.
- [49] Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later" M.S.Gordon, M.W.Schmidt pp. 1167-1189, in "Theory and Applications of Computational Chemistry: the first forty years" C.E.Dykstra, G.Frenking, K.S.Kim, G.E.Scuseria (editors), *Elsevier*, Amsterdam, **2005**.
- [50] Smith, P. E.; Vangunsteren, W. F., Consistent Dielectric-Properties of the Simple Point-Charge and Extended Simple Point-Charge Water Models at 277 and 300 K. *J Chem Phys* **1994**, *100* (4), 3169-3174.
- [51] Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G., A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J Chem Phys* **1995**, *103* (19), 8577-8593.
- [52] Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M., LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* **1997**, *18* (12), 1463-1472.
- [53] Miyamoto, S.; Kollman, P. A., Settle - an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models. *J Comput Chem* **1992**, *13* (8), 952-962.
- [54] Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M., Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* **2007**, *126* (1).
- [55] Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E., GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* **2008**, *4* (3), 435-447.

- [56] Van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C., GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem* **2005**, *26* (16), 1701-1718.
- [57] Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D., GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model* **2001**, *7* (8), 306-317.
- [58] Berendsen, H. J. C.; Vanderspoel, D.; Vandrunen, R., Gromacs - a Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation. *Comput Phys Commun* **1995**, *91* (1-3), 43-56.
- [59] Schrodinger, LLC, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. 2010
- [60] Trott, O.; Olson, A. J., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* **2010**, *31* (2), 455-61.
- [61] Worawalai, W.; Rattanangkool, E.; Vanitcha, A.; Phuwapraisirisan, P.; Wacharasindhu, S., Concise synthesis of (+)-conduritol F and inositol analogues from naturally available (+)-proto-quercitol and their glucosidase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22* (4), 1538-1540.
- [62] Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M., A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *J Med Chem* **2010**, *53* (14), 5061-5084.
- [63] Schultes, S., de Graaf, C., Haaksma E.E.J., de Esch, I.J.P., Leurs, R., Krämer, O. Ligand efficiency as a guide in fragment hit selection and optimization. *Drug Discovery Today: Technologies*. **2011** *7*: e157-e162.
- [64] Jencks, W. P. On the Attribution and Additivity of Binding Energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, **1981**, *78*(7), 4046-4050.
- [65] Puppala, M.; Ponder, J.; Suryanarayana, P.; Reddy, G. B.; Petrash, J. M.; LaBarbera, D. V., The Isolation and Characterization of beta-Glucogallin as a Novel Aldose Reductase Inhibitor from *Emblica officinalis*. *Plos One* **2012**, *7* (4).

[66] Kim, J. H.; Lingwood, C. A.; Williams, D. B.; Furuya, W.; Manolson, M. F.; Grinstein, S., Dynamic measurement of the pH of the golgi complex in living cells using retrograde transport of the verotoxin receptor. *J Cell Biol* **1996**, *134* (6), 1387-1399.

[67] Gilson, M. K.; Honig, B. H., The Dielectric-Constant of a Folded Protein. *Biopolymers* 1986, *25* (11), 2097-2119.

[68] Calero, C. S.; Farwer, J.; Gardiner, E. J.; Hunter, C. A.; Mackey, M.; Scuderi, S.; Thompson, S.; Vinter, J. G., Footprinting molecular electrostatic potential surfaces for calculation of solvation energies. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, *15* (41), 18262-18273.

[69] Electrostatic environment around charged molecules, Consultado em 03-05-2014

<http://www.cresset-group.com/2014/01/electrostatic-environments-around-charged-molecules-part-2-dealing-with-proteins/>

10-Anexos

Anexo 1-Afinidades obtidas no docking

Neste anexo mostram-se as afinidades obtidas para todos os compostos sujeitos ao *docking* tanto contra estruturas de raios-x ou contra as estruturas obtidas na dinâmica molecular.

Nomenclatura dos compostos:

- **S**-Análogo da swainsonina, por exemplo: S16- Análogo 16 da swainsonina. Estes análogos possuem cadeias relativamente curtas que não alcançam o local de *holding* na enzima. S0 corresponde à swainsonina.
- **SC**-Análogo complexo da swainsonina, por exemplo:SC17-Análogo complexo nº17 da swainsonina. Estes análogos possuem cadeias laterais mais longas e complexas capazes de alcançar o local de *holding*.
- **A**-Análogo da azaswainsonina, por exemplo: A21-Análogo 21 da azaswainsonina. Estes análogos possuem cadeias relativamente curtas que não alcançam o local de *holding* na enzima. A1-Corresponde à azaswainsonina sem cadeia lateral no azoto da posição 5.
- **AC**-Análogo complexo da azaswainsonina, por exemplo:AC1-Análogo complexo nº1 da swainsonina. Estes análogos possuem cadeias laterais mais longas e complexas capazes de alcançar o local de *holding*.
- **CID_XXXXX**-Composto retirado da base de dados *PubChem*. CID refere-se a *Compound ID*.
- **Compostos retirados de estruturas cristalográficas:**
 - **5PY**- Pirrolidina substituída na posição 5. Código PDB: 2F1A
 - **5SW**-Swainsonina substituída na posição 5. Código PDB:3EJU
 - **5LA**-Lactama substituída na posição 5. Código PDB:3DDF
 - **MAN**-Manostatina A- Código PDB:3DX4
 - **GOX**-Glucoxima- Código PDB:3D51
 - **MVL**-Manoimidazole-Código PDB:3D4Y
 - **DET**-Tioswainsonina-Código PDB: 2OW6
 - **DMJ**-Desoximanojirmicina- Código PDB: 1HXK
- **XA**-Alexina nºx
- **XP**-Pirrolidina nºX
- **XI**-Indolisina nºX

As tabelas possuem uma gradação de cor conforme a afinidade que as moléculas mostram.

- Verde muito escuro- Afinidade entre -9.0 e -10.0 kcal/mol
- Verde- Afinidade entre -8.0 e -9.0 kcal/mol
- Verde mais claro-Afinidade entre -7.0 e -8.0 kcal/mol
- Amarelo-Afinidade entre -6.0 e -7.0 kcal/mol
- Laranja-Afinidade entre -5.0 e -6.0 kcal/mol
- Vermelho-Afinidade entre -4.0 e -5.0 kcal/mol

Na tabela também se encontra representado o número de *heavy atoms* para cada molécula. Os *heavy atoms* são todos os átomos diferentes de hidrogénio.

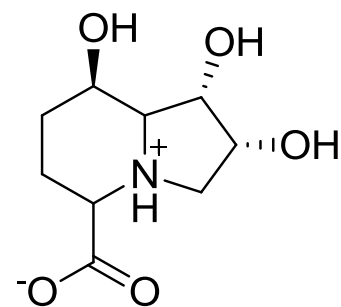
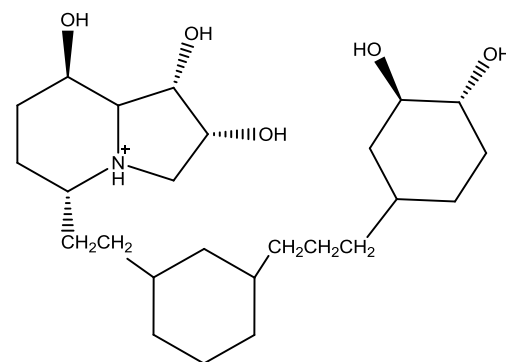
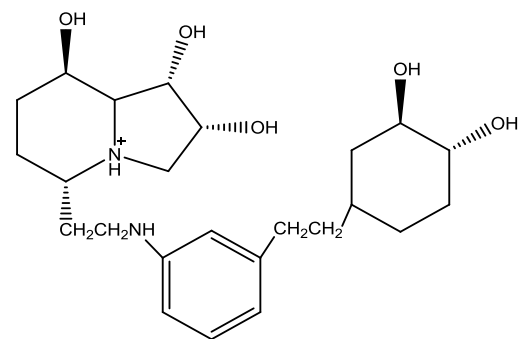
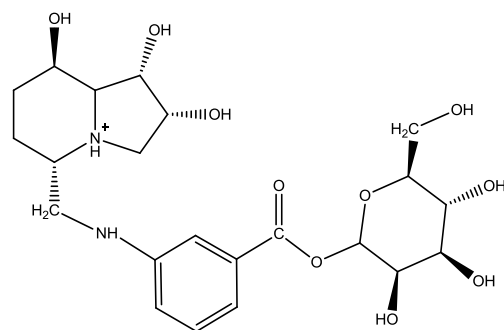
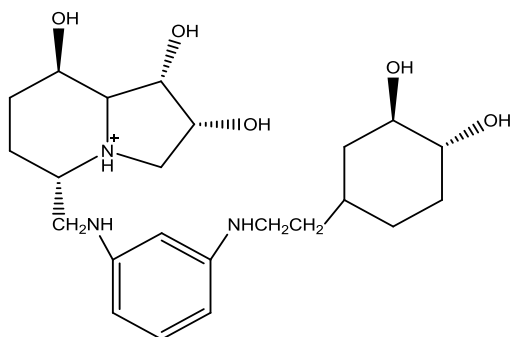
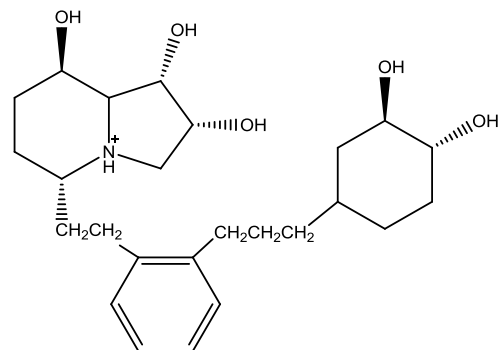
Tabela I-Afinidades das moléculas testadas no docking (kcal/mol). Verde muito escuro- Afinidade entre -9.0 e -10.0 kcal/mol. Verde- Afinidade entre -8.0 e -9.0 kcal/mol. Verde mais claro-Afinidade entre -7.0 e -8.0 kcal/mol. Amarelo-Afinidade entre -6.0 e -7.0 kcal/mol. Laranja-Afinidade entre -5.0 e -6.0 kcal/mol. Vermelho-Afinidade entre -4.0 e -5.0 kcal/mol.

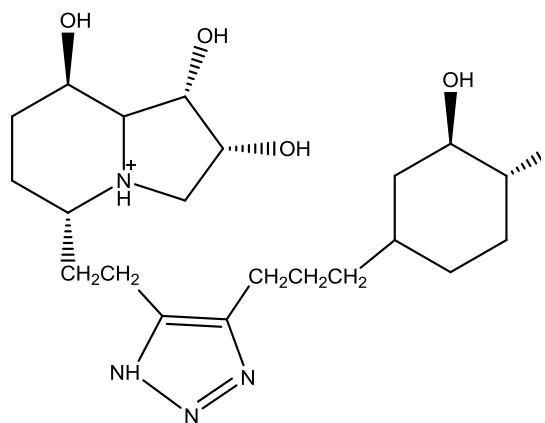
	Conformações obtidas por PCA								Estruturas cristalográficas								Nºde heavy atoms			
	98566	98567	98568	98569	98570	98571	98572	98573	98574	98575	1HXK	2F1A	2OW6	3BLB	3D4Y	3D51		3DDF	3DX4	3EJU
SC17	-8.7	-8.0	-8.5	-7.9	-8.1	-8.6	-8.7	-8.6	-8.4	-7.8	-7.9	-7.7	-7.6	-7.6	-7.9	-8.3	-7.8	-8.0	-8.1	36
SC16	-8.6	-8.6	-8.4	-7.5	-8.1	-8.2	-8.6	-8.6	-8.6	-7.7	-8.2	-7.6	-8.0	-7.2	-8.0	-8.0	-7.2	-7.4	-7.7	31
SC5	-8.5	-7.8	-8.3	-8.3	-8.2	-8.3	-7.7	-8.5	-8.2	-7.9	-8.7	-8.9	-9.1	-8.5	-8.7	-9.2	-9.1	-8.6	-8.5	36
SC15	-8.4	-8.0	-8.0	-7.7	-7.9	-8.5	-8.4	-7.9	-8.6	-7.6	-7.9	-6.8	-7.6	-7.5	-8.3	-7.4	-7.3	-7.2	-7.5	30
SC8	-8.4	-7.8	-8.2	-7.8	-7.9	-7.9	-8.0	-7.9	-8.1	-8.3	-8.4	-8.7	-8.5	-8.4	-9.0	-8.9	-8.8	-8.0	-8.4	37
SC11	-8.3	-7.7	-8.0	-7.9	-7.5	-7.6	-8.1	-7.8	-7.8	-8.1	-8.5	-8.0	-8.2	-7.7	-7.9	-7.9	-8.2	-8.0	-8.1	31
SC10	-8.3	-8.0	-8.2	-8.2	-8.1	-8.1	-7.8	-8.2	-8.5	-8.4	-8.3	-8.5	-8.4	-8.5	-8.9	-9.1	-8.9	-8.7	-8.3	31
SC1	-8.3	-8.0	-8.2	-7.6	-7.9	-7.7	-8.3	-8.5	-8.4	-8.0	-8.7	-8.7	-8.8	-8.8	-8.6	-9.1	-9.1	-8.3	-8.4	36
SC6	-8.3	-7.6	-8.4	-8.1	-7.8	-8.2	-7.6	-8.1	-8.4	-7.8	-8.6	-7.9	-8.6	-7.9	-8.2	-8.6	-8.3	-8.6	-7.6	35
SC7	-8.3	-8.4	-8.1	-8.5	-7.9	-8.2	-8.0	-8.1	-7.9	-8.5	-9.1	-7.9	-9.1	-8.6	-8.8	-9.2	-9.0	-8.6	-8.0	38
S14	-8.3	-8.3	-8.5	-8.2	-7.9	-7.9	-8.4	-8.4	-8.4	-7.7	-7.1	-7.5	-7.9	-7.5	-7.5	-7.7	-7.0	-6.9	-7.8	34
AC3	-8.2	-8.3	-8.4	-7.7	-8.4	-8.7	-8.1	-8.4	-8.2	-7.9	-8.2	-8.1	-8.5	-8.2	-7.8	-8.3	-7.9	-7.9	-7.6	37
S18	-8.2	-7.8	-8.1	-7.3	-8.7	-8.4	-8.7	-8.6	-8.0	-7.8	-8.5	-7.3	-8.5	-8.8	-8.3	-8.5	-8.0	-7.8	-7.9	31
SC3	-8.2	-7.7	-8.2	-8.3	-8.0	-8.3	-8.2	-8.2	-8.0	-8.2	-9.0	-9.1	-8.8	-8.6	-9.3	-9.3	-8.6	-8.8	-8.3	37
AC1	-8.1	-7.9	-8.6	-8.1	-7.6	-8.6	-8.3	-7.8	-7.5	-7.6	-8.6	-8.2	-8.2	-7.6	-7.8	-8.0	-7.7	-8.0	-8.0	36
AC4	-8.0	-7.8	-8.4	-8.0	-8.8	-8.0	-8.4	-8.2	-7.9	-7.7	-8.6	-8.4	-8.8	-8.2	-8.4	-8.6	-8.3	-8.4	-8.2	37
SC12	-8.0	-8.0	-7.9	-7.4	-8.3	-8.4	-7.8	-8.0	-8.2	-7.5	-8.6	-7.9	-8.7	-7.7	-7.9	-8.4	-8.1	-8.1	-7.6	44
CID_41774	-8.0	-8.0	-8.0	-7.8	-8.3	-8.0	-8.3	-8.7	-8.3	-8.3	-6.7	-7.6	-7.8	-7.1	-7.4	-7.8	-7.0	-7.2	-7.8	38
S13	-8.0	-8.4	-8.2	-8.1	-8.0	-8.0	-8.1	-8.1	-8.4	-8.2	-8.1	-7.9	-8.2	-7.4	-8.0	-8.1	-8.1	-7.4	-7.9	34
AC2	-7.9	-8.1	-8.1	-8.1	-8.0	-7.8	-8.1	-7.9	-8.3	-7.8	-6.6	-7.2	-7.4	-7.1	-7.2	-7.4	-7.1	-7.3	-7.5	38
S19	-7.9	-8.0	-8.3	-7.5	-7.6	-7.6	-7.6	-8.5	-8.0	-7.9	-8.2	-7.4	-7.5	-7.2	-7.5	-7.5	-7.8	-7.6	-7.4	28
CID_9561018	-7.8	-7.4	-7.6	-7.8	-7.6	-7.2	-7.6	-6.9	-7.0	-7.1	-8.9	-8.0	-8.9	-8.5	-8.5	-8.6	-8.4	-8.0	-8.6	31
SC2	-7.7	-7.5	-7.7	-8.1	-7.8	-7.8	-7.9	-7.7	-8.1	-8.2	-7.0	-7.2	-7.1	-7.0	-7.4	-7.2	-7.3	-7.2	-7.4	25
5SW	-7.6	-7.7	-7.9	-7.8	-7.5	-7.6	-7.7	-8.2	-7.7	-7.3	-8.3	-8.2	-8.5	-8.4	-8.7	-8.7	-8.7	-8.3	-8.6	30
SC9	-7.6	-7.7	-8.3	-8.1	-8.0	-7.4	-7.6	-7.7	-7.9	-7.6	-7.5	-7.7	-7.6	-7.8	-7.8	-7.7	-7.9	-7.7	-8.3	23
S26	-7.6	-7.0	-7.1	-7.1	-6.8	-7.1	-6.9	-7.1	-7.1	-6.5	-8.1	-7.7	-8.4	-7.6	-8.1	-8.4	-7.9	-8.0	-7.7	37
AC1	-7.5	-7.5	-8.6	-8.0	-8.1	-8.2	-7.4	-7.9	-7.8	-7.8	-8.1	-7.3	-8.0	-7.4	-7.1	-7.6	-7.7	-8.1	-7.4	26
CID_9561016	-7.5	-7.3	-7.5	-7.5	-7.3	-7.4	-7.4	-7.1	-7.2	-7.1	-8.5	-7.3	-8.0	-8.4	-7.6	-7.8	-7.2	-7.4	-8.7	23
A30	-7.4	-7.0	-7.2	-7.4	-7.0	-7.1	-6.9	-7.0	-7.8	-7.8	-7.5	-7.1	-7.6	-7.0	-6.8	-6.8	-7.2	-7.3	-7.1	27
CID_57187251	-7.4	-6.8	-6.9	-7.3	-7.0	-6.8	-7.0	-7.3	-6.5	-5.9	-7.1	-7.3	-7.2	-7.3	-7.2	-7.4	-7.2	-7.2	-7.0	24
CID_9566349	-7.4	-6.8	-7.4	-7.4	-7.3	-7.6	-7.1	-7.1	-7.1	-6.9	-9.0	-8.6	-8.4	-8.1	-8.8	-8.9	-8.5	-8.6	-8.0	24
CID_18335849	-7.3	-7.1	-7.5	-7.4	-7.3	-7.3	-7.1	-7.6	-7.1	-7.2	-8.0	-6.6	-8.2	-8.2	-7.6	-7.6	-7.2	-6.7	-8.5	24
A21	-7.2	-7.1	-7.4	-7.4	-7.3	-7.3	-7.2	-7.4	-7.1	-7.2	-7.8	-6.3	-7.3	-6.9	-7.3	-8.2	-7.2	-7.2	-7.2	34
CID_5460037	-7.2	-7.4	-7.7	-7.2	-7.3	-7.8	-7.0	-7.4	-7.6	-7.0	-8.2	-8.2	-8.3	-8.1	-8.4	-8.3	-8.3	-8.6	-8.1	22
A20	-7.1	-7.0	-7.2	-7.5	-7.0	-7.4	-7.2	-7.1	-7.0	-6.9	-8.0	-8.6	-8.4	-8.4	-8.5	-8.3	-8.3	-8.1	-8.3	23
CID_124021	-7.1	-7.2	-7.1	-7.0	-7.0	-7.3	-7.2	-7.4	-7.6	-7.1	-8.5	-8.0	-7.7	-8.3	-8.5	-8.7	-8.4	-8.0	-8.3	24
CID_440255	-7.1	-7.4	-7.9	-7.8	-7.4	-7.4	-7.2	-7.8	-7.5	-7.3	-7.4	-7.4	-7.4	-7.0	-7.5	-6.8	-7.3	-7.4	-7.0	34
CID_5289421	-7.1	-7.3	-7.7	-6.8	-7.0	-7.3	-6.8	-7.0	-7.2	-6.6	-6.6	-6.8	-7.0	-6.6	-6.7	-6.6	-7.2	-7.0	-7.0	30
CID_57231970	-7.1	-6.7	-7.0	-7.4	-6.8	-7.0	-7.2	-7.2	-7.0	-6.9	-7.3	-7.4	-7.4	-7.1	-7.4	-7.5	-7.3	-7.5	-7.2	26
CID_6399441	-7.1	-7.1	-7.3	-6.7	-6.9	-6.6	-7.4	-6.9	-7.0	-7.0	-7.1	-6.9	-7.1	-7.2	-7.2	-7.5	-7.5	-7.1	-7.3	19
5LA	-7.0	-6.7	-6.7	-6.9	-6.3	-6.9	-6.6	-7.0	-6.6	-6.6	-6.8	-6.9	-7.0	-6.9	-7.1	-7.0	-7.1	-7.0	-7.1	18
5PY	-7.0	-6.7	-6.9	-6.7	-6.3	-6.7	-6.6	-6.9	-6.6	-6.3	-7.7	-7.0	-7.4	-7.2	-7.8	-8.0	-7.3	-7.3	-7.6	34
CID_449437	-7.0	-7.3	-7.5	-7.3	-7.6	-7.8	-7.3	-7.4	-7.3	-7.1	-7.3	-7.2	-7.3	-7.2	-7.5	-7.2	-7.3	-7.0	-7.3	31
CID_54389373	-7.0	-7.2	-7.0	-8.1	-7.1	-7.5	-7.0	-7.4	-6.8	-6.7	-8.0	-7.7	-7.8	-7.8	-7.4	-7.7	-7.7	-7.8	-7.7	22
CID_57130768	-7.0	-6.7	-6.8	-7.2	-6.7	-6.3	-7.1	-7.1	-6.8	-7.1	-8.4	-7.7	-8.3	-8.2	-7.9	-8.1	-8.0	-7.9	-8.5	20
S11	-7.0	-7.0	-6.9	-6.8	-6.5	-6.6	-6.8	-6.7	-6.4	-6.9	-6.9	-6.6	-7.2	-6.8	-7.0	-7.1	-6.6	-6.7	-6.5	18
S33	-7.0	-6.3	-6.5	-6.3	-6.2	-6.6	-6.5	-6.2	-6.2	-5.9	-8.7	-8.9	-8.6	-8.5	-8.7	-8.8	-8.9	-8.7	-8.7	21
A48	-6.9	-7.1	-7.2	-7.2	-7.0	-7.1	-6.9	-7.1	-7.1	-6.7	-7.3	-6.7	-6.8	-6.3	-6.3	-6.6	-6.5	-6.6	-6.7	34
CID_189746	-6.9	-7.3	-7.1	-7.0	-6.9	-7.5	-7.1	-7.5	-7.3	-7.0	-6.8	-6.9	-6.9	-6.2	-6.8	-6.5	-7.0	-6.8	-6.6	19
CID_5354802	-6.8	-6.5	-6.5	-6.8	-6.2	-6.4	-6.5	-6.7	-6.3	-6.3	-6.9	-6.8	-6.9	-6.5	-6.7	-6.4	-6.4	-6.6	-6.2	19
CID_9561107	-6.7	-6.6	-6.5	-6.7	-6.2	-6.4	-6.6	-6.7	-6.4	-6.1	-7.3	-7.2	-7.2	-7.2	-7.6	-7.6	-7.7	-6.8	-7.3	23
CID_128839	-6.6	-6.4	-7.0	-6.5	-6.9	-6.8	-6.9	-7.1	-7.0	-6.6	-6.2	-5.7	-6.5	-5.7	-6.0	-6.3	-6.1	-6.1	-5.7	23
CID16214802	-6.5	-6.3	-6.7	-6.5	-6.3	-6.9	-6.5	-6.3	-6.5	-6.0	-6.8	-7.0	-7.2	-6.8	-7.0	-7.3	-7.1	-7.1	-6.9	19
CID_122647	-6.4	-6.1	-6.2	-6.5	-6.1	-6.3	-6.3	-6.5	-6.3	-6.2	-6.1	-5.5	-6.2	-5.8	-5.5	-5.3	-5.4	-5.7	-6.1	18
CID_360941	-6.4	-6.3	-6.1	-6.5	-6.2	-6.4	-6.5	-6.6	-6.2	-6.1	-6.4	-5.6	-6.5	-5.5	-5.6	-5.6	-5.5	-5.8	-5.8	16
A33	-6.3	-5.9	-6.2	-5.9	-5.8	-5.7	-5.9	-5.8	-6.3	-6.0	-6.7	-5.6	-6.5	-6.1	-6.8	-7.1	-5.5	-6.5	-6.5	23
CID11333	-6.3	-6.6	-6.7	-6.5	-6.3	-6.5	-6.7	-6.7	-6.6	-6.2	-6.6	-6.1	-6.4	-6.0	-6.2	-6.4	-6.1	-6.3	-6.2	18
CID_6713648	-6.3	-6.1	-6.1	-6.3	-5.9	-6.2	-6.0	-5.9	-6.4	-6.3	-6.1	-5.9	-6.3	-6.2	-6.3	-6.0	-5.9	-6.0	-6.0	17

	Conformações obtidas por PCA										Estruturas cristalográficas								Nºde heavy atoms	
	98566	98567	98568	98569	98570	98571	98572	98573	98574	98575	1HXK	2F1A	2OW6	3BLB	3D4Y	3D51	3DDF	3DX4		3EJU
S30	-6,3	-5,9	-6,0	-5,9	-5,8	-6,3	-6,2	-6,0	-5,8	-5,6	-6,4	-5,8	-6,3	-6,0	-5,8	-5,7	-5,9	-6,5	-5,8	18
CID_230386	-6,2	-6,2	-6,2	-6,1	-6,1	-6,6	-6,5	-6,3	-6,2	-6,2	-6,6	-5,6	-6,3	-5,9	-5,8	-5,8	-5,4	-6,0	-6,5	18
CID_568288	-6,2	-6,2	-6,2	-6,5	-6,1	-6,4	-6,4	-6,3	-6,1	-5,9	-6,2	-5,9	-6,5	-6,1	-6,2	-6,4	-6,0	-6,3	-5,8	17
S32	-6,2	-6,1	-6,0	-5,8	-5,7	-6,3	-6,3	-6,1	-5,8	-5,5	-7,4	-7,4	-6,8	-7,0	-7,1	-7,3	-7,4	-7,0	-7,1	26
CID_6436933	-6,1	-7,2	-7,5	-7,6	-6,3	-6,9	-6,1	-6,5	-6,6	-6,5	-6,3	-5,4	-6,1	-6,0	-6,2	-6,3	-5,7	-5,8	-6,8	15
S18	-6,1	-5,8	-6,2	-5,7	-5,3	-5,8	-5,8	-6,0	-5,7	-5,4	-6,1	-5,8	-6,3	-5,9	-6,0	-6,2	-5,7	-6,0	-6,4	18
S27	-6,1	-5,7	-5,7	-5,6	-5,7	-5,8	-6,2	-5,7	-5,6	-5,4	-6,3	-6,1	-6,4	-6,3	-6,2	-6,2	-6,0	-6,2	-6,4	17
CID_235477	-6,0	-6,3	-5,9	-6,1	-5,7	-5,9	-5,9	-6,1	-6,6	-5,8	-6,0	-5,7	-6,2	-5,9	-5,9	-5,8	-5,5	-6,3	-6,2	18
CID_2802069	-6,0	-6,0	-6,2	-6,2	-5,8	-6,0	-5,9	-6,2	-6,0	-5,9	-5,6	-5,6	-5,9	-6,0	-5,6	-5,6	-5,7	-5,6	-6,0	15
S13	-6,0	-5,7	-5,9	-5,5	-5,5	-5,4	-5,5	-5,6	-5,7	-5,5	-5,7	-5,5	-6,0	-6,1	-5,5	-5,5	-5,6	-5,4	-6,1	16
S19	-6,0	-5,4	-5,7	-5,6	-5,4	-5,7	-5,8	-5,6	-5,5	-5,6	-5,5	-5,6	-6,1	-6,0	-5,6	-5,6	-5,8	-5,5	-6,6	15
S20	-6,0	-5,6	-5,8	-5,7	-5,4	-5,8	-5,8	-5,9	-5,6	-5,7	-6,6	-6,1	-6,8	-6,7	-6,3	-6,2	-6,1	-6,0	-6,9	17
S34	-6,0	-5,9	-6,2	-6,1	-5,8	-6,0	-6,2	-6,3	-6,2	-6,2	-5,8	-5,0	-6,0	-7,0	-5,3	-5,4	-5,2	-5,3	-7,3	14
A9	-5,9	-5,3	-5,8	-5,5	-5,1	-5,5	-5,7	-5,5	-5,9	-5,1	-6,2	-6,0	-5,9	-5,7	-5,9	-6,0	-5,9	-5,9	-5,7	15
CID_2723655	-5,9	-5,8	-5,8	-5,7	-5,3	-5,4	-5,7	-6,1	-5,2	-5,4	-6,5	-6,2	-6,6	-6,5	-6,5	-6,6	-6,0	-6,1	-6,5	14
CID_93075	-5,9	-6,0	-5,6	-5,8	-6,1	-6,3	-5,8	-6,1	-5,8	-6,4	-5,9	-5,3	-6,5	-6,2	-5,7	-6,0	-5,5	-5,6	-6,9	16
S12	-5,9	-5,5	-5,9	-5,5	-5,5	-5,7	-5,6	-5,7	-5,7	-5,5	-5,8	-5,3	-6,4	-6,4	-5,4	-5,7	-5,5	-5,2	-6,8	14
S14	-5,9	-5,6	-5,7	-5,4	-5,3	-5,5	-5,5	-5,8	-5,4	-5,6	-6,5	-6,1	-6,4	-6,3	-6,4	-6,5	-6,1	-6,2	-7,1	16
S17	-5,9	-5,9	-6,1	-5,6	-5,3	-5,7	-5,7	-6,0	-5,8	-5,4	-5,2	-5,2	-5,5	-5,4	-5,4	-5,3	-5,4	-5,3	-5,2	15
A13	-5,8	-5,8	-6,0	-5,7	-5,7	-5,8	-6,0	-6,1	-5,7	-5,8	-6,5	-6,0	-6,4	-6,2	-6,4	-6,5	-6,0	-6,1	-6,6	14
A49	-5,8	-5,6	-5,6	-5,5	-5,1	-5,5	-5,7	-5,8	-5,5	-5,1	-6,6	-5,8	-6,8	-6,3	-5,8	-6,0	-5,8	-6,4	-6,2	15
CID_84265	-5,8	-5,6	-5,7	-5,9	-5,7	-5,6	-5,5	-5,8	-5,4	-5,7	-6,6	-5,6	-6,8	-6,5	-6,5	-6,8	-6,0	-6,4	-6,9	15
S10	-5,8	-6,0	-6,0	-5,7	-5,6	-5,8	-5,9	-6,0	-5,7	-5,5	-5,9	-5,0	-6,3	-6,2	-5,4	-5,5	-5,1	-5,1	-6,6	13
S15	-5,8	-5,6	-5,5	-5,6	-5,3	-5,5	-5,5	-5,8	-5,6	-5,6	-6,2	-5,9	-6,2	-6,2	-6,2	-6,1	-6,2	-6,0	-6,2	16
S16	-5,8	-5,7	-5,7	-5,7	-5,7	-5,9	-5,9	-5,9	-5,8	-5,7	-5,4	-5,1	-5,7	-5,8	-5,2	-5,3	-5,2	-5,1	-6,4	14
S21	-5,8	-5,5	-5,6	-5,6	-5,2	-5,5	-5,5	-5,7	-5,4	-5,6	-6,2	-5,7	-6,4	-5,9	-6,1	-6,4	-5,8	-6,2	-6,3	14
S25	-5,8	-5,7	-5,6	-5,6	-5,2	-5,6	-5,9	-5,9	-5,4	-5,4	-5,4	-5,4	-5,9	-5,9	-5,4	-5,7	-5,8	-5,5	-5,9	17
S29	-5,8	-5,7	-5,7	-5,7	-5,6	-5,6	-5,9	-5,8	-5,7	-5,5	-5,6	-5,6	-5,5	-5,6	-5,7	-5,7	-5,7	-5,4	-5,8	13
I1	-5,7	-5,4	-5,7	-5,4	-5,3	-5,4	-5,4	-5,7	-5,5	-5,1	-6,2	-5,7	-6,4	-6,1	-6,2	-6,4	-5,8	-6,3	-6,5	15
A10	-5,7	-6,1	-6,0	-5,7	-5,6	-6,0	-6,2	-6,4	-6,0	-5,8	-6,5	-5,5	-6,3	-6,5	-5,9	-6,2	-5,7	-6,0	-6,8	15
A31	-5,7	-5,9	-5,9	-6,0	-5,5	-5,9	-5,9	-6,4	-5,8	-5,7	-6,4	-5,9	-6,3	-6,6	-6,4	-6,4	-6,0	-6,1	-6,8	16
A32	-5,7	-5,8	-6,0	-5,7	-5,3	-5,6	-5,6	-5,9	-5,7	-5,6	-6,2	-5,7	-6,4	-6,1	-6,2	-6,4	-5,8	-6,3	-6,5	15
A11	-5,7	-6,1	-6,0	-5,7	-5,6	-6,0	-6,2	-6,4	-6,0	-5,8	-6,0	-5,5	-6,2	-6,0	-6,0	-5,8	-6,1	-7,6	-7,6	15
A24	-5,7	-6,0	-6,1	-5,9	-5,5	-5,8	-5,8	-6,0	-5,9	-5,5	-6,6	-5,0	-6,6	-5,7	-5,3	-5,6	-5,0	-6,0	-5,7	12
DET	-5,7	-5,3	-5,6	-5,5	-5,5	-5,4	-5,2	-5,4	-5,2	-5,3	-6,3	-5,9	-6,4	-6,0	-6,3	-6,6	-6,0	-6,2	-6,7	14
S23	-5,7	-5,8	-5,7	-5,5	-5,3	-5,6	-5,9	-5,8	-5,5	-5,3	-6,4	-5,1	-6,2	-6,5	-5,6	-5,5	-5,2	-5,7	-6,5	14
10A	-5,6	-5,2	-5,8	-5,3	-5,3	-5,2	-5,6	-5,6	-5,3	-5,1	-6,7	-5,4	-6,9	-6,7	-6,4	-6,7	-6,3	-6,9	-6,8	13
3A	-5,6	-5,4	-5,7	-5,5	-5,6	-5,6	-5,8	-5,7	-5,6	-5,6	-5,0	-5,0	-5,5	-5,0	-5,2	-5,3	-5,3	-5,1	-5,1	14
6A	-5,6	-5,3	-5,4	-5,4	-5,7	-5,5	-5,6	-5,3	-5,2	-5,1	-6,4	-5,5	-6,2	-6,8	-6,0	-6,1	-5,6	-5,9	-7,1	16
A26	-5,6	-5,9	-6,0	-5,8	-5,5	-5,9	-5,7	-6,2	-5,7	-5,5	-6,5	-5,9	-6,3	-6,2	-6,4	-6,5	-5,9	-6,1	-6,3	14
A45	-5,6	-5,6	-5,6	-5,6	-5,2	-5,5	-5,4	-5,8	-5,5	-5,2	-5,6	-5,7	-5,8	-5,8	-5,6	-5,7	-5,8	-5,6	-5,8	16
CID_332513	-5,6	-5,7	-5,4	-5,8	-5,5	-5,4	-5,7	-6,1	-6,2	-6,0	-6,2	-6,2	-6,2	-5,9	-6,3	-6,5	-6,0	-6,0	-6,1	12
CID_6036	-5,6	-5,5	-5,4	-5,2	-5,3	-5,3	-5,2	-5,5	-5,4	-5,1	-5,9	-5,4	-5,8	-5,6	-5,6	-5,7	-5,6	-5,6	-5,4	12
CID_608	-5,6	-5,1	-5,1	-4,9	-5,1	-5,3	-4,9	-5,2	-5,2	-5,1	-6,7	-5,5	-6,6	-6,4	-6,5	-6,5	-5,6	-6,1	-6,4	14
MVL	-5,6	-5,4	-5,7	-5,4	-5,5	-5,7	-5,8	-6,1	-5,5	-5,3	-6,5	-5,8	-6,6	-6,3	-6,3	-6,6	-5,9	-6,3	-6,7	14
S22	-5,6	-5,7	-5,9	-5,7	-5,3	-5,5	-5,5	-5,7	-5,4	-5,2	-6,3	-6,0	-6,3	-6,4	-6,4	-6,5	-6,0	-6,1	-6,7	14
S24	-5,6	-5,6	-5,6	-5,6	-5,2	-5,5	-5,7	-5,7	-5,5	-5,1	-5,4	-5,4	-5,7	-5,6	-5,4	-5,4	-5,5	-5,4	-5,7	16
S31	-5,6	-5,5	-5,5	-5,7	-5,6	-5,5	-5,9	-5,6	-5,5	-5,5	-6,2	-5,7	-6,3	-6,1	-6,1	-6,4	-5,8	-6,0	-6,5	12
S0	-5,5	-5,6	-5,7	-5,3	-5,1	-5,4	-5,4	-5,6	-5,3	-5,6	-5,6	-5,3	-5,7	-5,7	-5,8	-5,8	-5,3	-5,3	-5,8	14
12A	-5,5	-5,4	-5,7	-5,4	-5,3	-5,7	-5,5	-5,7	-5,5	-5,3	-5,8	-4,9	-5,6	-5,5	-4,9	-5,1	-5,0	-5,0	-5,6	13
2A	-5,5	-5,8	-5,2	-5,5	-5,4	-5,4	-5,3	-5,4	-5,0	-5,6	-6,6	-6,5	-6,7	-6,3	-6,4	-6,8	-6,4	-6,5	-6,4	13
4I	-5,5	-5,4	-5,4	-5,7	-5,6	-5,6	-5,7	-5,7	-5,5	-5,1	-5,5	-5,2	-5,7	-5,4	-5,3	-5,4	-5,1	-5,7	-5,8	14
5A	-5,5	-5,5	-5,9	-5,5	-5,3	-5,6	-5,7	-5,7	-5,6	-5,5	-5,7	-5,9	-5,9	-5,5	-5,9	-6,1	-6,0	-5,5	-5,5	13
6P	-5,5	-5,1	-5,3	-5,5	-5,2	-5,1	-5,1	-5,8	-5,0	-4,9	-6,3	-5,8	-6,2	-6,4	-6,3	-6,3	-5,9	-6,0	-6,8	15
A17	-5,5	-5,6	-5,8	-5,6	-5,2	-5,5	-5,5	-5,8	-5,6	-5,5	-6,5	-5,9	-6,3	-6,2	-6,4	-6,4	-6,0	-6,1	-6,6	14
A18	-5,5	-5,6	-5,6	-5,6	-5,2	-5,4	-5,4	-5,8	-5,6	-5,3	-6,3	-5,4	-6,3	-6,9	-5,9	-5,7	-5,5	-5,8	-7,0	16
A22	-5,5	-5,5	-5,7	-5,7	-5,4	-5,6	-5,5	-5,5	-5,5	-5,4	-6,8	-6,5	-6,4	-7,0	-6,9	-6,8	-6,6	-6,3	-7,0	13
CID_441478	-5,5	-5,3	-5,8	-5,5	-5,2	-5,5	-5,6	-6,0	-5,5	-5,5	-5,2	-4,9	-5,4	-5,0	-5,1	-5,0	-5,0	-5,0	-5,1	16
CID_6883	-5,5	-5,6	-5,3	-5,7	-5,7	-5,5	-5,3	-6,5	-5,8	-5,6	-6,8	-6,5	-6,6	-7,0	-6,9	-6,8	-6,6	-6,3	-7,0	13
CID_94715	-5,5	-5,3	-5,8	-5,4	-5,2	-5,5	-5,6	-6,0	-5,5	-5,5	-5,0	-4,7	-6,4	-4,7	-4,7	-4,6	-4,7	-4,8	-6,1	13
GOX	-5,5	-5,6	-5,8	-5,5	-5,6	-5,7	-5,5	-5,4	-5,2	-5,8	-5,4	-5,8	-5,5	-5,4	-5,5	-5,3	-5,5	-5,8	-6,2	16
S35	-5,5	-5,9	-6,1	-6,0	-5,7	-5,6	-6,1	-5,9	-5,7	-5,7	-5,7	-5,3	-5,3	-5,6	-5,4	-5,0	-5,1	-5,1	-5,9	14
11A	-5,4	-5,6	-5,7	-5,4	-5,3	-5,6	-5,5	-5,2	-5,9	-5,2	-5,6	-4,7	-5,9	-5,3	-4,9	-4,9	-4,9	-5,1	-5,3	13
1A	-5,4	-5,2	-5,3	-5,1	-5,5	-5,4	-5,1	-5,2	-5,1	-5,2	-5,7	-5,5	-6,2	-6,1	-5,7	-5,5	-5,7	-6,2	-6,2	13
2I	-5,4	-5,1	-5,4	-5,3	-5,4	-5,5	-5,4	-5,5	-5,2	-5,2	-6,7	-6,5	-6,8	-6,4	-6,6	-6,6	-6,3	-6,4	-6,6	12
A1	-5,4	-5,6	-5,4	-5,3	-5,0	-5,4	-5,4	-6,0	-5,5	-5,2	-6,7	-6,5	-6,8	-6,4	-6,6	-6,6	-6,3	-6,4	-6,4	12
A19	-5,4	-5,6	-5,6	-5,4	-5,2	-5,5	-5,5	-5,8	-5,6	-5,1	-6,0	-5,5	-5,8	-5,6	-5,9	-5,7	-5,6	-5,6	-5,4	11
CID_242516	-5,4	-5,1	-5,0	-4,9	-5,0	-5,0	-4,7	-5,3	-5,2	-4,9	-5,3	-5,2	-5,6	-5,4	-5,4	-5,3	-5,3	-5,7	-5,5	14

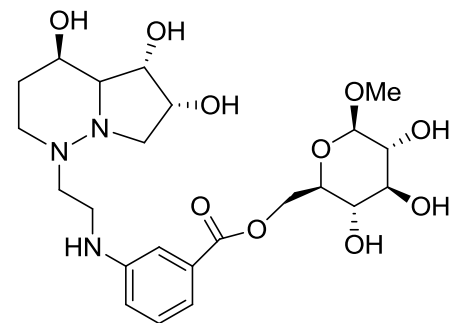
	Conformações obtidas por PCA										Estruturas cristalográficas										Nºde heavy atoms
	98566	98567	98568	98569	98570	98571	98572	98573	98574	98575	1HXK	2F1A	2OW6	3BLB	3D4Y	3D51	3DDF	3DX4	3EJU		
CID_355454	-5,4	-5,8	-5,3	-5,7	-5,2	-5,6	-5,6	-5,6	-5,9	-5,3	-6,6	-6,2	-6,5	-6,2	-6,4	-6,4	-6,3	-5,9	-6,4	13	
CID_444791	-5,4	-5,4	-6,0	-5,2	-5,2	-5,6	-5,4	-5,8	-5,4	-5,5	-5,1	-5,0	-5,6	-5,3	-5,3	-5,2	-5,3	-5,3	-5,2	15	
CID448685	-5,4	-5,3	-5,3	-5,8	-4,8	-4,8	-4,9	-5,7	-5,5	-5,8	-6,7	-6,4	-6,6	-6,6	-6,9	-6,8	-6,5	-6,4	-6,7	12	
S36	-5,4	-5,6	-5,7	-5,4	-5,1	-5,5	-5,6	-5,7	-5,4	-5,2	-6,1	-5,7	-6,3	-6,1	-5,8	-6,1	-5,8	-6,0	-6,3	12	
3I	-5,3	-5,1	-5,3	-5,3	-5,4	-5,3	-5,2	-5,4	-5,0	-4,9	-6,0	-5,7	-6,4	-6,3	-5,9	-6,1	-5,7	-6,2	-6,3	11	
6I	-5,3	-4,8	-5,6	-5,1	-5,1	-5,0	-5,2	-5,1	-4,8	-5,2	-6,3	-5,3	-6,3	-5,1	-5,4	-5,3	-5,3	-5,2	-6,7	14	
A44	-5,3	-5,3	-5,9	-5,4	-5,0	-5,3	-5,4	-5,4	-5,5	-5,3	-5,3	-5,3	-5,6	-5,3	-5,3	-5,2	-5,5	-5,5	-5,5	15	
CID_355455	-5,3	-5,1	-5,3	-5,4	-5,2	-5,5	-5,2	-5,3	-5,5	-5,2	-5,5	-5,4	-5,6	-5,4	-5,7	-5,4	-5,6	-5,5	-5,6	13	
CID_45024209	-5,3	-5,0	-5,1	-5,4	-5,1	-4,9	-4,9	-4,8	-5,1	-5,2	-5,7	-5,3	-5,6	-5,3	-5,4	-5,2	-5,7	-5,7	-5,7	12	
CID_453	-5,3	-4,9	-5,3	-5,2	-4,9	-5,2	-5,0	-5,3	-4,7	-4,9	-5,9	-5,2	-5,7	-6,0	-5,6	-5,5	-5,4	-5,8	-6,2	13	
4A	-5,2	-5,2	-5,5	-5,3	-5,2	-5,3	-5,1	-5,5	-5,5	-6,0	-5,6	-5,4	-5,5	-5,5	-5,4	-5,5	-5,0	-5,4	-5,4	12	
CID_192225	-5,2	-5,2	-5,5	-5,5	-5,1	-5,1	-4,9	-5,1	-5,3	-5,4	-5,9	-5,6	-6,1	-6,2	-5,8	-5,7	-5,6	-5,5	-5,8	12	
CID_2825893	-5,2	-5,3	-5,7	-5,3	-5,3	-5,1	-5,1	-5,3	-5,3	-5,4	-6,4	-5,8	-6,0	-5,8	-6,0	-6,1	-5,8	-5,6	-5,8	12	
CID_447343	-5,2	-5,1	-5,6	-5,0	-5,0	-5,2	-5,1	-5,5	-5,0	-5,2	-6,9	-6,6	-6,7	-6,8	-6,7	-6,8	-6,6	-6,5	-7,0	12	
CID_892	-5,2	-5,7	-5,5	-5,2	-5,3	-5,7	-5,2	-5,7	-5,7	-5,2	-6,2	-5,9	-6,1	-5,7	-6,1	-5,9	-5,9	-5,6	-5,9	11	
MAN	-5,2	-5,0	-5,3	-5,0	-5,1	-5,2	-4,9	-5,1	-4,9	-5,2	-5,8	-5,3	-5,8	-5,6	-5,5	-5,5	-5,4	-5,7	-5,7	11	
5I	-5,1	-4,9	-5,0	-5,2	-5,1	-4,9	-5,0	-4,9	-5,2	-5,0	-5,4	-5,2	-6,1	-5,3	-5,2	-5,3	-5,3	-5,4	-5,2	12	
7P	-5,1	-5,0	-5,1	-5,4	-4,8	-5,2	-5,1	-5,6	-5,1	-5,1	-6,0	-4,9	-5,7	-5,2	-5,1	-5,4	-5,2	-5,4	-5,3	13	
CID_101798	-5,1	-5,1	-5,1	-5,0	-5,0	-5,2	-5,0	-5,5	-5,0	-5,1	-5,2	-4,6	-5,2	-5,0	-4,8	-4,9	-4,7	-5,0	-4,9	15	
CID448686	-5,1	-4,9	-5,0	-5,0	-5,1	-4,9	-5,1	-5,1	-5,1	-5,1	-5,4	-4,7	-6,2	-4,8	-4,4	-4,5	-4,4	-4,4	-5,2	12	
CID_45039313	-5,1	-5,1	-5,1	-5,0	-5,0	-5,0	-5,0	-5,3	-4,9	-4,9	-5,9	-4,9	-6,4	-6,1	-5,0	-5,9	-4,9	-5,2	-6,4	15	
CID70680055	-5,1	-4,9	-5,5	-5,0	-5,0	-5,0	-5,5	-5,7	-5,2	-5,0	-5,5	-5,1	-5,4	-5,3	-5,0	-5,2	-5,0	-5,6	-5,2	12	
8P	-5,0	-4,8	-4,9	-5,1	-4,9	-4,8	-4,5	-5,0	-4,6	-4,8	-5,9	-5,7	-6,0	-5,8	-5,8	-5,7	-5,9	-5,6	-5,9	12	
CID_439709	-5,0	-5,0	-5,3	-4,8	-5,1	-5,3	-5,0	-5,2	-5,2	-5,4	-6,2	-6,0	-6,4	-6,0	-6,1	-5,8	-5,8	-5,7	-6,1	11	
CID_441437	-5,0	-5,4	-5,2	-5,1	-5,0	-5,4	-5,2	-5,9	-5,2	-5,0	-5,7	-4,5	-5,7	-5,5	-4,4	-4,4	-4,5	-4,7	-4,9	12	
CID447343	-5,0	-5,0	-5,0	-4,9	-4,9	-5,1	-4,9	-5,3	-5,0	-5,0	-5,7	-4,5	-5,3	-4,3	-4,4	-4,4	-4,5	-4,6	-4,6	12	
CID5327089	-5,0	-5,2	-5,0	-4,6	-4,7	-4,7	-4,7	-5,1	-5,0	-4,9	-5,8	-5,8	-6,2	-6,2	-5,5	-5,8	-5,3	-5,8	-5,6	12	
CID_6713932	-5,0	-5,2	-5,3	-5,0	-5,0	-5,0	-4,7	-5,6	-5,1	-5,3	-6,6	-6,2	-6,6	-6,3	-6,6	-6,7	-6,4	-6,3	-6,3	11	
CID_71460008	-5,0	-5,0	-4,9	-5,1	-4,9	-5,5	-5,3	-5,5	-5,2	-4,9	-5,8	-4,9	-5,9	-5,4	-5,2	-4,9	-4,9	-5,0	-5,2	12	
CID_73240330	-5,0	-4,9	-5,3	-4,8	-5,0	-5,0	-5,0	-5,2	-5,0	-4,9	-5,7	-5,4	-5,9	-5,5	-6,0	-6,0	-6,0	-5,5	-5,5	13	
6P	-4,9	-5,1	-5,3	-5,5	-5,2	-5,1	-5,1	-5,8	-5,9	-5,0	-5,5	-5,2	-6,1	-5,3	-5,2	-5,3	-5,4	-5,4	-5,4	12	
7P	-4,9	-5,0	-5,1	-5,4	-4,7	-5,2	-5,1	-5,6	-5,1	-5,1	-5,8	-5,4	-6,0	-6,3	-5,4	-5,3	-5,4	-5,6	-6,4	12	
CID_219402	-4,9	-5,1	-5,4	-5,0	-5,0	-5,1	-5,1	-5,3	-5,2	-5,2	-4,7	-5,4	-4,8	-4,9	-4,9	-4,8	-4,8	-4,8	-5,0	14	
CID_257255	-4,9	-4,9	-5,0	-4,9	-5,1	-4,9	-5,1	-5,0	-4,9	-4,8	-6,0	-5,9	-5,8	-5,8	-5,9	-6,1	-5,7	-5,4	-5,8	10	
CID_6027	-4,9	-5,1	-5,2	-4,8	-4,9	-5,0	-4,7	-5,2	-5,1	-4,8	-5,6	-4,3	-5,2	-4,2	-4,3	-4,2	-4,4	-4,4	-4,4	12	
CID71627395	-4,9	-5,4	-5,4	-4,8	-5,3	-5,1	-5,0	-5,6	-5,2	-4,8	-6,6	-5,7	-6,5	-5,8	-5,9	-6,0	-5,8	-5,8	-5,8	12	
CID_20484	-4,8	-5,2	-5,0	-5,0	-4,9	-5,3	-5,3	-5,5	-5,0	-4,9	-6,5	-5,7	-5,9	-5,6	-5,8	-6,2	-5,7	-5,8	-5,5	11	
DMJ	-4,8	-5,0	-4,9	-5,2	-4,7	-5,3	-4,9	-5,4	-5,1	-4,9	-5,5	-5,0	-5,4	-5,1	-5,3	-4,9	-4,9	-5,3	-5,2	11	
1P	-4,7	-4,6	-4,9	-5,1	-4,7	-4,7	-4,7	-4,9	-5,1	-4,5	-5,7	-6,0	-6,0	-5,6	-5,9	-6,0	-6,2	-6,1	-5,5	9	
4P	-4,7	-4,5	-5,0	-4,4	-4,7	-4,9	-4,6	-5,0	-4,4	-4,5	-5,1	-4,4	-5,3	-4,7	-4,4	-4,4	-4,5	-4,5	-4,4	11	
CID_2724705	-4,7	-4,8	-4,8	-4,5	-4,7	-4,9	-4,6	-4,8	-4,7	-4,7	-5,7	-5,0	-5,2	-5,5	-5,2	-4,9	-4,8	-5,7	-5,5	12	
CID_71320117	-4,7	-5,2	-5,1	-5,0	-4,8	-5,2	-4,9	-5,1	-5,4	-5,6	-5,3	-4,8	-5,1	-4,8	-4,8	-5,0	-4,9	-4,9	-5,0	10	
2P	-4,6	-4,5	-4,6	-4,6	-4,7	-4,7	-4,6	-4,9	-4,8	-4,6	-5,4	-4,8	-5,3	-5,1	-5,1	-5,2	-5,0	-5,5	-5,4	9	
3P	-4,6	-4,5	-4,5	-5,1	-4,5	-4,5	-4,4	-4,8	-4,4	-4,7	-5,8	-5,1	-5,9	-5,4	-5,2	-5,0	-5,2	-5,2	-5,2	10	
CID_6912	-4,6	-4,4	-4,5	-4,7	-4,5	-4,4	-4,3	-4,5	-4,3	-4,8	-5,3	-4,6	-5,2	-5,0	-4,7	-4,6	-4,2	-4,8	-4,7	9	
CID_73241354	-4,6	-4,5	-4,6	-4,5	-4,6	-4,4	-4,3	-4,5	-4,7	-4,5	-5,3	-5,0	-5,2	-4,7	-4,9	-5,0	-4,7	-5,0	-5,0	9	
5P	-4,4	-4,3	-4,4	-4,8	-4,2	-4,4	-4,4	-4,6	-4,3	-4,4	-5,3	-5,0	-5,2	-4,7	-4,9	-5,0	-4,7	-5,1	-5,0	9	

Anexo 2-Estrutura e nomenclatura das moléculas usadas

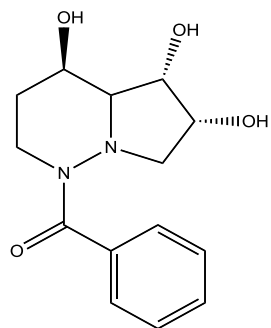




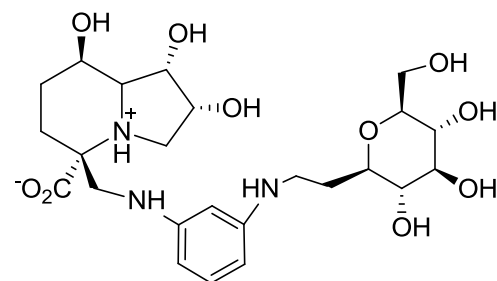
SC8



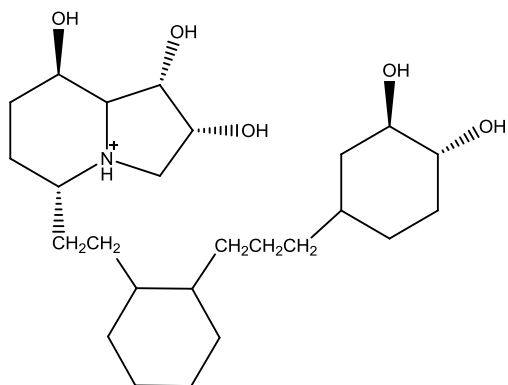
AC4



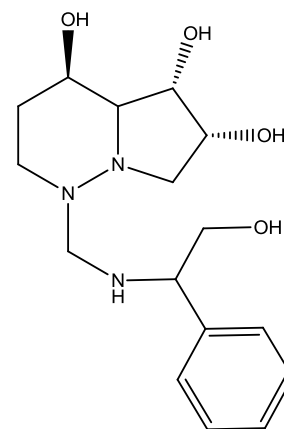
A48



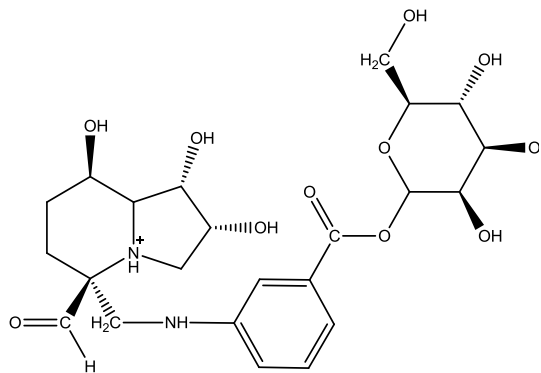
SC18



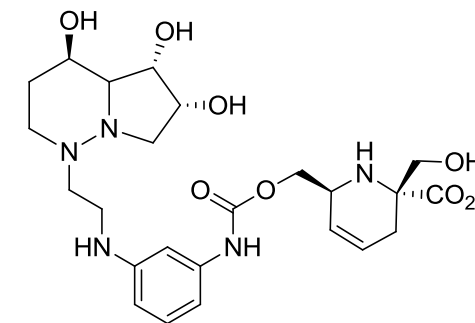
SC2



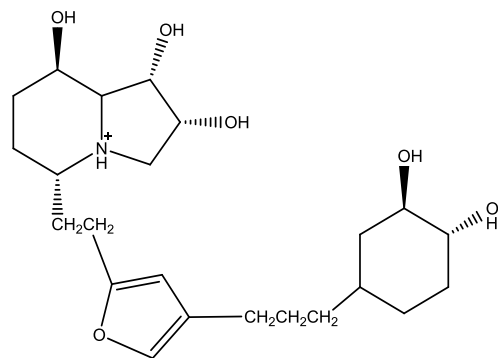
A30



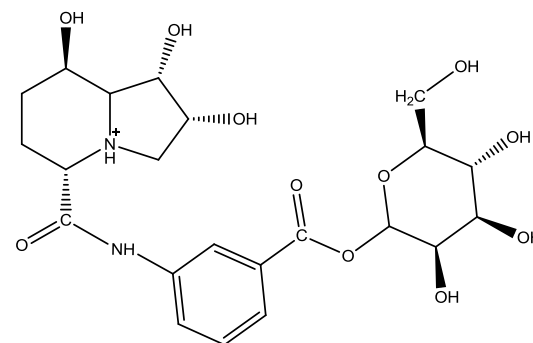
SC12



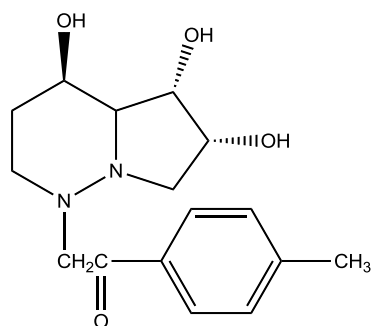
AC1



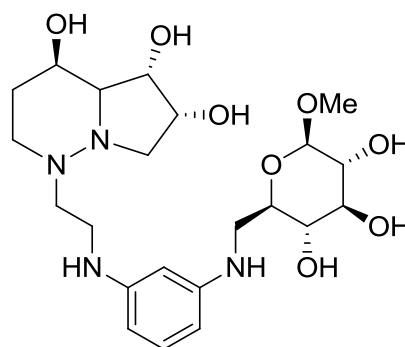
SC9



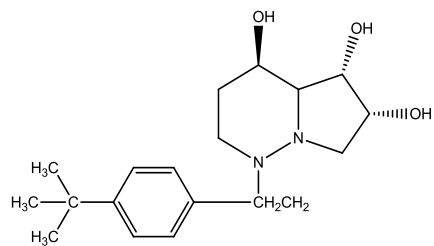
SC6



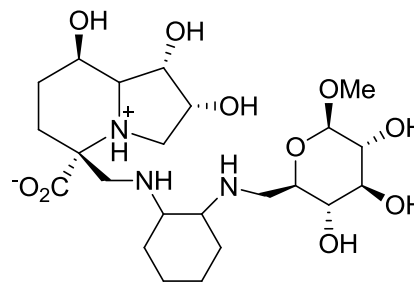
A20



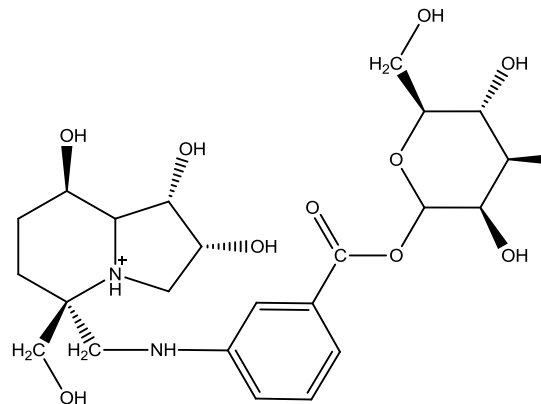
AC3



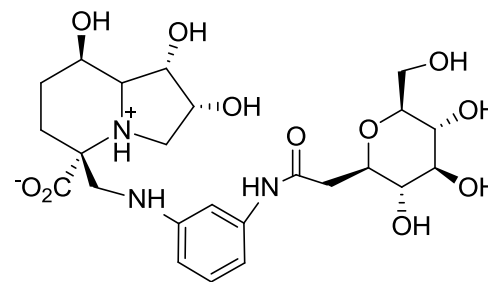
A21



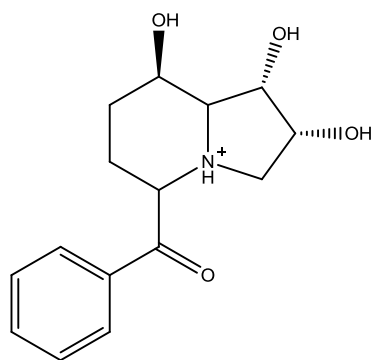
S15



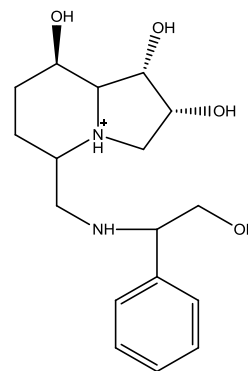
SC11



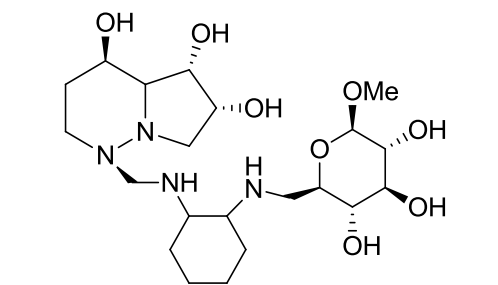
S17



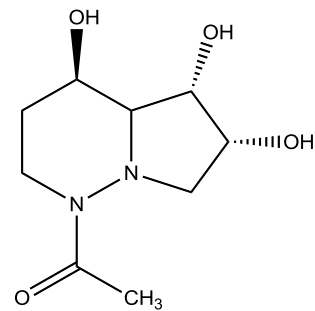
S11



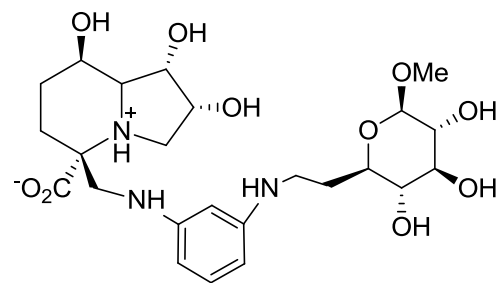
S26



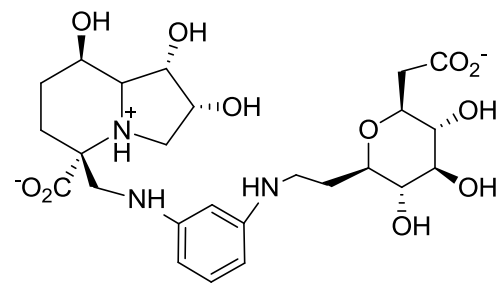
AC1



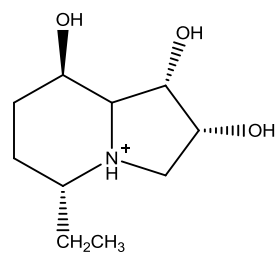
A24



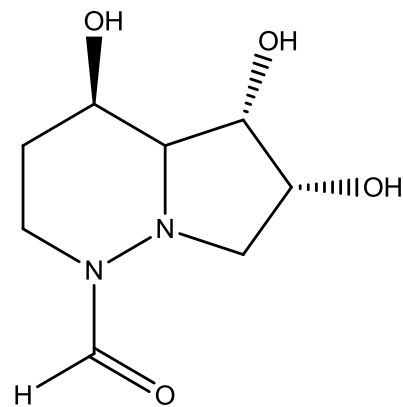
SC16



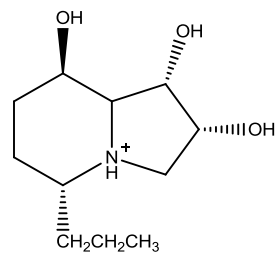
SC19



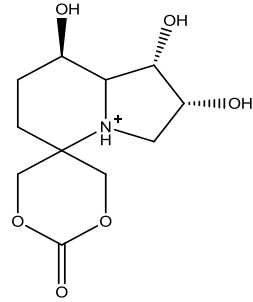
S14



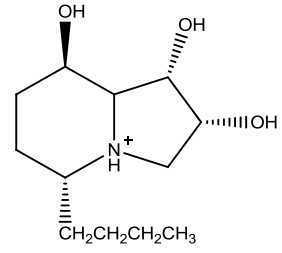
A23



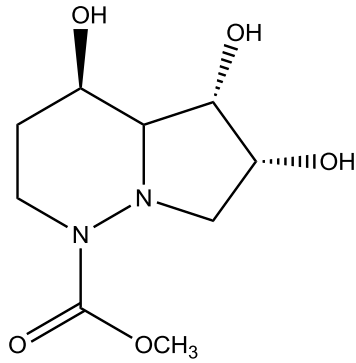
S13



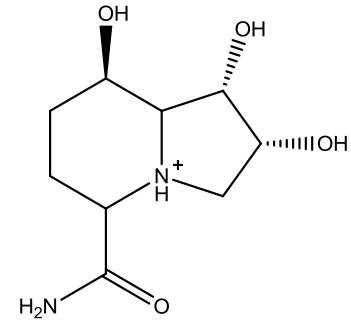
S33



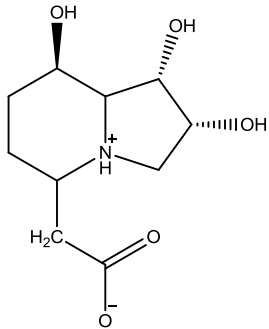
A22



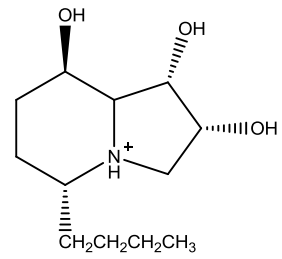
A26



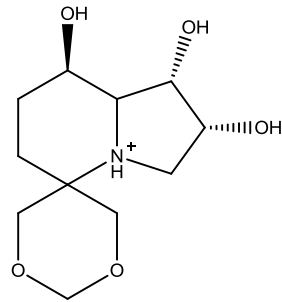
S10



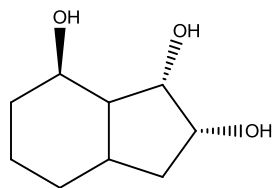
S17



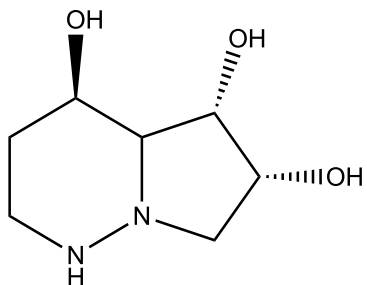
S12



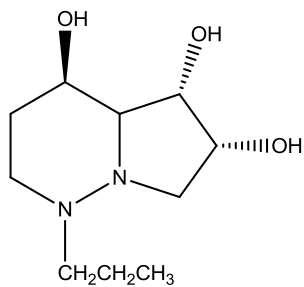
S34



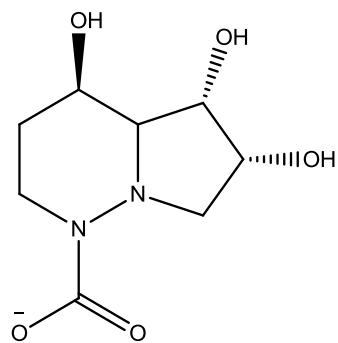
S36



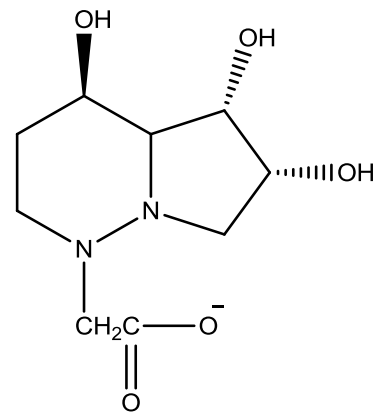
A1



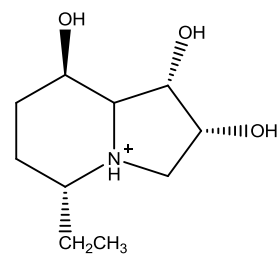
A17



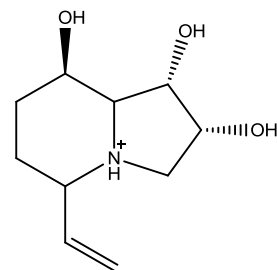
A31



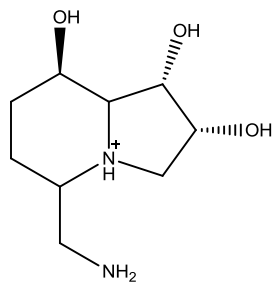
A32



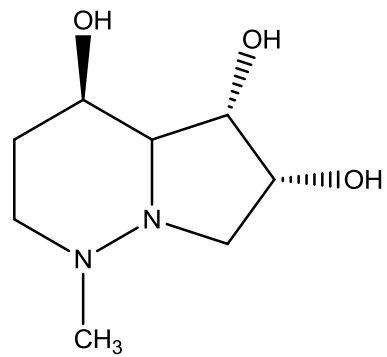
S14



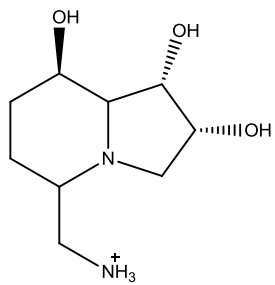
S22



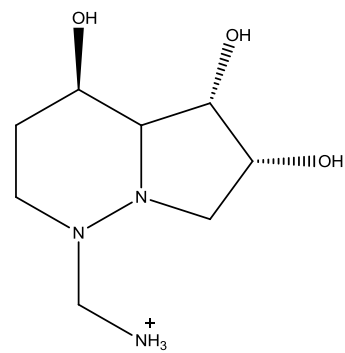
S23



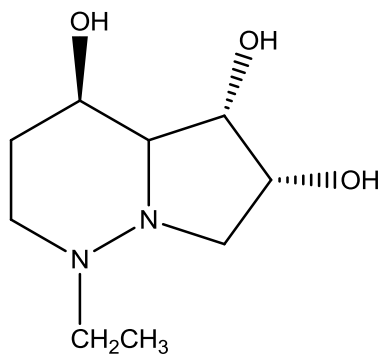
A19



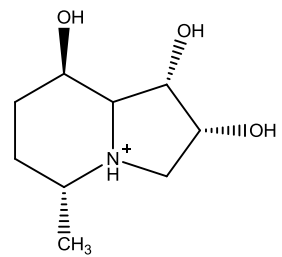
S24



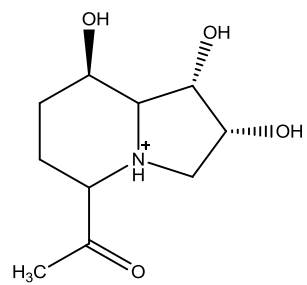
A49



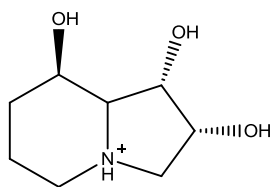
A18



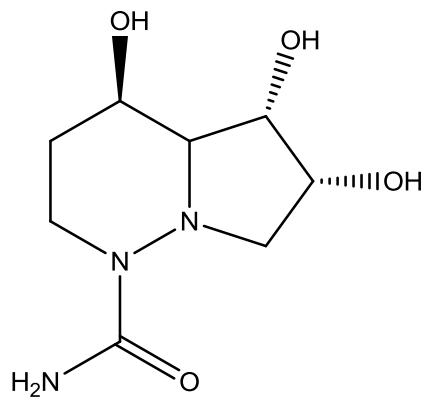
S15



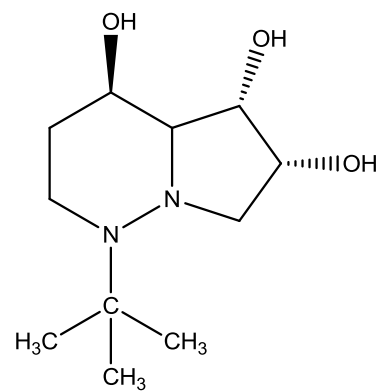
S20



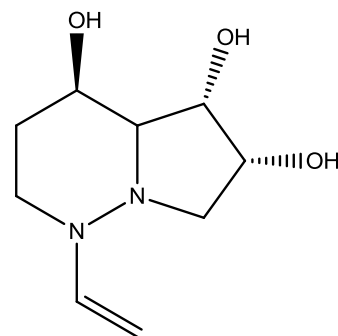
S0



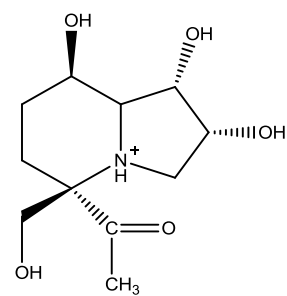
A1



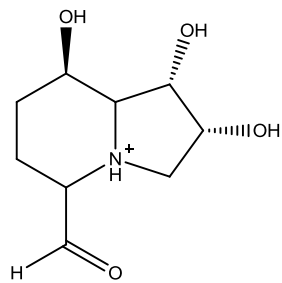
A33



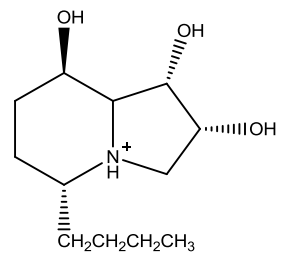
A45



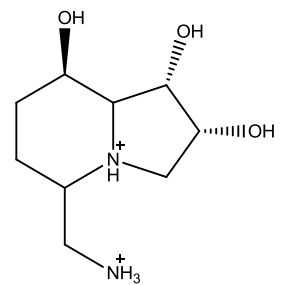
S32



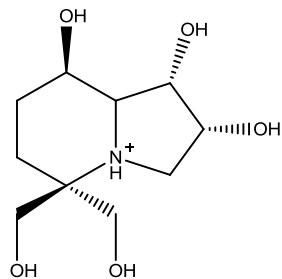
S21



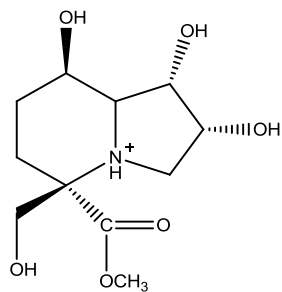
S16



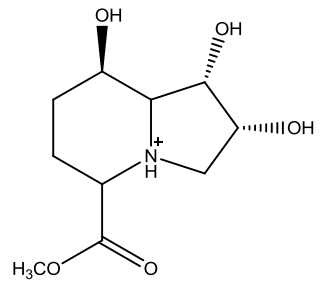
S25



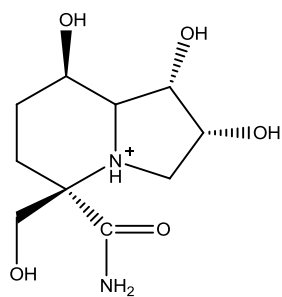
S35



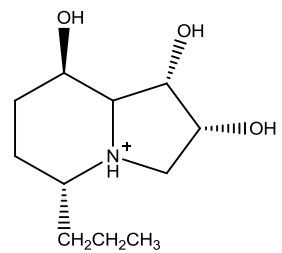
S27



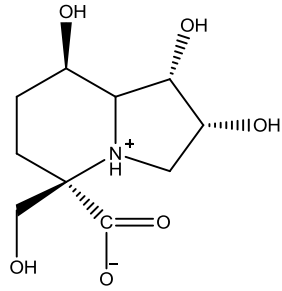
S19



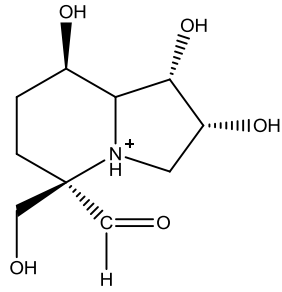
S30



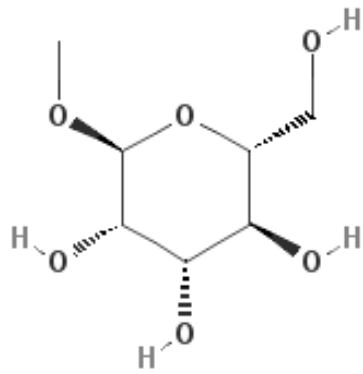
S13



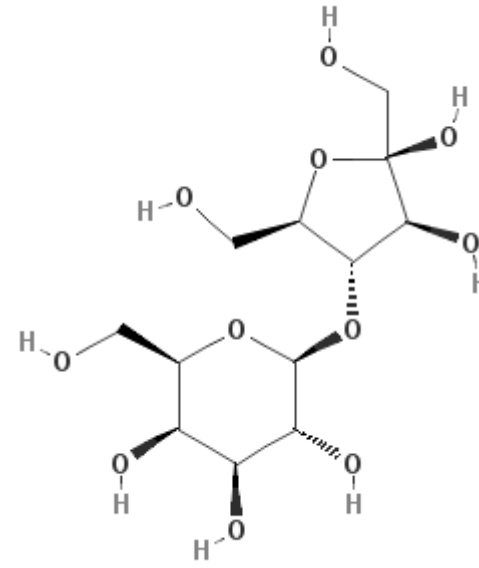
S29



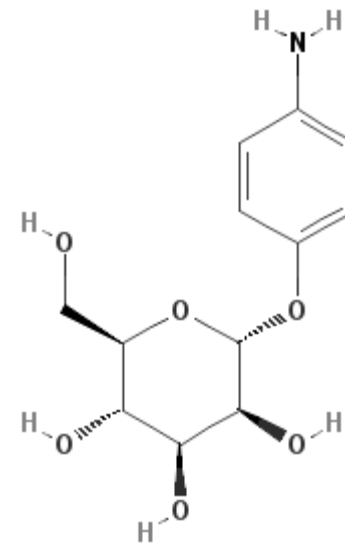
S31



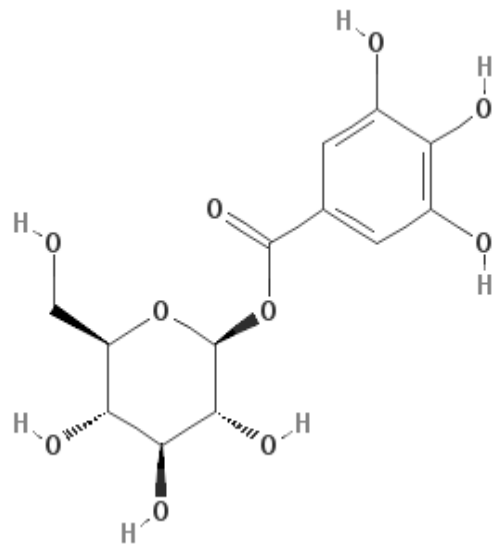
CID 101798



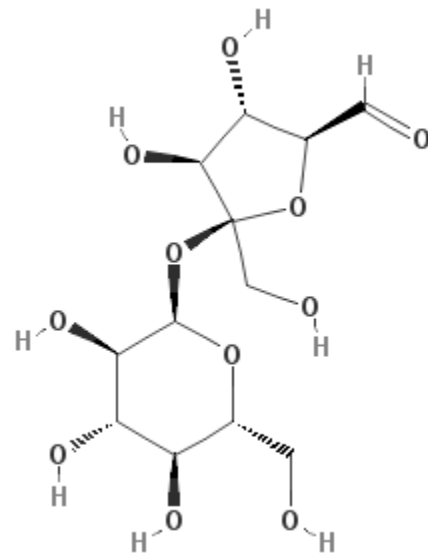
CID 11333



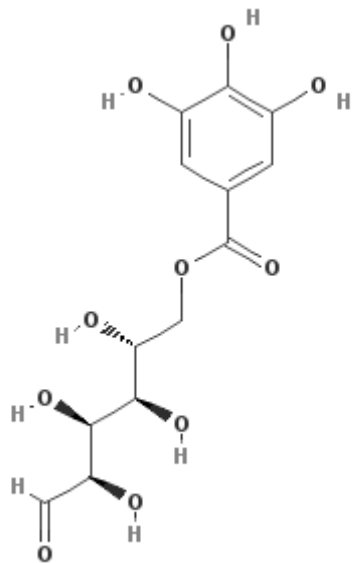
CID 122647



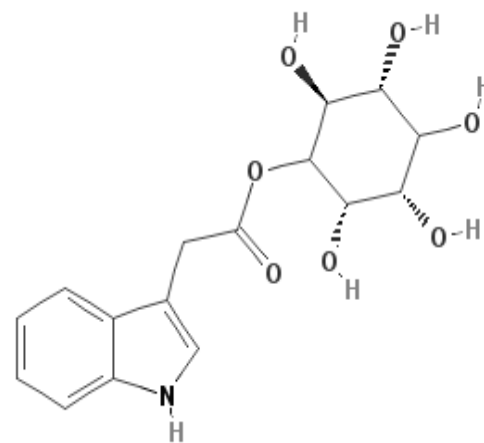
CID 124021



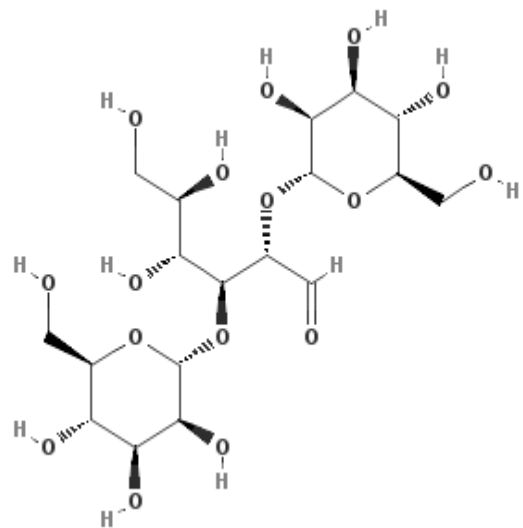
CID 16214802



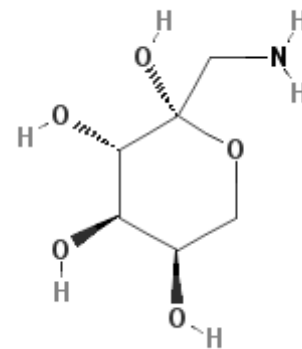
CID 128839



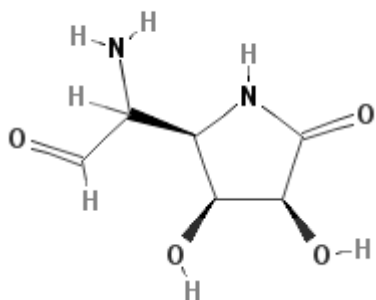
CID 18335849



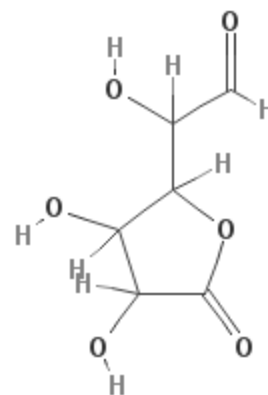
CID 189746



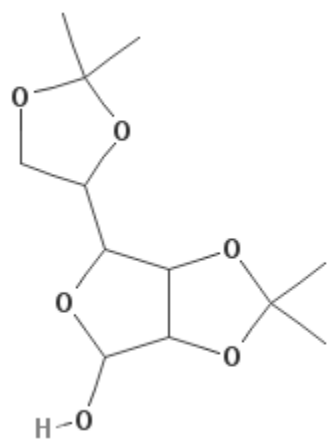
CID 20484



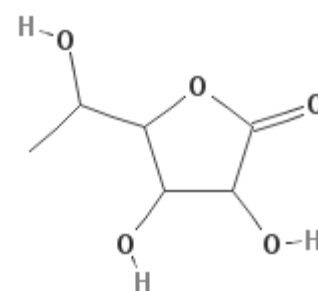
CID 192225



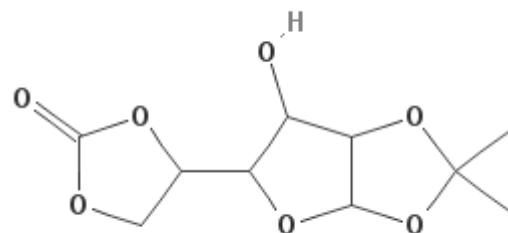
CID 219402



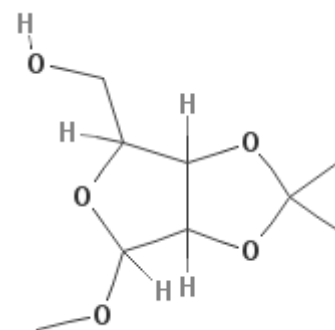
CID 230386



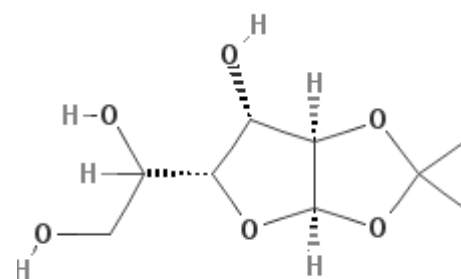
CID 242516



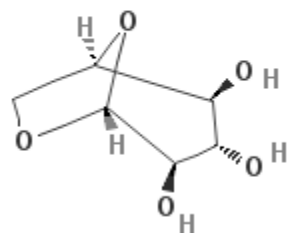
CID 235477



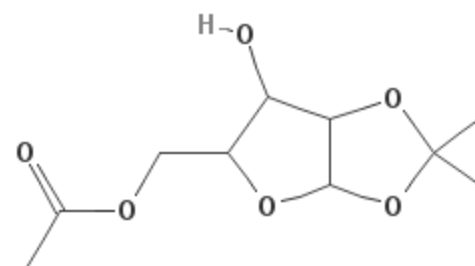
CID 257255



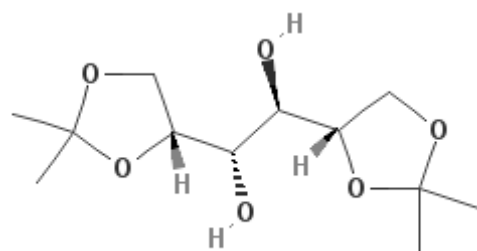
CID 2723655



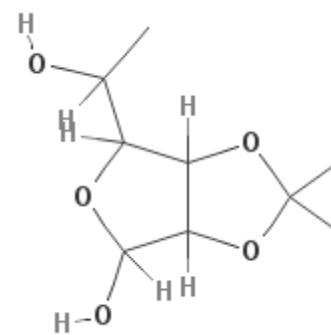
CID 2724705



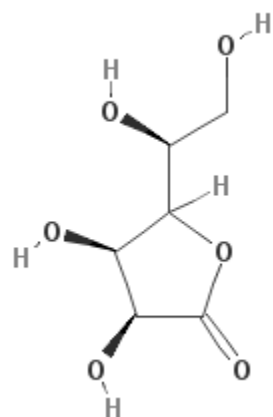
CID 332513



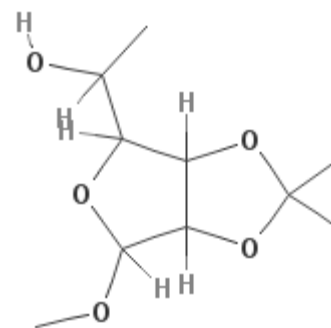
CID 2802069



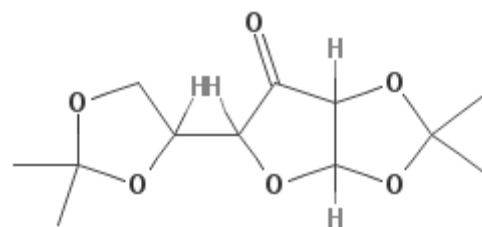
CID 355454



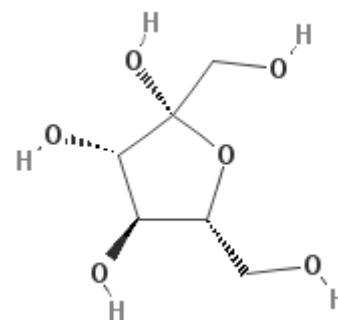
CID 2825893



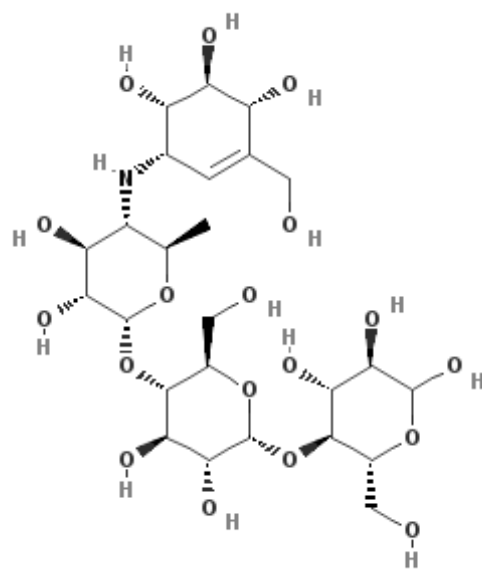
CID_355455



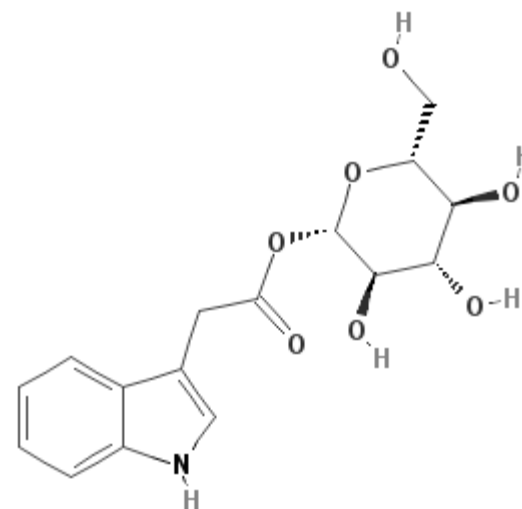
CID 360941



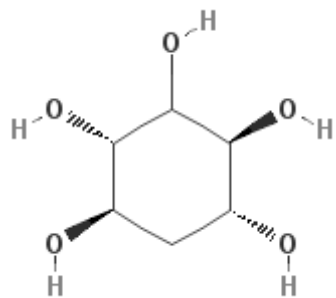
CID 439709



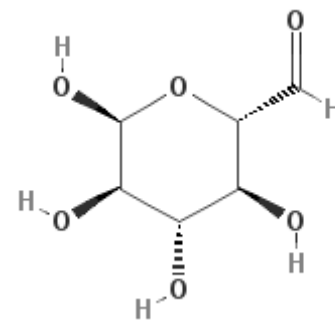
CID_41774



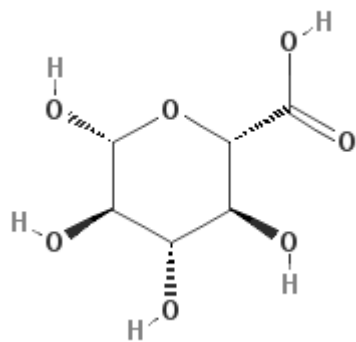
CID 440255



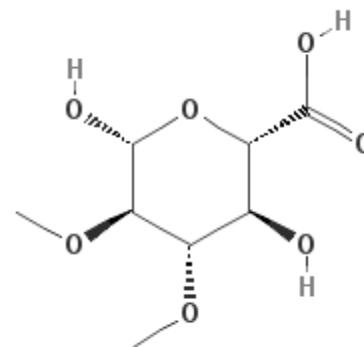
CID 441437



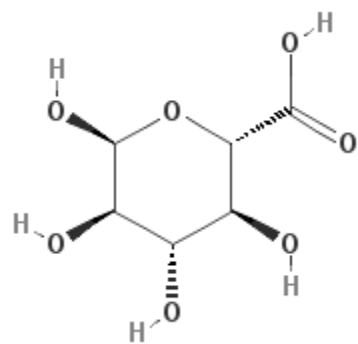
CID 447343



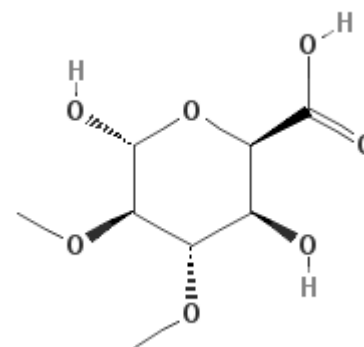
CID 441478



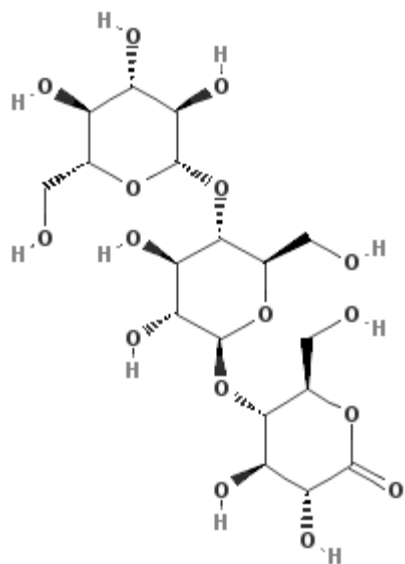
CID 448685



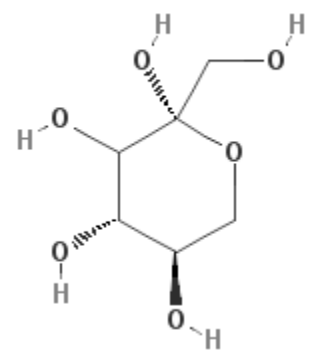
CID 444791



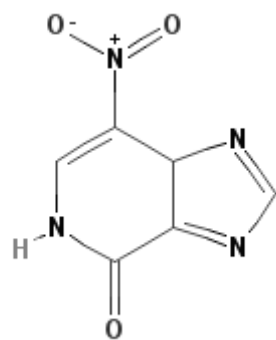
CID 448686



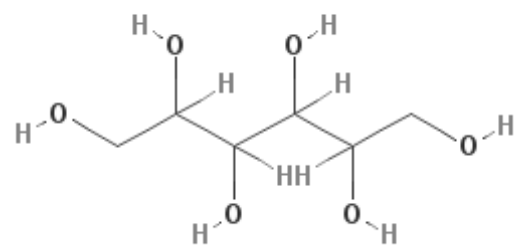
CID 449437



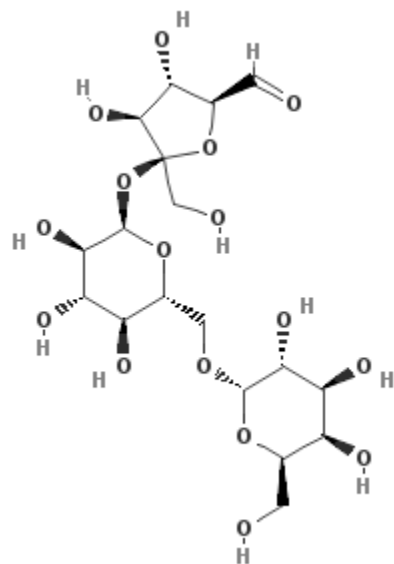
CID 45039313



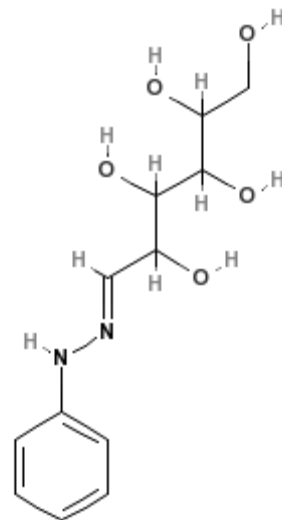
CID 45024209



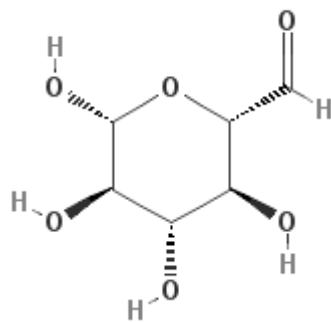
CID 453



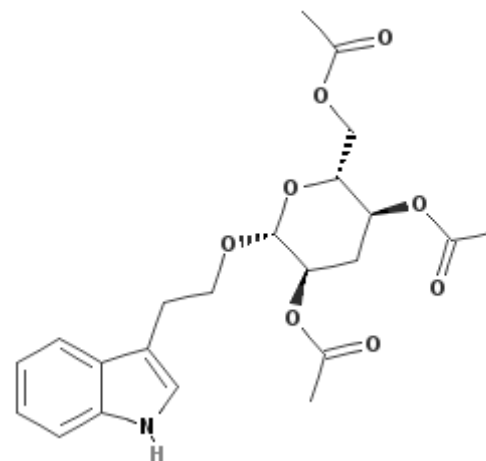
CID 5289421



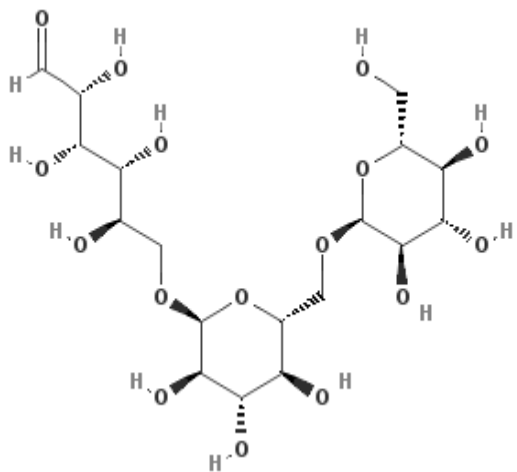
CID 5354802



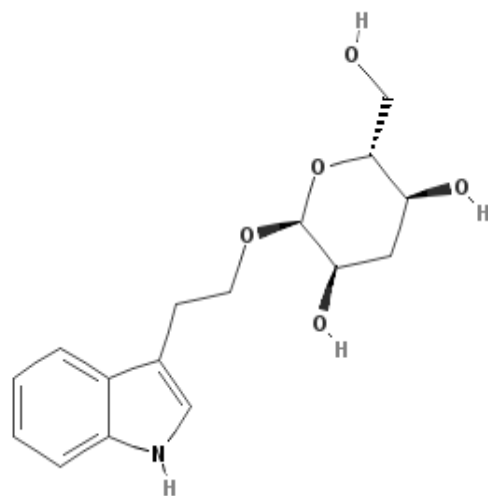
CID 5327089



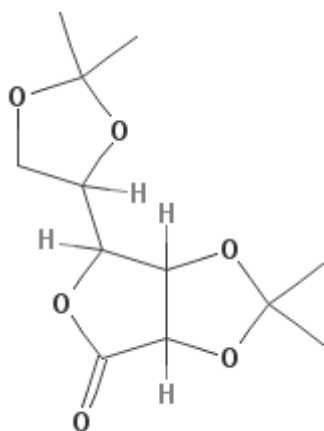
CID 54389373



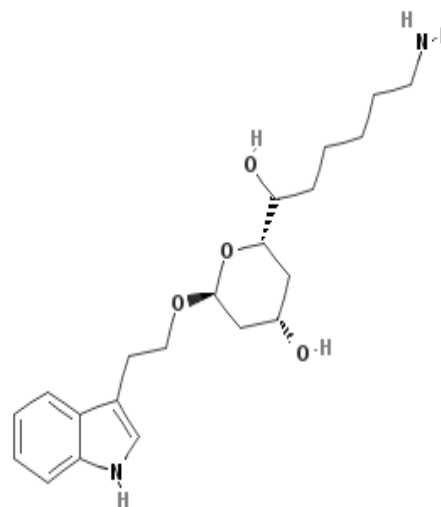
CID 5460037



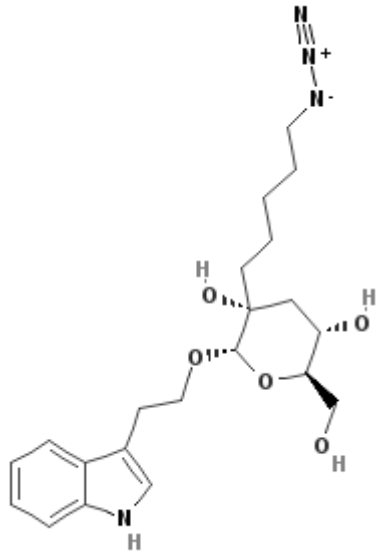
CID 57130768



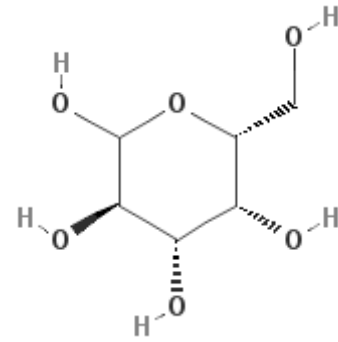
CID 568288



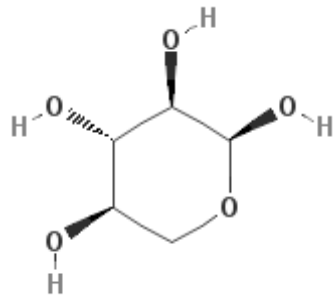
CID 57187251



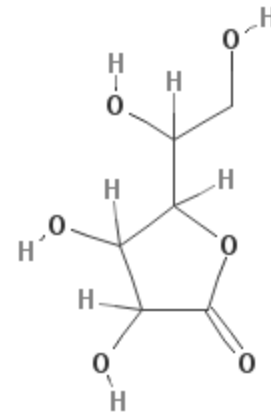
CID 57231970



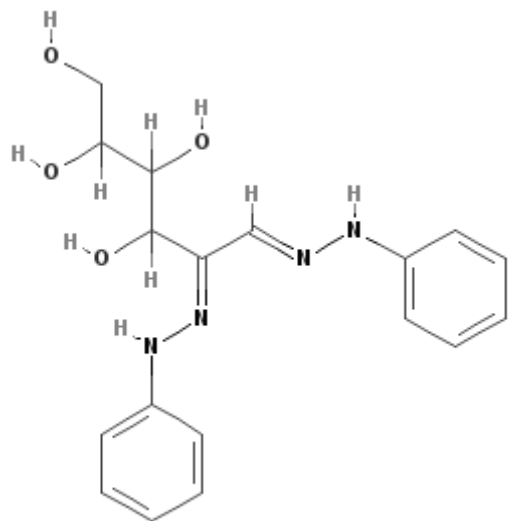
CID_6036



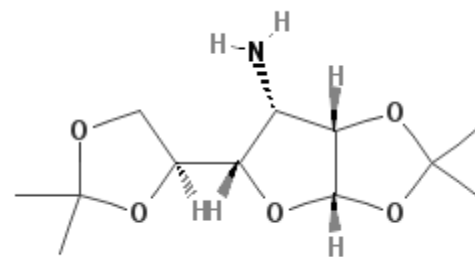
CID 6027



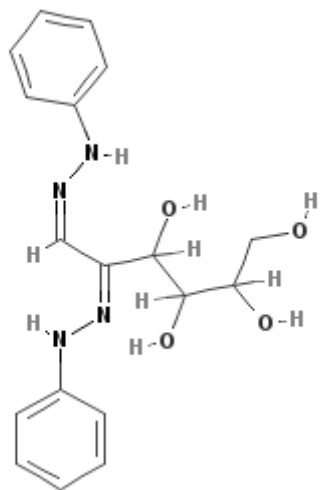
CID 608



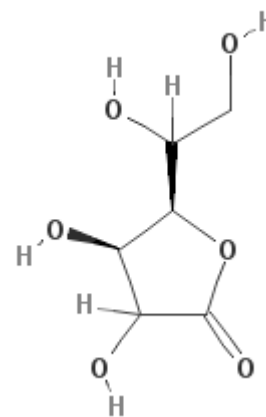
CID 6399441



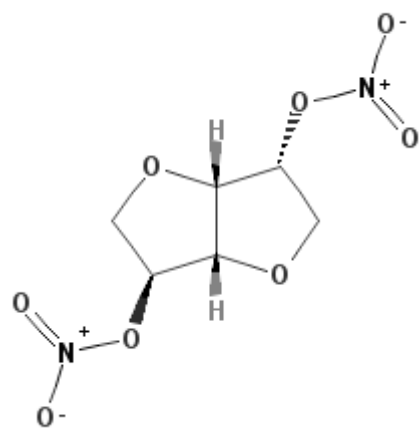
CID_6713648



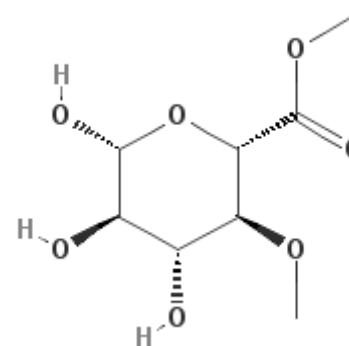
CID 6436933



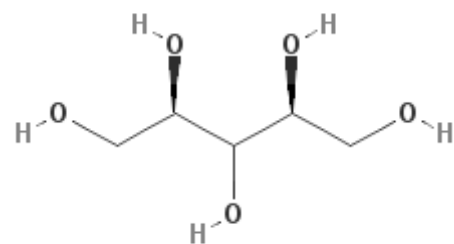
CID 6713932



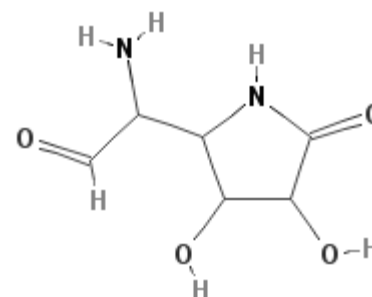
CID 6883



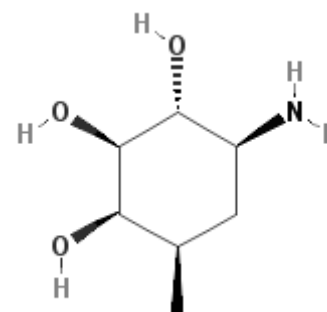
CID 70680055



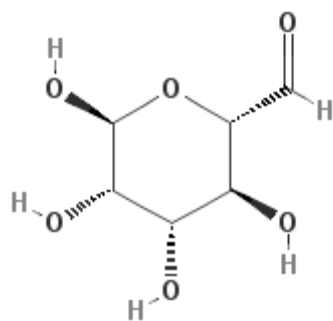
CID_6912



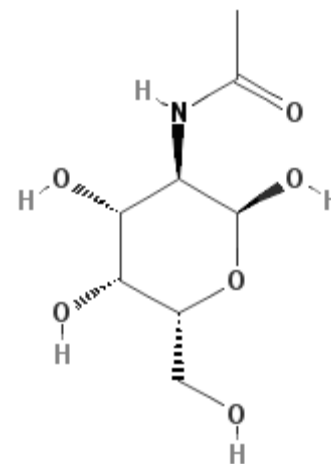
CID 71320117



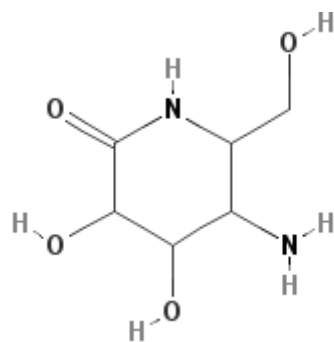
CID 71460008



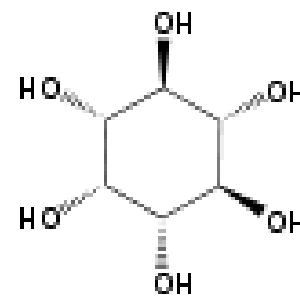
CID 71627395



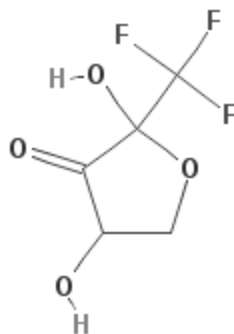
CID_84265



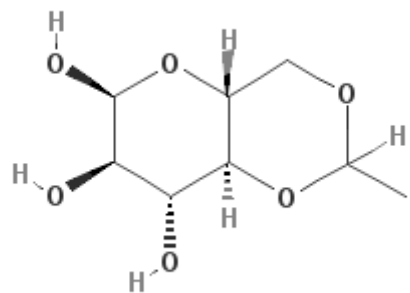
CID_73240330



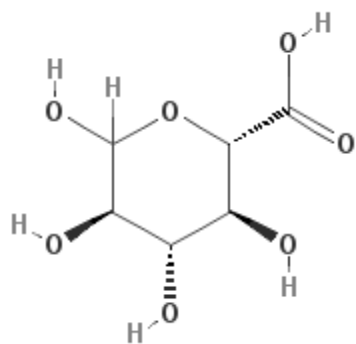
CID_892



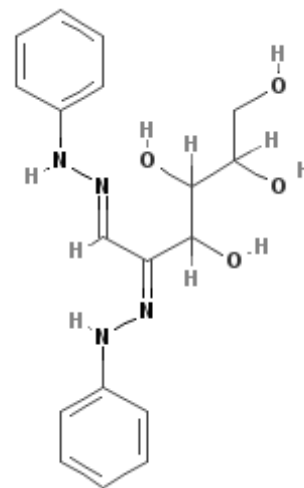
CID_73241354



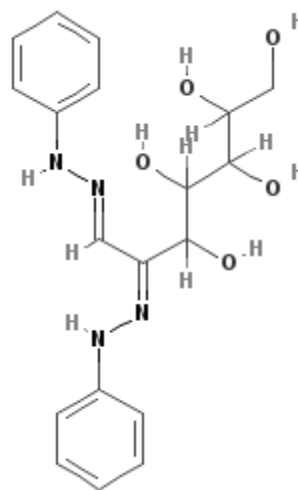
CID_93075



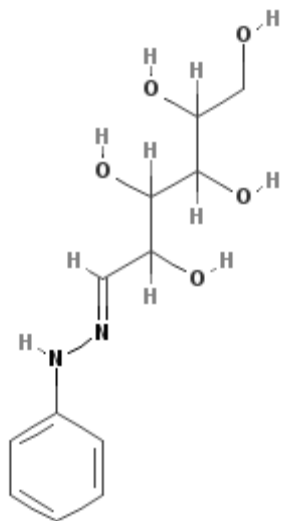
CID_94715



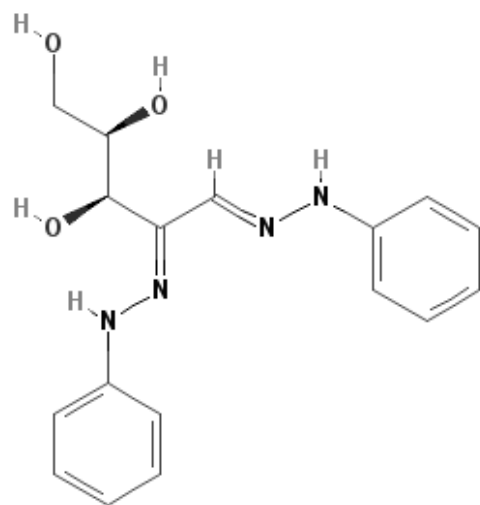
CID_9561016



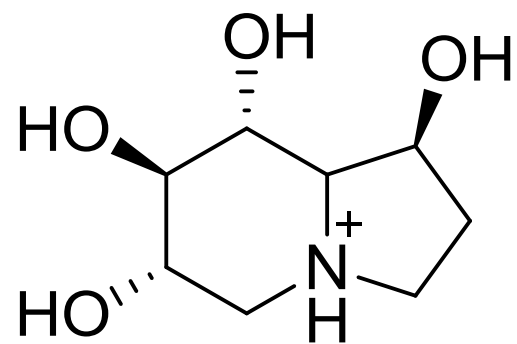
CID_9561018



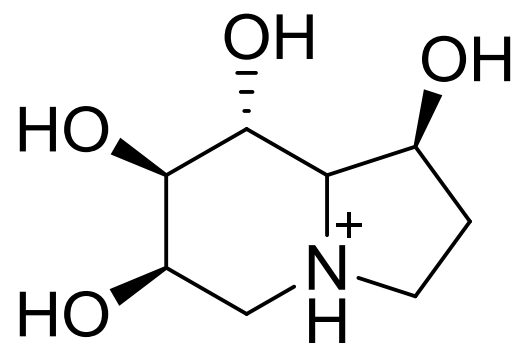
CID_9561107



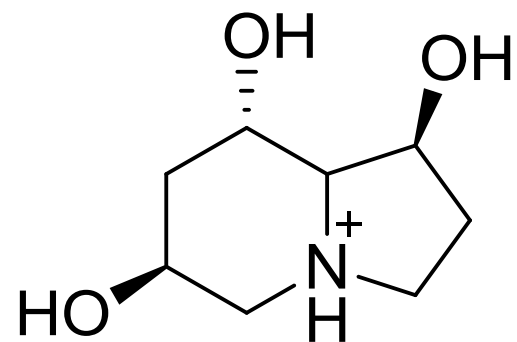
CID_9566349



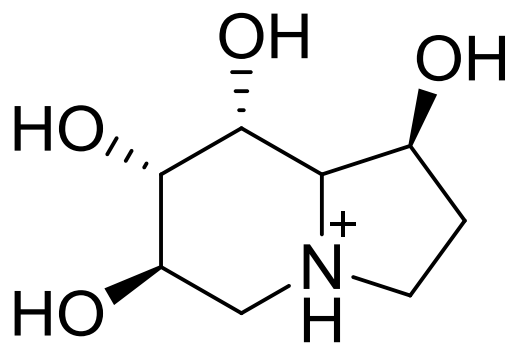
1I



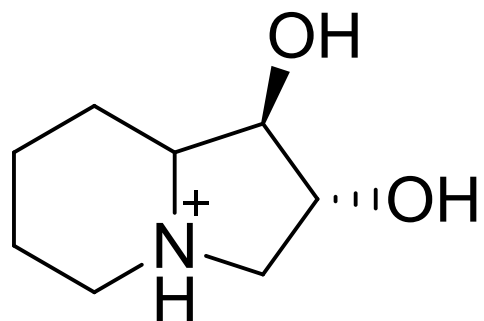
2I



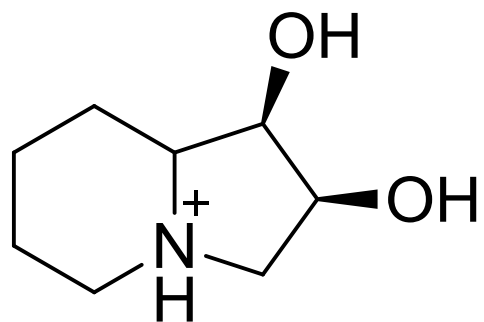
3I



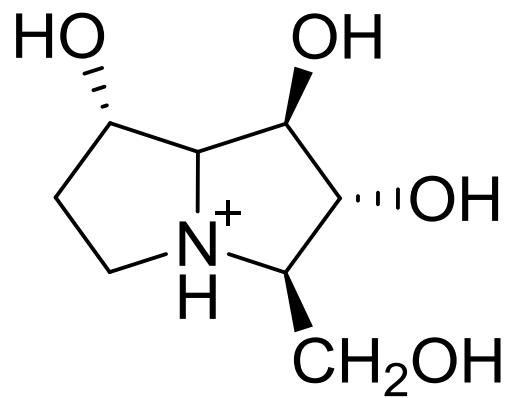
4I



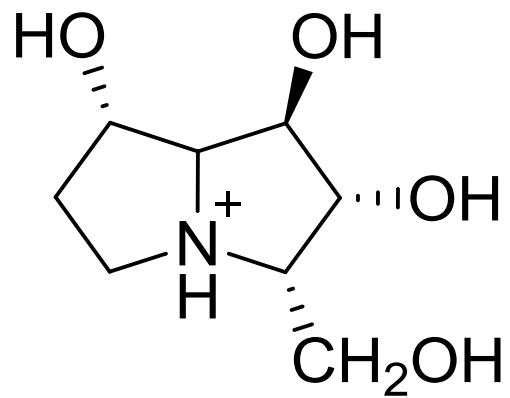
5I



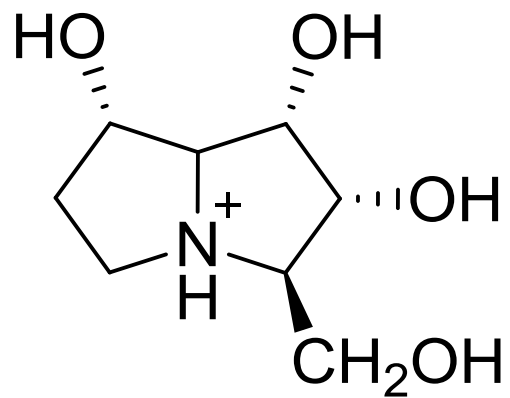
6I



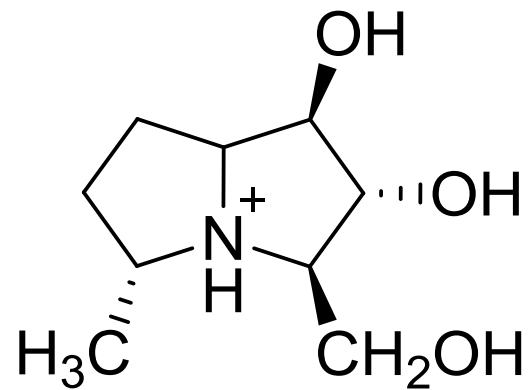
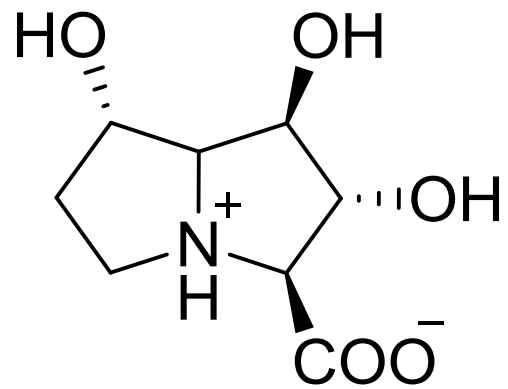
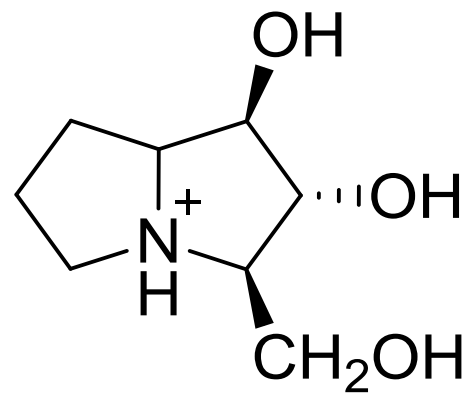
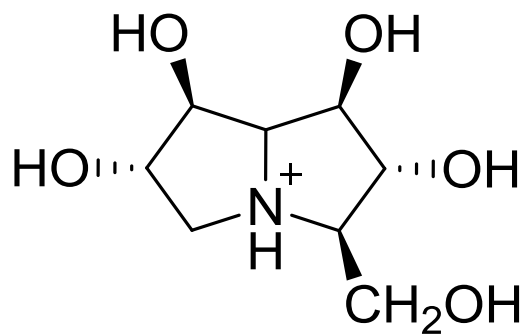
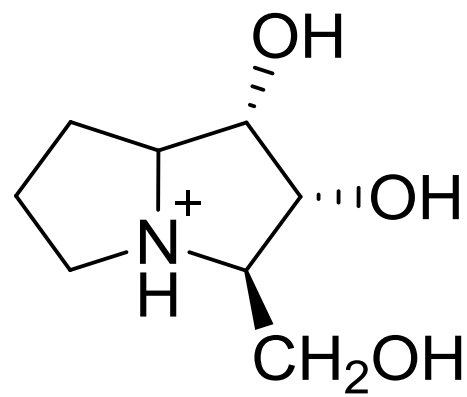
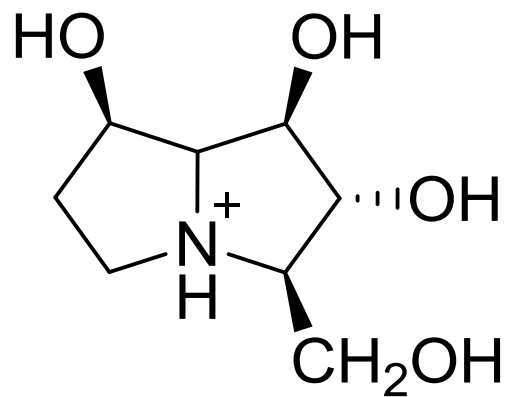
1A

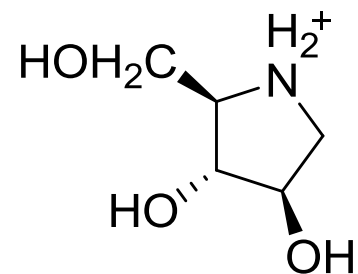
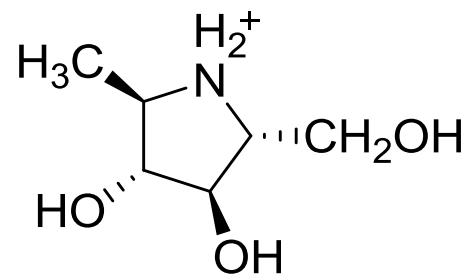
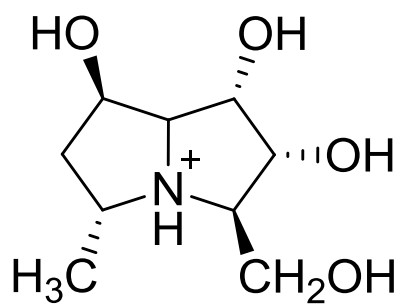
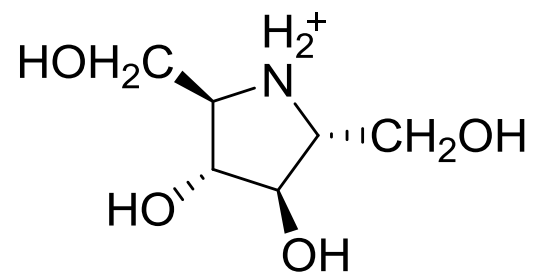
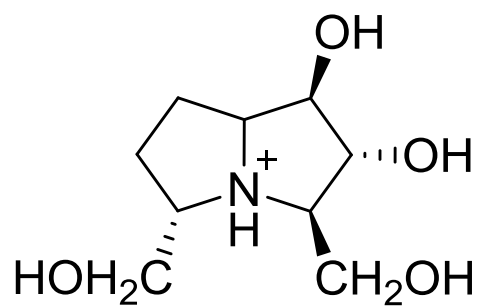
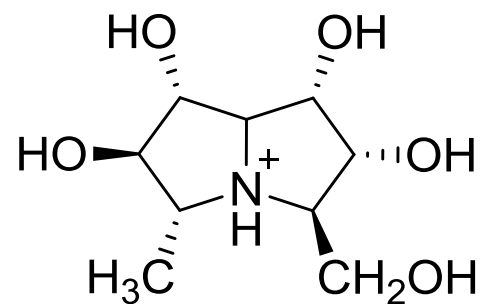
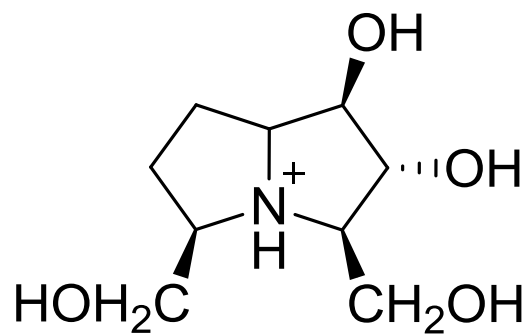


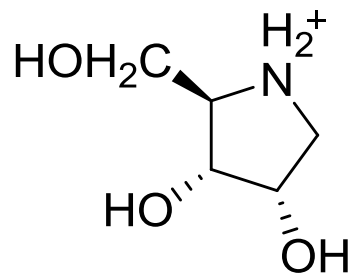
2A



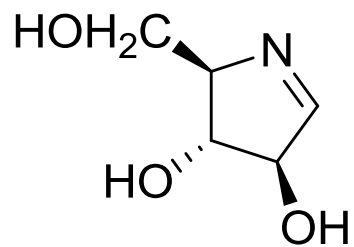
3A



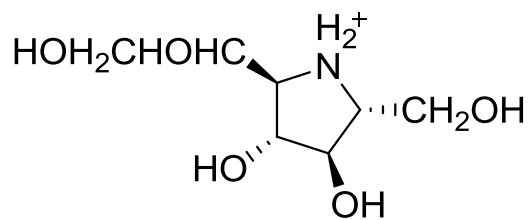




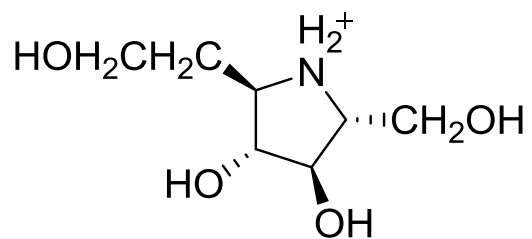
4P



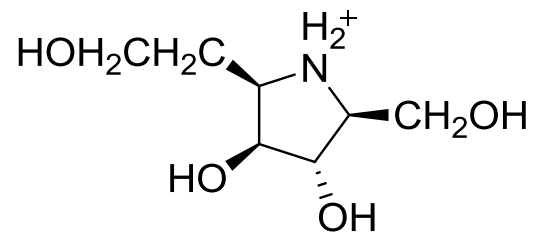
5P



6P



7P



8P