

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PREDIÇÃO *IN SILICO* DO EFEITO DE GRAMPOS OLEFÍNICOS EM  
PEPTÍDEOS COMO ESTRATÉGIA AO PLANEJAMENTO RACIONAL DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BIANCA VILLAVICENCIO

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PREDIÇÃO *IN SILICO* DO EFEITO DE GRAMPOS OLEFÍNICOS EM  
PEPTÍDEOS COMO ESTRATÉGIA AO PLANEJAMENTO RACIONAL DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**BIANCA VILLAVICENCIO**

HUGO VERLI – ORIENTADOR

RODRIGO LIGABUE BRAUN - CO-ORIENTADOR

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2016

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL, SITUADO NO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (CBIOT / UFRGS), SOB ORIENTAÇÃO DO DOUTOR HUGO VERLI E CO-ORIENTAÇÃO DO DOUTOR RODRIGO LIGABUE BRAUN. APOIO FINANCEIRO: COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ) E FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL (FAPERGS).

## BANCA EXAMINADORA

---

HUGO VERLI (CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – UFRGS) (PRESIDENTE)

---

RODRIGO LIGABUE BRAUN (CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – UFRGS)

---

DIEGO BONATTO (CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – UFRGS)

---

MARCIA C. B. BARBOSA (INSTITUTO DE FÍSICA – UFRGS)

---

EDUARDO M. CILLI (INSTITUTO DE QUÍMICA - UNESP)

---

EDUARDO C. F. CHIELA (FACULDADE DE MEDICINA - UFRGS) (SUPLENTE)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à minha família, pelo suporte durante toda a minha vida, em especial na minha educação. Ingrid, Aline, Fábio, Ricardo, e também Clever, Marco, Bruna, Monique, Talissa e Diogo, muito obrigada por tudo!

Ao meu orientador Hugo Verli, agradeço a oportunidade e os ensinamentos aprendidos no laboratório e na sala de aula, tanto no dia-a-dia quanto na rotina de trabalho.

Ao meu co-orientador Rodrigo Ligabue Braun, por todos os conselhos, conversas, dicas de sobrevivência e por toda a inspiração, meu mais sincero agradecimento.

Aos meus colegas de laboratório e agregados: Carla, Conrado, Elisa, Fábio, Juliano, Marcelo e Pablo, pela convivência, compartilhamentos, risadas e companhia no café e no RU.

Aos amigos Caroline, Gabriel e Yumi, pela compreensão e amizade durante todos esses anos, passando por dificuldades e alegrias.

Aos ex-colegas e amigos Ariel, Audrey, Bruno, César, Mariana e Rodrigo, pela amizade duradoura.

A todos não citados nominalmente, mas que tiveram influência na minha vida pessoal e profissional.

*“Wisdom comes from experience;  
Experience is often a result of lack of wisdom”*

Terry Pratchett

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1.    PROTEÍNAS E O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS.....	13
1.2.    PEPTÍDEOS GRAMPEADOS .....	18
1.3.    DINÂMICA MOLECULAR.....	23
1.4.    DINÂMICA MOLECULAR DE PEPTÍDEOS GRAMPEADOS.....	29
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1.    PROGRAMAS DE VISUALIZAÇÃO .....	32
3.2.    CONSTRUÇÃO DOS PEPTÍDEOS .....	32
3.3.    CONSTRUÇÃO DOS RESÍDUOS DO GRAMPO.....	33
3.4.    PARAMETRIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DO GRAMPO .....	35
3.5.    SIMULAÇÕES POR DM.....	36
3.6.    ANÁLISES .....	37
3.6.1.    COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL.....	37
3.6.2.    DICROISMO CIRCULAR TEÓRICO .....	40
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
4.1.    RESULTADOS ESPERADOS.....	42
4.2.    CONSTRUÇÃO DE TOPOLOGIAS .....	43
4.3.    COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL DE PEPTÍDEOS .....	43
4.4.    DICROISMO CIRCULAR TEÓRICO E EXPERIMENTAL .....	61
4.5.    METODOLOGIAS UNITED-ATOM E ALL-ATOM .....	64
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
5.1.    EFEITO DOS GRAMPOS NO COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL DOS PEPTÍDEOS .....	65
5.2.    DICROISMO CIRCULAR.....	67
5.3.    METODOLOGIAS UNITED-ATOM E ALL-ATOM .....	70
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>75</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>9. APÊNDICES .....</b>	<b>84</b>
9.1.    APÊNDICE I - RESÍDUOS ADICIONADOS AOS CAMPOS DE FORÇA.....	85
9.1.1.    RESÍDUOS PARA PEPTÍDEOS GRAMPEADOS –AMBER99SB-ILDN .....	85
9.1.2.    RESÍDUOS PARA PEPTÍDEOS GRAMPEADOS – CHARMM36 .....	88
9.1.3.    RESÍDUOS PARA GRAMPOS – GROMOS54A7 .....	91
9.2.    APÊNDICE II – PARÂMETROS ADICIONADOS DIRETAMENTE À TOPOLOGIA.....	95
9.2.1.    PARÂMETROS ADICIONADOS NOS CAMPOS DE FORÇA <i>ALL-ATOM</i> .....	95

9.2.2.	PARÂMETROS ADICIONADOS NO GROMOS54A7 .....	104
<b>10.</b>	<b>CURRICULUM VITÆ .....</b>	<b>110</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ABCA 1	<i>ATP-Binding Cassette Transporter, Member 1</i>
AMP	<i>Antimicrobial Peptides</i>
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BH3	<i>Bcl-2 Homology Domain 3</i>
CA	Proteína do capsídeo de HIV-1
CADD	<i>Computer-Aided Drug Design</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i> , dicroísmo circular
CPD	Peptídeos partindo de uma conformação desenovelada
CPH	Peptídeos partindo de uma conformação de hélice- $\alpha$
DM	Dinâmica Molecular
DSSP	<i>Define Secondary Structure of Proteins</i>
eIF4E	Fator de iniciação de tradução eucariótico 4E
Fmoc	Fluorenil-metil-oxicarbonil
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , Vírus da Imunodeficiência Humana
Mcm6	<i>Mini-Chromosome Maintenance Complex</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute Homolog 2</i> , também HDM2
MDM4	<i>Murine Double Minute Homolog 4</i> , também MDMX ou HDM4
MM	<i>Molecular Mechanics</i> , mecânica molecular
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundo
PDB	Protein Data Bank
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol
PPI	<i>Protein-Protein Interaction</i> , interação proteína-proteína
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> , desvio quadrático médio
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i> , flutuação quadrática média
QM	<i>Quantum Mechanics</i> , mecânica quântica
SMR	<i>Small Multidrug Resistance Proteins</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Hélice- $\alpha$ .....	16
Figura 2 – Diferentes tipo de estabilizadores conformacionais de hélices-alfa, incluindo pontes dissulfeto, pontes lactâmicas e grampos olefínicos.....	18
Figura 3 – Grampos em peptídeos.....	19
Figura 4 – Esquema do processo de síntese de peptídeos grampeados.....	20
Figura 5 - Representação de alguns termos que compõem o campo de força GROMOS96.....	25
Figura 6 - Resolução espaço-temporal de técnicas biofísicas.....	27
Figura 7 – Estruturas iniciais de RNase A utilizadas para as simulações.....	33
Figura 8 – Configurações dos peptídeos grampeados.....	34
Figura 9 – Resíduos dos grampos.....	35
Figura 10 – Grampos utilizados no presente trabalho e os respectivos peptídeos referenciados.....	35
Figura 11 – Perfis de dicroísmo circular de algumas estruturas secundárias.....	41
Figura 12 – RMSD do esqueleto peptídico de peptídeos não-grampeados <i>CPH</i> (à esquerda) e <i>CPD</i> (à direita).....	45
Figura 13 - RMSD do esqueleto peptídico de peptídeos R3S5 <i>CPH</i> (à esquerda) e <i>CPD</i> (à direita).....	45
Figura 14 - RMSD do esqueleto peptídico de peptídeos R5S3 <i>CPH</i> (à esquerda) e <i>CPD</i> (à direita).....	46
Figura 15 - RMSD do esqueleto peptídico de peptídeos R5S5 <i>CPH</i> (à esquerda) e <i>CPD</i> (à direita).....	46
Figura 16 – RMSF de peptídeos <i>CPH</i> e <i>CPD</i> não-grampeados e grampeados para os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7, a partir dos 100ns de simulação.....	48
Figura 17 – Conteúdo de hélice de peptídeos <i>CPH</i> não-grampeados e grampeados para os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7, a partir dos 100ns de simulação.....	50
Figura 18 – Análise de DSSP exclusiva para hélice- $\alpha$ nos peptídeos não-grampeados <i>CPH</i> e <i>CPD</i> com os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7.....	55
Figura 19 - Análise de DSSP exclusiva para hélice- $\alpha$ nos peptídeos R3S5 <i>CPH</i> e <i>CPD</i> com os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7.....	57
Figura 20 - Análise de DSSP exclusiva para hélice- $\alpha$ nos peptídeos R5S3 <i>CPH</i> e <i>CPD</i> com os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7.....	58
Figura 21 - Análise de DSSP exclusiva para hélice- $\alpha$ nos peptídeos R5S5 <i>CPH</i> e <i>CPD</i> com os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7.....	60

Figura 22 – Dicroísmo circular teórico nos campo de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7 para os peptídeos não-grameados (A) <i>CPH</i> e (B) <i>CPD</i> .....	62
Figura 23 – Dicroísmo circular teórico nos campo de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7 para os peptídeos R3S5 (A) <i>CPH</i> e (B) <i>CPD</i> .....	63
Figura 24 – Dicroísmo circular teórico nos campo de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7 para os peptídeos R5S3 (A) <i>CPH</i> e (B) <i>CPD</i> .....	63
Figura 25 – Dicroísmo circular teórico nos campo de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7 para os peptídeos R5S5 (A) <i>CPH</i> e (B) <i>CPD</i> .....	64

---

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens associadas à aplicação de peptídeos como fármacos.....	15
Tabela 2 – Simulações computacionais com peptídeos grameados.....	29
Tabela 3 – Tabela de informações utilizadas para cada campo de força.....	36
Tabela 4 - DSSP médio de todas as estruturas para cada campo de força, com os peptídeos <i>CPH</i> .....	52
Tabela 5 – DSSP médio para todas as estruturas para cada campo de força, com os peptídeos <i>CPD</i> .....	53

## RESUMO

O estudo de peptídeos grampeados, que estabilizam voltas de hélices- $\alpha$  com a ligação de uma cadeia química, desenvolveu-se na última década, uma vez que a adição de um elemento não peptídico (grampo) mostrou aumentar o conteúdo de hélice e a estabilidade conformacional destas moléculas. A consequente manutenção de um arcabouço estrutural definido possibilita, em princípio, simular regiões específicas da superfície de proteínas e, assim, modular terapêuticamente potenciais vias de sinalização associadas. Neste sentido, a capacidade de antecipar a eficácia de grampos sobre peptídeos específicos através de simulações computacionais pode contribuir na aceleração e na redução de custos no processo de planejamento racional de novos fármacos. O presente trabalho buscou avaliar a capacidade de simulações por dinâmica molecular em reproduzir o efeito conformacional de grampos olefínicos em um peptídeo derivado da RNase A. Foram utilizados três diferentes campos de força: AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7, e os resultados foram comparados a dados de dicroísmo circular obtidos experimentalmente, além de análises de RMSD, RMSF, estrutura secundária e conteúdo de hélice. Os parâmetros utilizados com o campo de força átomo unido GROMOS54a7 foram os que mais se aproximaram dos dados experimentais, embora não tendo sucesso na descrição de dois dos três grampos nos parâmetros simulados, mas tendo um desempenho melhor do que campos de força que descrevem todos os átomos do sistema. Tais resultados indicam que, com melhorias na parametrização, a dinâmica molecular pode ser utilizada para antecipar efeitos conformacionais de grampos olefínicos em peptídeos.

## ***ABSTRACT***

The study of stapled peptides, which stabilize turns of an alpha-helix through the addition of a linker, has developed in the last decade since it was shown that the addition of the staple enhanced helical content and conformational stability of peptides. The maintenance of a structural scaffold allows the simulation of specific regions of protein surfaces, and thus allows the therapeutical modulation of signaling pathways of interest. The ability to anticipate the efficacy of the addition of a staple in a peptide through computational simulations may contribute to enhance the speed and lower the costs associated with rational drug design. This work evaluated the capability of molecular dynamics simulations to reproduce the effect of all-hydrocarbon staples in an RNase A-derived peptide. We used three different force fields: AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 and GROMOS54a7, and the results were compared to experimentally obtained circular dichroism data. The parameters used with the GROMOS54a7 united-atom force field revealed themselves to be more closely related to experimental data, even though it does not reproduce the effect of the addition of a staple in two of three stapled peptides, but it also shows an enhanced performance when compared to all-atom force fields. These results indicate that, with further enhancement of parametrization, molecular dynamics simulations may be used to anticipate conformational effects of all-hydrocarbon staples in peptides.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. PROTEÍNAS E O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

Proteínas são efetoras de diversos processos celulares, sendo responsáveis por rotas metabólicas e pela facilitação de reações indispensáveis para a vida. Por atuarem tão essencialmente em processos celulares, proteínas são alvos potenciais para o planejamento racional de fármacos. Em especial, interações proteína-proteína (PPIs) são consideradas alvos pertinentes, porém de difícil abordagem devido a limitações das principais classes de fármacos atuais (FULLER *et al.*, 2009; HENCHEY *et al.*, 2009; MANDAL *et al.*, 2009). Além disso, os custos financeiros e temporais associados à descoberta de novos fármacos são muitas vezes proibitivos, envolvendo o investimento de milhões a bilhões de dólares e mais de uma década de estudos (AVORN, 2015). De forma a auxiliar na diminuição desses custos, o desenho de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês *Computer-Aided Drug Design*) tornou-se uma ferramenta relevante na indústria farmacêutica, utilizando, entre outras, técnicas de mecânica molecular (LILL & DANIELSON, 2011; XIANG *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de fármacos pode se beneficiar enormemente de métodos computacionais, especialmente nas primeiras fases do processo, onde ocorre a seleção e otimização de candidatos a fármacos (ALONSO *et al.*, 2006). O CADD é vantajoso porque possibilita a análise de um grande volume de dados, além da redução significativa dos custos com experimentos (CHEN, 2013; XIANG *et al.*, 2012). Um dos métodos mais comumente utilizados é o atracamento molecular, buscando prever o modo de ligação e os detalhes do reconhecimento molecular, principalmente de pequenos ligantes a macromoléculas, ou entre proteínas. No entanto, essa metodologia está associada a algumas limitações, como a adequação da base de dados, do escore, a definição do sítio de ligação, e a base no modelo chave-e-fechadura, no qual um receptor rígido e imóvel acomodaria uma pequena molécula sem nenhum rearranjo conformacional (CHEN, 2013). Atualmente, essa abordagem

deu lugar a modelos mais precisos, que levam em consideração mudanças conformacionais de receptores e ligantes e movimentos aleatórios dos átomos que os compõem (DURRANT & MCCAMMON, 2011). A combinação do uso da metodologia de atracamento com a de dinâmica molecular (DM), que calcula o movimento dos átomos no sistema de acordo com as leis de Newton, auxilia a incorporar a flexibilidade biológica no sistema e a contornar algumas das limitações do atracamento (ALONSO *et al.*, 2006; CHEN, 2013; XIANG *et al.*, 2012), embora introduza um grande aumento no custo computacional associado.

Atualmente, há duas classes majoritárias de fármacos em geral: pequenos ligantes e proteínas terapêuticas. Cada classe tem suas vantagens e desvantagens: pequenos ligantes possuem vantagens como a biodisponibilidade oral, e um tamanho reduzido que facilita a travessia de membranas, mas são limitados pela pequena área de contato com o receptor-alvo, e, em sua maioria, se limitam a receptores-alvo que possuam um bolsão hidrofóbico (estima-se que estas representem apenas 10% das proteínas humanas) (URSU *et al.*, 2011), dificilmente modulando interações proteína-proteína; já proteínas terapêuticas (ou biofármacos) podem utilizar a interação proteína-proteína própria com o receptor-alvo, podendo ter maior complementaridade a este, o que pode se traduzir em maior afinidade e especificidade. Além disso, a ampla área de contato com o receptor-alvo permite interações que podem inclusive romper interações proteína-proteína. No entanto, seu grande tamanho limita a travessia de membranas celulares, limitando-as ao meio extracelular (estima-se que por volta de 10% das proteínas humanas sejam acessíveis a proteínas terapêuticas, devido à localização na membrana ou na corrente sanguínea), além de apresentarem baixa biodisponibilidade oral, tenderem a gerar reações de hipersensibilidade e a terem limitações na produção em larga escala. Portanto, apenas cerca de 20% das proteínas humanas são atingíveis por biofármacos ou por pequenos ligantes, com uma parte significativa do restante dos potenciais alvos sendo considerados proteínas não-moduláveis terapeuticamente (do inglês *undruggable*, tradução livre) por tais moléculas (VERDINE & HILINSKI, 2012).

Um meio-termo entre pequenas moléculas e proteínas terapêuticas que poderia atingir proteínas não-moduláveis terapeuticamente são peptídeos ou mini-proteínas (VERDINE & HILINSKI, 2012), que podem ser classificadas como polipeptídeos de massa molecular de até 10 kDa (NIČ *et al.*, 2009), ou com 10 a 200 aminoácidos (YANG *et al.*, 2011). Possuindo um tamanho intermediário a ambas as classes anteriormente citadas, pequenos peptídeos podem ser derivados de biofármacos e portanto unir uma razoável de superfície de contato com o receptor-alvo quando comparados a pequenos ligantes, garantindo assim a seletividade e especificidade necessárias na tentativa de obter um fármaco seguro, e ainda assim um tamanho reduzido quando comparados a proteínas terapêuticas, que os permite atravessar membranas (FOSGERAU & HOFFMANN, 2015; HOWL & JONES, 2015). Além disso, pequenos peptídeos com conformação de hélice são geralmente mais resistentes a proteases, tendo uma melhor farmacocinética (ZHANG *et al.*, 2014), além de segurança, tolerância e eficácia em humanos e menores custos associados à sua produção do que proteínas (FOSGERAU & HOFFMANN, 2015). Outras vantagens não diretamente abordadas nesta dissertação são citadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens associadas à aplicação de peptídeos como fármacos. Referências indicam trabalhos com peptídeos grampeados que mostram melhorias às desvantagens correspondentes. Adaptado de Fosgerau & Hoffmann, 2014.

Vantagens	Desvantagens	Referências
Eficácia, segurança e tolerância	Instabilidade química e física	KIM <i>et al.</i> , 2010
Alta seletividade e especificidade	Suscetíveis à hidrólise e oxidação	KIM <i>et al.</i> , 2010
Metabolismo previsível	Tendência a agregação	SIM & VERMA, 2015
Maior rapidez para lançar ao mercado	Meia-vida curta e fácil eliminação	KIM <i>et al.</i> , 2011
Menor taxa de atrito	Geralmente não disponíveis oralmente	BIRD <i>et al.</i> , 2010
Protocolo padrão de síntese	Baixa permeabilidade em membranas	KIM <i>et al.</i> , 2010



De forma a compreender peptídeos e proteínas, é necessário considerar o enovelamento proteico, que se dá por interações físico-químicas que direcionam a formação de estrutura secundária. Descritas originalmente por Pauling e colaboradores (1951) como estruturas estáveis e favoráveis, hélices- $\alpha$  são muito comuns e podem ser determinantes na estabilidade da organização de proteínas (RICHARDSON, 1981). Essas estruturas são mantidas por ligações de hidrogênio entre resíduos de aminoácidos a uma volta de distância (Figura 1), e quando inseridas em uma proteína, também pelo arcabouço proteico geral. Devido a sua frequência e ao seu papel na interação com proteínas, hélices- $\alpha$  possuem um papel relevante nas PPIs, sendo, portanto, estruturas relevantes para o CADD (HENCHEY *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2014).

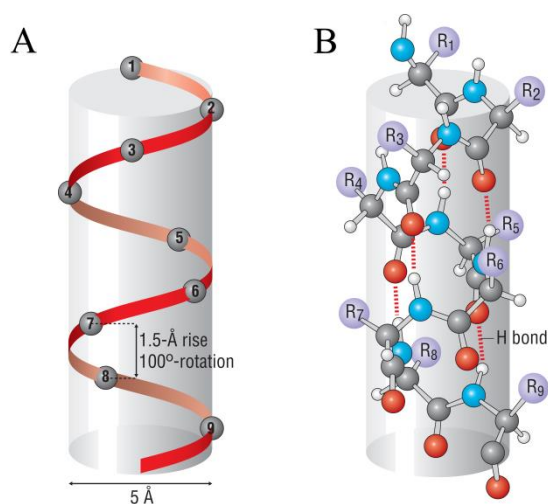


Figura 1 – Hélice- $\alpha$ . (A) Estrutura simplificada de uma hélice- $\alpha$ , mostrando apenas seus carbonos- $\alpha$ . (B) Estrutura atômica de uma hélice- $\alpha$ , mostrando as ligações de hidrogênio que mantêm sua conformação (linhas tracejadas em vermelho). Adaptado de Petsko & Ringe, 2003.

O desenvolvimento de novos fármacos baseados em peptídeos tem sido uma alternativa atraente para tentar atingir alvos não-moduláveis terapêuticamente nas últimas décadas, especialmente com esforços para o tratamento de câncer e de doenças metabólicas, mas esbarra em algumas

limitações. Estruturas secundárias, quando retiradas do seu arcabouço proteico, ficam expostas a alterações de enovelamento, pois as ligações de hidrogênio intra-moleculares que estabilizam sua conformação podem se romper em detrimento de interações com o solvente. Essa instabilidade conformacional pode fazer com que o peptídeo perca a sua forma farmacologicamente relevante quando em solução, formando um conjunto de conformações aleatórias (HOWL & JONES, 2015; ZHANG *et al.*, 2014). Isso faz com que os peptídeos sejam suscetíveis à hidrólise por exposição do esqueleto peptídico ao solvente, tenham baixa capacidade de cruzar membranas, além de outras desvantagens apontadas na Tabela 1. Nesse sentido, peptídeos frequentemente não são viáveis como fármacos penetráveis na célula, pois perdem sua estrutura relevante associada à conformação bioativa com facilidade (ZHANG *et al.*, 2014).

Métodos para garantir a estabilidade de peptídeos vem sendo desenvolvidos para tentar aproveitar seu potencial farmacológico (KRITZER, 2010). Métodos para estabilização ou mimetização de hélices- $\alpha$  podem ser divididos em três categorias: estabilização de hélice, que pré-organiza resíduos de aminoácidos e inicia a formação de hélice; foldâmeros de hélice, que são compostos por análogos de aminoácidos e são capazes de adotar conformações similares àquelas encontradas em proteínas na natureza; e miméticos de superfície de hélice, que usam arcabouços restritos com grupos funcionais ligados que se parecem com o padrão de posição de  $i$ ,  $i+4$  ou  $i+7$  na hélice- $\alpha$ , unindo uma e duas voltas, respectivamente (HENCHEY *et al.*, 2009). Outras estratégias incluem otimização de sequência, incorporação de moléculas não naturais, PEGilação e conjugação com outras biomoléculas, e, especialmente para hélices- $\alpha$ , pontes salinas, quelação por metal, e modificações químicas (ZHANG *et al.*, 2014), como pontes dissulfeto e lactâmicas (Figura 2). Estas aumentam dramaticamente o conteúdo de hélice de um peptídeo, mas tais métodos nem sempre permanecem estáveis na célula, sendo suscetíveis à degradação (GARNER & HARDING, 2007; ZHANG *et al.*, 2014). Em outro âmbito, peptídeos com a habilidade de penetrar células (CPPs, do inglês *Cell-Penetrating Peptides*) que ocorrem naturalmente tendem

a ser policatiônicos, o que indica que cargas positivas auxiliam nessa habilidade, embora CPPs policatiônicos em altas concentrações estejam associados à toxicidade celular (HOWL & JONES, 2015). Um método que tem sido muito estudado consiste na adição de um grampo químico ligando uma ou mais voltas de hélice, referenciados a partir daqui como peptídeos grampeados.

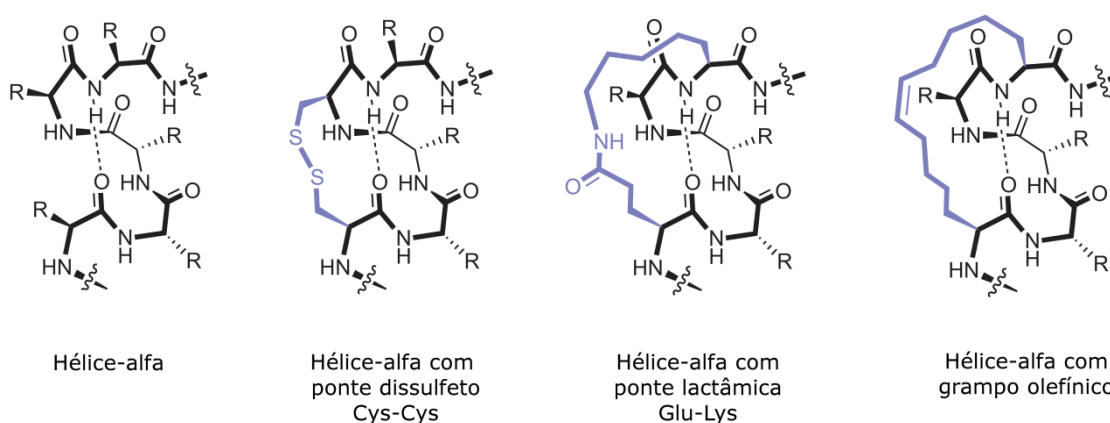


Figura 2 – Diferentes tipo de estabilizadores conformacionais de hélices-alfa, incluindo pontes dissulfeto, pontes lactâmicas e grampos olefínicos.

## 1.2. PEPTÍDEOS GRAMPEADOS

Os grampos de peptídeos grampeados (do inglês *stapled peptides*) são cadeias químicas que ligam voltas de hélices (Figura 3), e são inseridos em aminoácidos separados por três, quatro ou sete resíduos ( $i$ ,  $i+3$ ,  $i$ ,  $i+4$  e  $i$ ,  $i+7$ , respectivamente), podendo haver mais de um grampo por peptídeo (por exemplo, dois grampos  $i$ ,  $i+4$ ) (VERDINE & HILINSKI, 2012). Essa ligação pode se dar por uma ponte totalmente composta por hidrocarbonetos, obtida pela substituição de dois aminoácidos por N- $\alpha$ -Fmoc- $\alpha$ -metil, $\alpha$ -(alcenil)glicina (Figura 4). As duas cadeias laterais são fechadas por uma reação de metátese de olefina ou transalquilidenação catalisada por rutênio (MILLER & GRUBBS, 1995), formando um grampo que une os dois resíduos por uma ligação covalente (HENCHEY *et al.*, 2009). A inserção de N- $\alpha$ -Fmoc serve para

proteger a amina e é retirada no momento da incorporação do aminoácido modificado no peptídeo (KIM *et al.*, 2011), enquanto a  $\alpha$ -metilação funciona para nucleação de hélice (VERDINE & HILINSKI, 2012). O primeiro sistema grampeado desenvolvido foi um peptídeo baseado em RNase A, escolhido por seu conteúdo parcial de hélice- $\alpha$  em meio aquoso (25% no peptídeo não-modificado), permitindo a observação de alterações no conteúdo de hélice com diferentes modificações (SCHAFMEISTER *et al.*, 2000; SHIM *et al.*, 2013). Algumas configurações desse grampo aumentaram muito o conteúdo de hélice dos peptídeos, além de aumentar a afinidade de ligação com o alvo, a passagem por membranas, sua resistência a proteases, sua estabilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e sua eficácia em modelos animais de doenças humanas (WALENSKY *et al.*, 2004; BERNAL *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2011; WALENSKY & BIRD, 2014; HOWL & JONES, 2015). Fatores que influenciam a qualidade de diferentes grampos incluem seu tamanho, a configuração dos isômeros R e S, a posição da ligação dupla no grampo, a posição do grampo no peptídeo e a carga total do sistema, preferencialmente positiva (KIM & VERDINE, 2009; KIM *et al.*, 2011; PHAM *et al.*, 2013). Atualmente, os grampos de tipo  $S_{i,i+4}S(8)$ ,  $R_{i,i+3}S(8)$  e  $R_{i,i+3}S(6)$  são vistos como os grampos que ligam apenas uma volta que melhor estabilizam hélices- $\alpha$ . Grampos menores, como os de 6 carbonos, possuem a vantagem de serem menos suscetíveis à agregação, mas são inviáveis na configuração  $i,i+4$  (KIM & VERDINE, 2009; SHIM *et al.*, 2013). Os grampos  $i, i+3$  tem sido investigados como uma alternativa aos grampos  $i, i+4$ , já bem estabelecidos (KIM *et al.*, 2010).

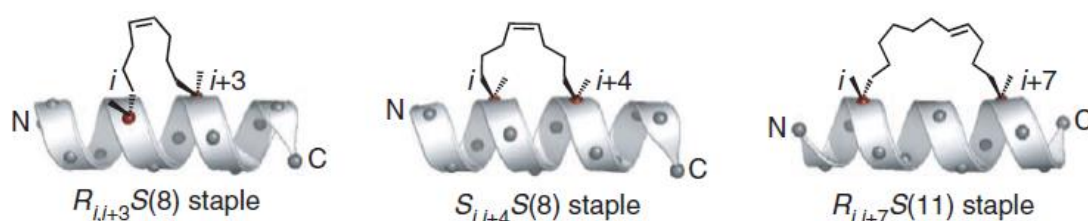


Figura 3 – Grampos em peptídeos. Aqui, são mostrados os grampos  $i, i+3$  ( $R_{i,i+3}S(8)$ ),  $i, i+4$  ( $S_{i,i+4}S(8)$ ) e  $i, i+7$  ( $R_{i,i+7}S(11)$ ), respectivamente, com o número de carbonos no grampo indicado pelo número entre parênteses e a configuração estereoquímica de cada resíduo indicada por R ou S, com peptídeos simplificados indicando a porção N-terminal (N) e C-terminal (C). Reproduzido de Kim *et al.*, 2011.

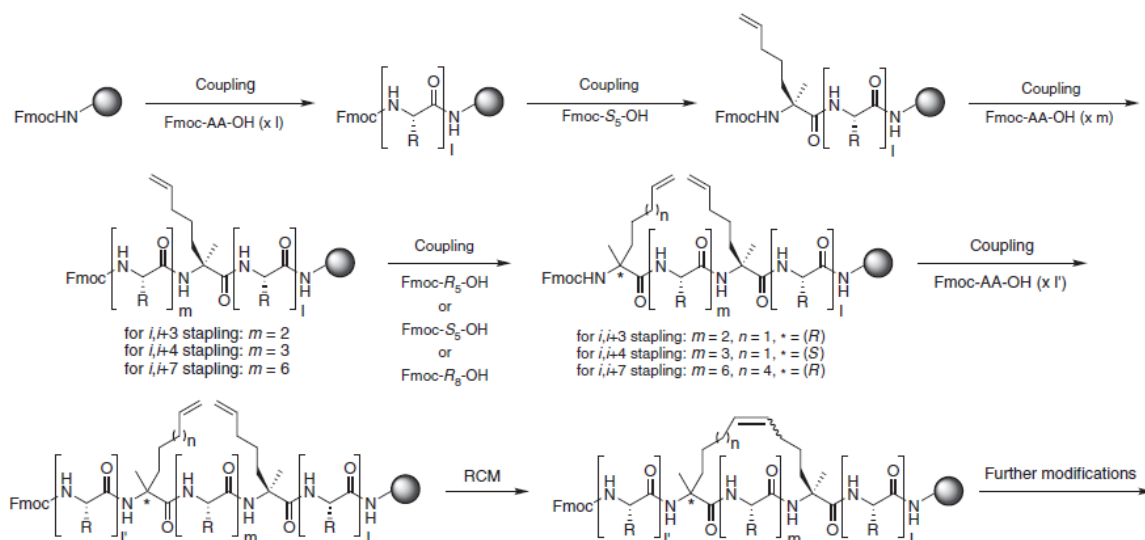


Figura 4 – Esquema do processo de síntese de peptídeos grampeados. O protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida baseado em Fmoc incorpora dois resíduos de aminoácido com substituições  $\alpha$ -metil e  $\alpha$ -alquenil, que são fechados para formar o grampo por uma reação de metátese catalisada por rutênio. Reproduzido de Kim *et al.*, 2011.

Desde seu desenvolvimento, peptídeos grampeados tem sido utilizados no estudo de diversos alvos proteicos, especialmente possíveis alvos no tratamento de câncer, que são tipicamente considerados não-moduláveis terapeuticamente (VERDINE & WALENSKY, 2007). Um exemplo é a proteína p53, importante mantenedora da integridade do genoma, que é regulada negativamente pela proteína MDM2 ou por MDM4 na maioria das células cancerosas. O foco na interação dessas proteínas tem sido de especial interesse para a aplicação de peptídeos grampeados, pois sua inibição levaria à reativação de p53, induzindo as células à apoptose (BAEK *et al.*, 2012). Diversos estudos criaram e avaliaram com sucesso inibidores de MDM2 e MDM4 baseados no domínio N-terminal de p53 que utilizam a metodologia de peptídeos grampeados (BERNAL *et al.*, 2010; BROWN *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2014; SIM *et al.*, 2014). Alguns compostos apresentam vantagens sobre inibidores da interação p53-MDM2, como a pequena molécula nutlina (VASSILEV, 2004), não apresentando toxicidade em uma ampla gama de concentrações (BROWN *et al.*, 2013) e inclusive tendo sucesso na administração intravenosa em camundongos com osteosarcoma resistente a nutlina-3 (BERNAL *et al.*, 2010). A cristalização de MDM2 complexada com um

peptídeo grampeado de p53 indica que o grampo participa da interação com a proteína-alvo (BAEK *et al.*, 2012), e outros estudos indicam que peptídeos cujo grampo interage com a proteína-alvo são menos sensíveis a mutações de resíduos-chave do peptídeo (SIM *et al.*, 2014). Recentemente, o peptídeo grampeado ATSP-704, desenvolvido pela Aileron Therapeutics, mostrou-se capaz de reativar p53 e de suprimir o crescimento de tumores com superexpressão de MDM2 e MDMX *in vitro* e *in vivo* com sucesso (CHANG *et al.*, 2013), passando para a fase de testes clínicos (identificador do site ClinicalTrials.gov: NCT02264613). Ainda se tratando de câncer, a família de proteínas BCL-2, que é um ponto de controle da regulação da apoptose, também foi utilizada como alvo. Um peptídeo grampeado derivado do segmento BH3 mostrou aumento do conteúdo de hélice, da resistência à proteases, do aumento da permeabilidade em membranas e da afinidade de ligação com BCL-2, além de ativar apoptose em células leucêmicas *in vitro* e inibir o crescimento tumoral *in vivo* (WALENSKY, 2004; WALENSKY *et al.*, 2006).

Peptídeos grampeados também conseguem acessar outros alvos interessantes, como a poliproteína Gag de HIV-1, que é clivada em uma série de domínios que incluem a proteína do capsídeo (CA). Um peptídeo que se liga ao domínio C-terminal de CA foi modificado com um grampo, que aumentou seu conteúdo de hélice e sua capacidade de atravessar membranas, permitindo que o peptídeo perturbasse a montagem do capsídeo e mostrando atividade antiviral *in vitro* (BHATTACHARYA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008, 2011). Outro alvo é a glicoproteína do envelope gp41, a partir da qual foi desenvolvido um peptídeo com dois grampos. Isso conferiu resistência a proteases e melhorou propriedades farmacocinéticas, estendendo a aplicação de grampos a peptídeos mais longos (BIRD *et al.*, 2010). Ainda outro alvo é a proteína integrase, a qual grampos conferem estabilidade de estrutura, permeabilidade de membranas e inibição da replicação de HIV-1 *in vitro* (LONG *et al.*, 2013).

Diversos outros alvos foram estudados com o uso de peptídeos grampeados, entre eles o receptor de estrogênio (PHILLIPS *et al.*, 2011), o

transportador ABCA 1 (SVIRIDOV *et al.*, 2011), peptídeos com atividade microbiana (AMPs) (CHAPUIS *et al.*, 2012; DINH *et al.*, 2014), a glicoproteína de envelope do vírus da hepatite C (CUI *et al.*, 2013), a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório (BIRD *et al.*, 2014), a proteína cinase A (WANG *et al.*, 2014), pequenas proteínas resistentes a múltiplos fármacos (SMRs) (BELLMANN-SICKERT *et al.*, 2015) e a proteína Mcm6 da replicação de DNA (LEE *et al.*, 2015). Variações dessa metodologia incluem diferentes composições do grampo, incluindo amidas, éteres e ésteres, sendo estes alternativas para diferentes condições de solvente (YOO & KIM, 2014), e a metodologia *double click*, formando diazidopeptídeos (LAU *et al.*, 2014). Possíveis desvantagens incluem a falta de informações clínicas em humanos, embora atualmente dois peptídeos grampeados estejam passando por testes clínicos (identificadores do site ClinicalTrials.gov: NCT01775358 e NCT02264613).

A grande quantidade e diversidade de estudos experimentais de peptídeos grampeados indica como essa modificação é versátil. A obtenção da maior quantidade de informações possíveis sobre esse sistema, de preferência de forma rápida e com baixo custo e em diversos níveis, incluindo seu comportamento atômico e conformacional, geraria informações necessárias ao planejamento racional de fármacos, além de possibilitar o estudo e engenharia de proteínas. Nesse contexto, a inserção de um grampo pode auxiliar na manutenção da estrutura de proteínas maiores, aumentando sua estabilidade e possibilitando seu uso biotecnológico. O aumento de estabilidade possibilitou o uso de peptídeos BH3 grampeados na captura da família de proteínas BCL-2, permitindo a determinação de seu interatoma (BRAUN *et al.*, 2010). A engenharia de proteínas mais estáveis também pode auxiliar no melhoramento de biocatalisadores, que possuem amplo uso em diversos setores industriais, como o têxtil, o de alimentos e o de biorefinaria (JEMLI *et al.*, 2016). Além disso, a produção de proteínas estáveis de tamanho reduzido pode auxiliar na produção de proteínas de afinidade para uso em pesquisa e diagnóstico, na estabilização de moléculas para a determinação de sua estrutura por ressonância magnética nuclear e cristalografia de raios-X e no diagnóstico

molecular por imagem (GRÖNWALL & STÅHL, 2009). Outras possíveis aplicações incluem o uso de grampos na produção de biomateriais e na medicina regenerativa (HOLMES, 2002; COLLIER & SEGURA, 2011).

### 1.3. DINÂMICA MOLECULAR

Simulações por dinâmica molecular (DM) realizam cálculos computacionais do movimento dos átomos em um determinado sistema, assim descrevendo a variação do comportamento molecular em função do tempo (VERLI, 2014). A primeira simulação por DM foi realizada na década de 1950, utilizando um modelo de esferas rígidas que se movem à velocidade constante e cujas colisões são totalmente elásticas (ALDER & WAINWRIGHT, 1957). Já na década de 1970, foram realizadas a primeira simulação de um solvente – a água (RAHMAN, 1971); e as primeiras simulações de uma biomolécula, primeiro de forma simplificada (LEVITT & WARSHEL, 1975) e, após, com detalhamento em nível atômico – o inibidor pancreático da tripsina bovina (MCCAMMON *et al.*, 1977). Esta última teve como principal consequência a quebra do paradigma que considerava proteínas como estruturas rígidas, corroborando o que dados experimentais já sugeriam na época, ou seja, que proteínas são sistemas dinâmicos, cujos movimentos internos possuem papel funcional (KARPLUS & MCCAMMON, 2002). Recentemente, Martin Karplus, Michael Levitt e Arieh Warshel foram agraciados com o prêmio Nobel em Química pelo desenvolvimento de métodos multiescala para o estudo de biomoléculas, evidenciando a importância desses métodos na ciência (JOGALEKAR, 2013).

A metodologia de mecânica molecular (MM), que calcula geometrias e energias conformacionais de moléculas, inclui o método de DM, que calcula o movimento dos átomos em uma molécula de acordo com as leis de movimento de Newton (SANT'ANNA, 2002). Esta metodologia ignora movimentos de elétrons e calcula a energia do sistema em função das posições nucleares. Mesmo sem a exatidão de cálculos de mecânica quântica (QM, do inglês *Quantum Mechanics*), as simulações por DM podem, em alguns casos, dar respostas tão precisas quanto cálculos quânticos, capturando informações



sobre diversos processos bioquímicos relevantes, porém com custo computacional reduzido (LEACH, 2001; DROR *et al.*, 2012).

Métodos experimentais de resolução de estruturas de biomoléculas, como a ressonância magnética nuclear e a cristalografia de raios-X, em especial, fornecem informações limitadas para o entendimento de diversas atividades biológicas, pois descrevem apenas uma visão média e estática de um sistema que na realidade é complexo, flexível e que se altera no tempo e no espaço (DROR *et al.*, 2012; SCHLICK, 2010). Essas estruturas podem servir como ponto de partida para a simulação por DM, que consegue modelar movimentos no nível atômico, baseando-se nas leis de movimento de Newton (DROR *et al.*, 2012; LEACH, 2001).

A metodologia de simulação por DM sofreu diversos ajustes desde sua primeira aplicação a sistemas biológicos. Por exemplo, para aproximar as simulações por DM de sistemas biológicos reais, em geral os sistemas são solvatados em água, e é importante que o sistema solvatado passe por minimizações de energia anteriores à DM para que haja a acomodação das moléculas do sistema. As leis de movimento de Newton são aplicadas no sistema para gerar uma trajetória que especifica como as posições e velocidades das partículas variam em função do tempo (LEACH, 2001). Nessas simulações, as partículas são tratadas como um grupo de esferas unidas por forças elásticas (NAMBA *et al.*, 2008). O cálculo da trajetória é realizado através da integração da segunda lei de Newton:

$$F_{x_i} = \frac{d^2 x_i}{dt^2} m_i = \frac{\Delta v_i}{\Delta t} m_i = a_i m_i$$

onde uma força  $F$  é aplicada a um átomo  $i$  na posição  $x$ , considerando um tempo  $t$ , uma velocidade  $v$  e uma aceleração  $a$  (VERLI, 2014). Conforme a simulação avança no tempo, alternando entre calcular as forças atuantes em cada partícula e usar as leis de movimento para atualizar as posições e velocidades dos átomos, é produzida uma trajetória com os movimentos globais do sistema, possibilitando análises conformacionais e energéticas (LEACH, 2001).

As forças que atuam nessas partículas precisam ser fornecidas para a equação, sendo calculadas a partir de um modelo chamado de campo de força, que reúne um conjunto de parâmetros utilizados em cálculos de mecânica molecular baseados em uma combinação de primeiros princípios e da adequação a cálculos de mecânica quântica e dados experimentais (DROR *et al.*, 2012). O campo de força define os potenciais de interação entre partículas, incluindo interações entre átomos ligados (comprimentos de ligação, ângulos de ligação e diedros) e entre átomos não-ligados (interações de van der Waals e de Coulomb) (LEACH, 2001; NAMBA *et al.*, 2008). Conforme a Figura 5, consideram-se os átomos do sistema como esferas unidas por molas e se definem, por exemplo, energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulos de ligação da molécula (LEACH, 2001). Essas informações est áticas referentes à descrição dos modos de ligação do sistema são chamadas de topologia, e são descritas em um arquivo específico para as moléculas em cada sistema.

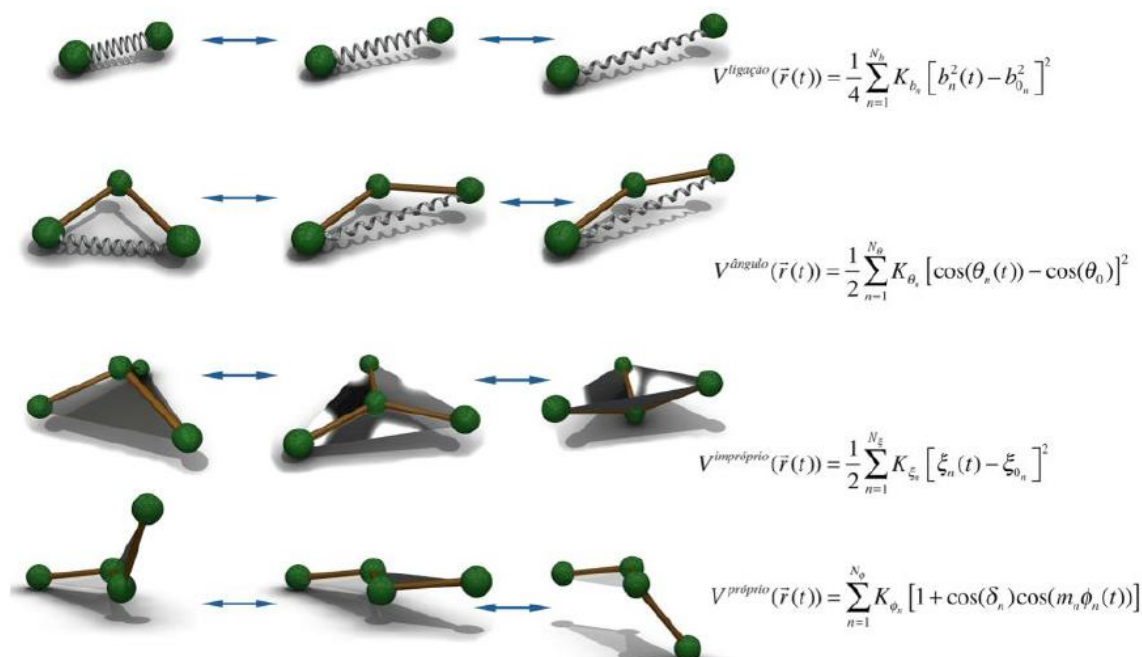


Figura 5 - Representação de alguns termos que compõem o campo de força GROMOS96. De cima para baixo: termo de ligação; termo de ângulo; termo de ângulo diedral impróprio; termo de ângulo diedral próprio. Reproduzido de Verli, 2014.

Diversos campos de força empregados atualmente utilizam abordagens diferentes na descrição dos átomos do sistema: o GROMOS96 utiliza a abordagem de átomo unido (do inglês *united-atom*), unindo hidrogênios apolares aos átomos aos quais estão ligados, desta forma criando pseudoátomos como forma de simplificar o sistema (SCOTT *et al.*, 1999); outros campos de força, como AMBER (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2010), CHARMM (MACKERELL *et al.*, 1998) e OPLS (JORGENSEN *et al.*, 1996) consideram explicitamente todos os átomos do sistema (do inglês *all-atom*). Mesmo com a mesma abordagem, cada campo de força tem seus termos e constantes otimizados para diferentes sistemas biológicos. Portanto, mesmo considerando as mesmas propriedades, dois campos de força com parâmetros distintos podem gerar resultados muito diferentes em um determinado sistema, mas resultados de acurácia comparável em outro (LEACH, 2001).

Caso haja a necessidade de parametrizar um tipo de átomo ou uma molécula que não tenha termos já definidos no campo de força, é preciso levar em consideração a transferabilidade de parâmetros em campos de força, na qual grupos químicos semelhantes com propriedades equivalentes podem utilizar os mesmos parâmetros (VERLI, 2014), além de permitir que um conjunto de parâmetros desenvolvidos e testados em um determinado número de sistemas possa ser aplicado em um conjunto maior de casos (LEACH, 2001). A transferabilidade não é aplicável, no entanto, entre campos de força diferentes.

Dada a natureza intrinsecamente simplificada de qualquer modelo, os métodos de modelagem *in silico* são especialmente vantajosos no contexto do CADD, especialmente na fase inicial de seleção de compostos químicos com potencial terapêutico em estudo, por serem muito menos custosos em termos financeiros e temporais (RAPAPORT, 2014). Métodos de mecânica molecular são preferíveis a métodos de QM, que são impraticáveis para a descrição de macromoléculas biológicas (DROR *et al.*, 2012). No entanto, a capacidade computacional ainda é uma das principais limitações de simulações por DM. Historicamente, as escalas de tempo acessíveis a simulações por DM eram mais curtas do que aquelas nas quais ocorrem eventos biológicos, como

enovelamento proteico, ligação proteína-ligante, e mudanças conformacionais essenciais à função proteica. Avanços recentes em *hardware*, *software* e algoritmos aumentaram a escala de tempo acessível à DM, permitindo simulações na ordem de milissegundos, conforme demonstrado na Figura 6 (DROR *et al.*, 2012). Além disso, campos de força como o GROMOS diminuem o número de elementos no sistema, reduzindo a quantidade de cálculos na simulação, portanto diminuindo a parte mais custosa computacionalmente (LEACH, 2001).

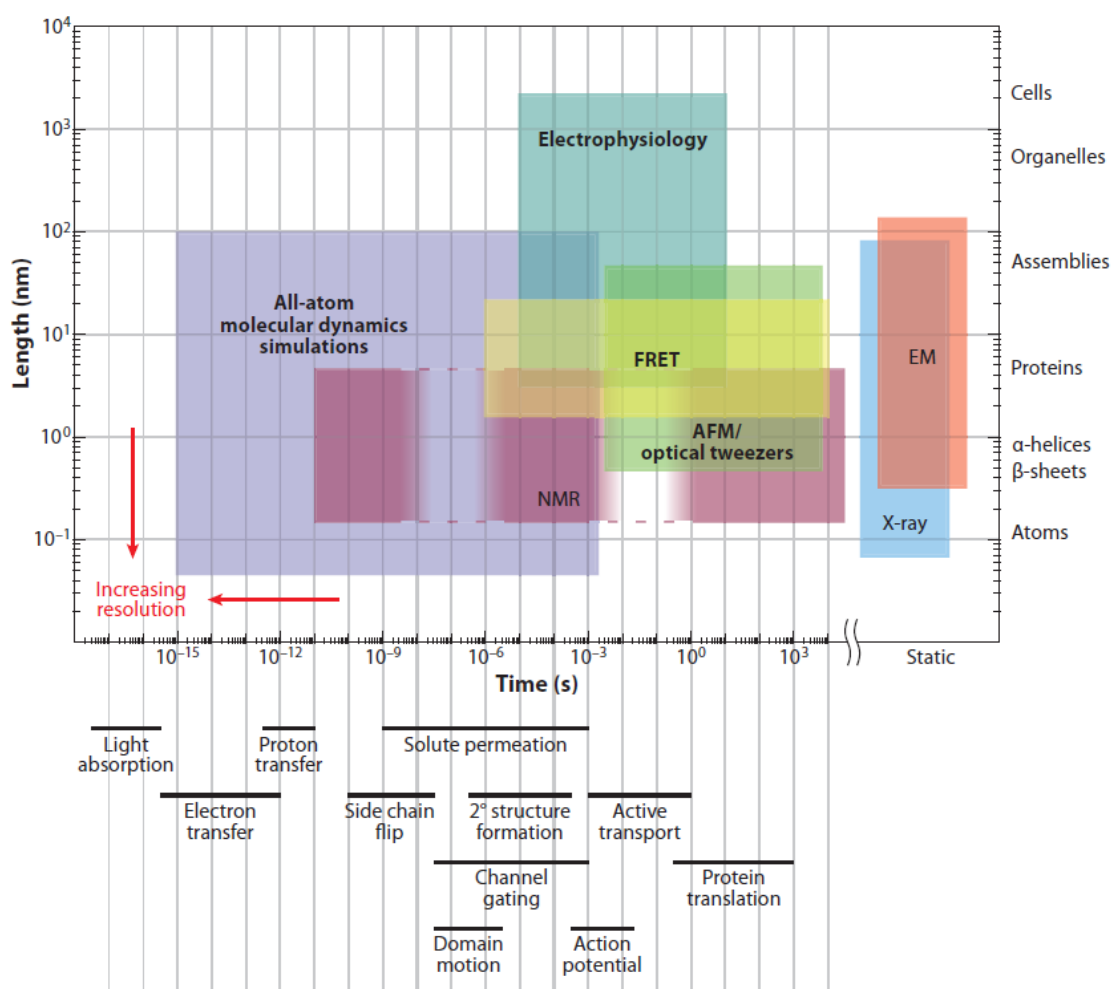


Figura 6 - Resolução espaço-temporal de técnicas biofísicas. Os retângulos coloridos indicam técnicas e sua resolução temporal (eixo x) e espacial (eixo y). Técnicas capazes de resolver estruturas a nível de moléculas individuais estão em negrito, enquanto técnicas capazes de gerar dados apenas em conjuntos de moléculas estão em fonte normal. Métodos de RMN podem acessar diversas escalas de tempo, mas fornecem informações limitadas para escalas intermediárias, como indicado pelo tom mais claro e linhas pontilhadas na figura. As escalas de tempo de alguns processos moleculares e fisiológicos estão indicadas abaixo da abscissa. As resoluções espaciais para definir certos objetos estão indicadas à direita. AFM, microscopia de força atômica; EM, microscopia eletrônica; FRET, transferência de energia por ressonância de Förster; NMR, ressonância magnética nuclear. Dror *et al.*, 2012.

Outro fator limitante das simulações por DM é a precisão dos campos de força. Isso tem sido corrigido com sua constante atualização e refinamento, com o objetivo de descrever biomoléculas com maior acurácia (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2012). Além disso, maiores tempos de simulação possibilitados pela constante melhoria de *hardware* permitem maior validação contra dados experimentais (DROR *et al.*, 2012). Essa comparação com resultados gerados por metodologias de bancada é essencial para que os resultados de modelos computacionais sejam aceitos com segurança (PIANA *et al.*, 2011).

Nesse contexto, simulações por DM possuem diversas aplicações no estudo de biomoléculas. Analisando a dinâmica de um sistema molecular no tempo e no espaço, podemos obter dados sobre suas propriedades dinâmicas e estruturais, incluindo energias moleculares, mudanças configuracionais e interações enzima-substrato, além de possibilitar a visualização do enovelamento proteico (SCHLICK, 2010). Pelo papel que a flexibilidade tem na manutenção ou mudança da conformação estrutural, que por sua vez influencia a função e regulação de moléculas de importância biológica, como por exemplo a exposição e cobertura de sítios ativos por abas na proteína (KARPLUS & MCCAMMON, 2002), estas simulações podem ser usadas para identificar transições entre conformações (DROR *et al.*, 2012), obter informações sobre enovelamento de proteínas, interações entre macromoléculas biológicas e auxiliar no desenho racional de fármacos (LEI & DUAN, 2007). São considerados três tipos principais de aplicações de métodos de simulação para o estudo de biomoléculas, sendo eles: amostrar espaço conformacional, determinar ou refinar estruturas obtidas por experimentos; obter uma descrição do sistema em equilíbrio, incluindo propriedades de estrutura e de movimento; e examinar a dinâmica da biomolécula em si, o que só pode ser obtido através da DM (KARPLUS & MCCAMMON, 2002). A combinação de DM com outras técnicas computacionais, como o atracamento molecular, pode ser muito interessante para o planejamento de fármacos por CADD (NAMBA *et al.*, 2008).

#### 1.4. DINÂMICA MOLECULAR DE PEPTÍDEOS GRAMPEADOS

A integração de métodos computacionais que incluam a flexibilidade do sistema com novas técnicas de estabilização estrutural é de grande importância para a aplicação e predição da ação desses sistemas. Apesar do grande volume de dados experimentais, não há muitos estudos computacionais que envolvam a simulação de peptídeos grampeados, e nada de forma comparativa (Tabela 2). O primeiro estudo desse tipo criou para BH3 um modelo Gō, no qual cada aminoácido é descrito como uma esfera e as ligações peptídicas são representadas por molas (HAMACHER *et al.*, 2006). Outro estudo, utilizando a metodologia de simulações Monte Carlo por  $100 \times 10^6$  passos, simulou RNase A e BH3 (KUTCHUKIAN *et al.*, 2009). Simulações de dinâmica molecular foram executadas com p53 nos campos de força Cornell por 15 ns (JOSEPH *et al.*, 2010), OPLS 2005 por 10 ns, aliado a *replica exchange* com 64 réplicas por 10 ns (GUO *et al.*, 2010), e com AMBER99SB por 50 ns (SIM *et al.*, 2014); com BH3 no campo de força AMBER99SB por 20 ns (JOSEPH *et al.*, 2012); e com eIF4E no campo de força AMBER99SB por 50 ns, aliado a *replica exchange* com 24 réplicas por 20 ns (LAMA *et al.*, 2013). Dessa forma, não há análises comparativas que gerem dados sobre qual campo de força descreve melhor o comportamento desses sistemas. O uso de um campo de força adequado nas simulações de peptídeos grampeados pode acelerar muito o seu estudo, gerando informações confiáveis e que possam direcionar estudos futuros.

Tabela 2 – Simulações computacionais com peptídeos grampeados. São mostrados os peptídeos utilizados nos estudos, potenciais aplicações terapêuticas dos peptídeos estabilizados com grampos, a metodologia utilizada e a referência.

Peptídeo	Aplicação terapêutica	Método	Referência
BH3	Cânceres com superexpressão de MCL-1 (ex: leucemia mielóide crônica)	Modelo Gō	HAMACHER <i>et al.</i> , 2006
RNase A e BH3	-	Monte Carlo	KUTCHUKIAN <i>et al.</i> , 2009
p53	Cânceres com superexpressão de MDM2 e MDMX (ex: sarcomas de tecidos moles)	DM (Cornell)	JOSEPH <i>et al.</i> , 2010

p53	Cânceres com superexpressão de MDM2 (ex: sarcomas de tecidos moles)	DM (OPLS 2005) + <i>replica exchange</i>	GUO <i>et al.</i> , 2010
BH3	Cânceres com superexpressão de MCL-1 (ex: leucemia mielóide crônica)	DM (AMBER99SB)	JOSEPH <i>et al.</i> , 2012
eIF4E	Cânceres com 4E-BPs hiperfosforiladas por mTOR (ex: cancer de endométrio)	DM (AMBER99SB) + <i>replica exchange</i>	LAMA <i>et al.</i> , 2013
p53	Cânceres com superexpressão de MDM2 (ex: sarcomas de tecidos moles)	DM (AMBER99SB)	SIM <i>et al.</i> , 2014

## 2. OBJETIVOS

Fragmentos peptídicos de proteínas vêm desempenhando um papel cada vez maior no arsenal terapêutico. Sua característica simplificação estrutural, embora possa oferecer maior acessibilidade sintética, pode também comprometer conformações bioativas. Dessa forma, estratégias de modificação química de peptídeos, capazes de manter as formas tridimensionais responsáveis pelas propriedades terapêuticas, apresentam grande potencial no desenvolvimento de novos fármacos. Paralelamente, métodos de simulação computacional de moléculas vêm exercendo papel crescente neste processo, contribuindo para a antecipação de propriedades farmacológicas e, por conseguinte, em um cuidadoso planejamento racional de moléculas de interesse, reduzindo o risco e a incerteza no desenvolvimento de fármacos.

Neste contexto, a presente dissertação busca avaliar a capacidade de simulações por DM em antecipar o efeito conformacional de grampos olefínicos, usando como referência experimental dados de dicroísmo circular previamente descritos.

Considerando ainda a ampla gama de estratégias de DM disponíveis, o presente trabalho busca:

- Construir topologias para peptídeos grampeados  $i, i+3$  nos campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7;
- Comparar o comportamento conformacional gerado para peptídeos grampeados e não-grampeados nos três campos de força;
- Gerar dados de dicroísmo circular teórico para os peptídeos simulados e compará-los a dados experimentais previamente obtidos;
- Comparar as metodologias de *united-atom* e *all-atom* na descrição de peptídeos grampeados.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. PROGRAMAS DE VISUALIZAÇÃO

Durante o presente trabalho, diversas análises exigiram o uso de programas de visualização. Os programas desse tipo empregados nesta dissertação foram o VMD (HUMPHREY *et al.*, 1996), o PyMOL (“The PyMOL Molecular Graphics System”), o MOLGEN (SCHAFTENAAR; NOORDIK, 2000) e o UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004).

#### 3.2. CONSTRUÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Trabalhos anteriores de Verdine e colaboradores desenvolveram uma série de peptídeos grampeados baseados em RNase A, com a sequência de 15 aminoácidos EWAEETAAAKFLAAHA (KIM *et al.*, 2010; SCHAFMEISTER *et al.*, 2000; SHIM *et al.*, 2013). A escolha desse peptídeo é baseada em seu parcial conteúdo de hélice quando em solução, permitindo a observação de perda e ganho no conteúdo de hélice (SCHAFMEISTER *et al.*, 2000).

Escolhemos duas conformações de partida para as simulações por DM no presente trabalho: uma hélice- $\alpha$  ideal e uma estrutura desenovelada. A utilização de duas estruturas iniciais funciona como uma estratégia de validação interna: caso o comportamento molecular resultante da DM dos dois estados conformacionais seja semelhante, então a amostragem é adequada. A estrutura primária do peptídeo foi condicionada à conformação de hélice- $\alpha$  no programa PyMOL, gerando o peptídeo com conformação de partida de hélice- $\alpha$  (CPH). Para a construção da conformação de partida desenovelada (CPD), utilizou-se o programa de modelagem molecular Modeller9v14 (WEBB & SALI, 2014), utilizando a hélice- $\alpha$  gerada anteriormente como molde, de forma a guiar a estrutura gerada a possuir uma volta de hélice- $\alpha$  entre os resíduos englobados pelo grampo. Essa volta permite a proximidade espacial dos resíduos de aminoácido 4 e 7, a serem conectados pelo grampo olefínico. Os critérios de escolha de CPD dentre as estruturas geradas foram a presença de volta de hélice- $\alpha$  nos resíduos de aminoácido 4 a 7 e a máxima diferença entre

os resíduos restantes quando comparados aos resíduos correspondentes em *CPH*, através de alinhamento de estrutura com o PyMOL. As estruturas resultantes, utilizadas para a simulação dos peptídeos não-grameados, são mostradas com sua estrutura simplificada na Figura 7, e foram utilizadas para a subsequente inserção dos grampos e a formação das estruturas grampeadas.

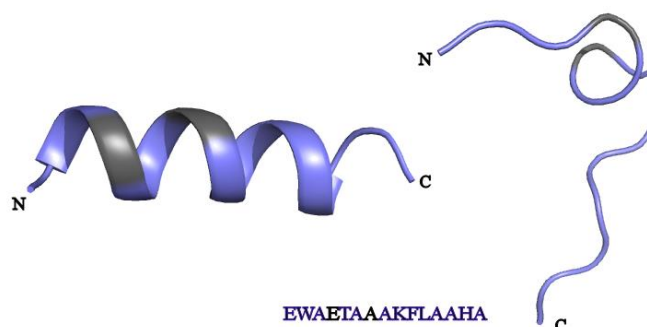


Figura 7 – Estruturas iniciais de RNase A utilizadas para as simulações. À esquerda, conformação de partida de hélice (*CPH*); à direita, conformação de partida desenovelada (*CPD*). Os resíduos a serem conectados pelo grampo estão mostrados em cinza e indicados na sequência primária. As porções N-terminal (N) e C-terminal (C) estão representadas.

### 3.3. CONSTRUÇÃO DOS RESÍDUOS DO GRAMPO

Neste trabalho, foram escolhidos três grampos, todos separados por três resíduos de aminoácidos ( $i, i+3$ ): o grampo de 8 carbonos  $R_{i,i+3}S(8)$  e dois grampos de 6 carbonos  $R_{i,i+3}S(6)$ , diferenciados pela posição da ligação dupla (Figura 8). O grampo  $R_{i,i+3}S(8)$  inserido na RNase A (a partir daqui, referenciado por R5S5) permite a maior quantidade de hélice- $\alpha$  nos três grampos; o grampo  $R_{i,i+3}S(6)$  com a ligação dupla entre os carbonos 3 e 4 (a partir daqui, referenciado por R3S5) tem um desempenho similar, mas ligeiramente menor; e o grampo  $R_{i,i+3}S(6)$  com a ligação dupla entre os carbonos 4 e 5 (a partir daqui, referenciado por R5S3) tem o pior desempenho na manutenção de hélice- $\alpha$ .

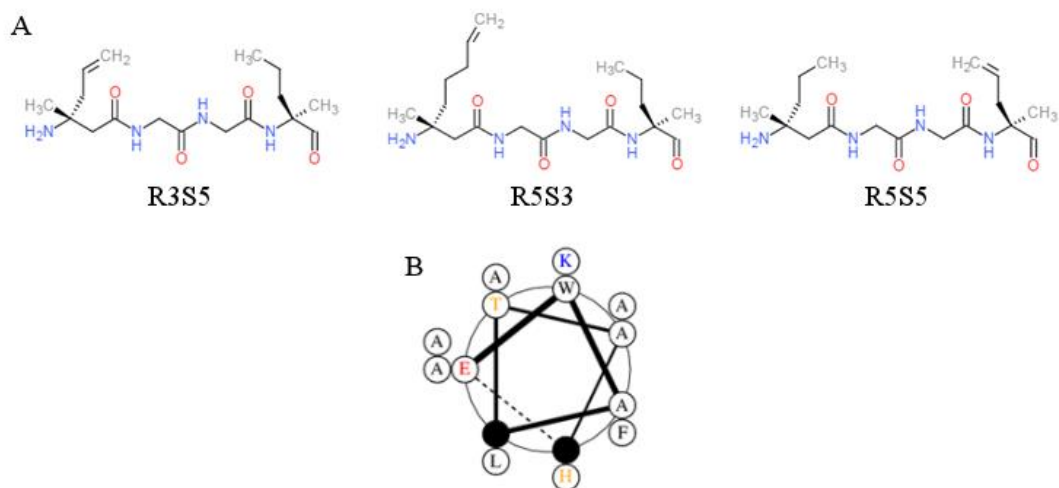


Figura 8 – Configurações dos peptídeos grampeados. (A) São representados os resíduos de 4 a 7, com os resíduos 5 e 6 simplificados apenas a seu esqueleto peptídico. Os resíduos de grampo, nos resíduos 4 e 7, possuem esqueleto peptídico com duas substituições nos carbonos- $\alpha$ : um  $\alpha$ -metil e uma cadeia de 3 ou 5 carbonos. Aqui fica evidenciada a diferença da posição da ligação dupla nos grampos R3S5 e R5S3. (B) Visão em *wheel* da hélice- $\alpha$  utilizada no presente trabalho (obtida através do programa Drawcoil 1.0, disponível em <http://www.grigoryanlab.org/drawcoil/>). Os resíduos de aminoácidos aparecem com o código de uma letra, com os resíduos do grampo representados por círculos pretos. A sequência de leitura inicia pelo círculo mais interno que está conectado à linha mais grossa, e segue em sentido horário, da linha mais grossa à mais fina.

Para a construção do arquivo com a estrutura dos grampos, os peptídeos *CPH* e *CPD* foram utilizados como base. Utilizando o programa MOLDEN, os resíduos 4 e 7 foram modificados de acordo com o necessário para cada um dos três tipos de grampo. Para o grampo  $R_{i,i+3}S(8)$ , o resíduo 4 foi substituído pelo resíduo de grampo D5R, e o resíduo 7 foi substituído pelo resíduo de grampo S3S – resultando no peptídeo R5S5; para os grampos  $R_{i,i+3}S(6)$ , um deles, formando o peptídeo R3S5, o resíduo 4 foi substituído pelo resíduo de grampo D3R e o resíduo 7 foi substituído pelo resíduo de grampo S3S; e no outro grampo, gerando o peptídeo R5S3, o resíduo 4 foi substituído pelo resíduo de grampo S3R e o resíduo 7 foi substituído pelo resíduo de grampo D3S (Figura 9). Os grampos fechados resultantes são mostrados na Figura 10.

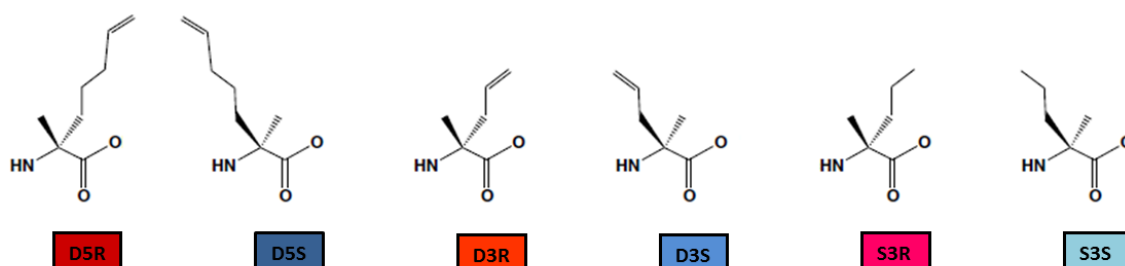


Figura 9 – Resíduos dos grampos. A primeira letra de cada nome indica se há uma ligação dupla presente (D) ou não (S); o número indica a quantidade de carbonos em cada resíduo (3 ou 5); a segunda letra indica a isomeria do resíduo (R ou S). Adaptado de Shim *et al.*, 2013.

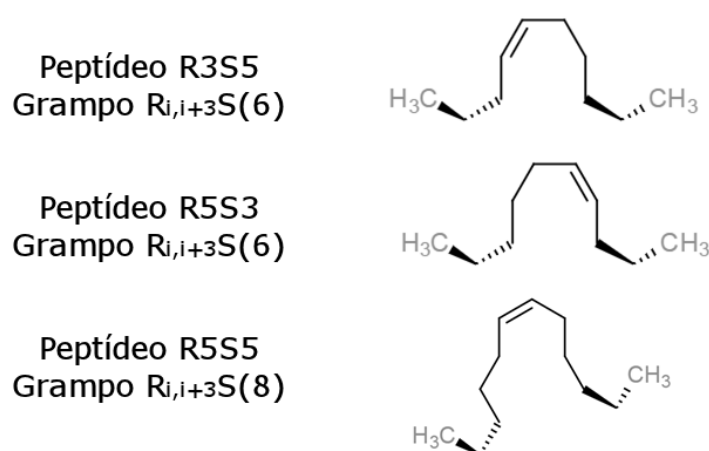


Figura 10 – Grampos utilizados no presente trabalho e os respectivos peptídeos referenciados. Observa-se que os peptídeos R3S5 e R5S3 apenas diferem na posição da ligação dupla.

### 3.4. PARAMETRIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DO GRAMPO

Para executar as simulações, é necessário que haja parâmetros definidos no campo de força. A maioria dos campos de força possui parâmetros para proteínas, mas não parâmetros específicos para resíduos de aminoácidos não-naturais, incluindo termos para o característico alceno nos grampos olefínicos. Isso faz com que seja importante definir parâmetros adequados para a descrição dessas ligações. Como a etapa de parametrização de biomoléculas requer uma extensa fase de validação, neste trabalho escolhemos grupamentos já descritos na literatura para descrever essa ligação dupla, baseados no princípio de transferabilidade dos termos, que é central ao desenvolvimento de campos de força (LEACH, 2001). Em todos os grupos,

resolveu-se basear a descrição de cargas no lipídio POPG, descrevendo a ligação dupla e os átomos no entorno desta, pois esse lipídio já possui termos bem descritos nos três campos de força estudados. Cada parâmetro foi obtido do pacote de lipídios específico para cada campo de força (Tabela 3) (DOMAŃSKI *et al.*, 2010).

Tabela 3 – Tabela de informações utilizadas para cada campo de força.

<b>Campo de Força</b>	<b>Parâmetro de ligação dupla (referência)</b>	<b>Modelo de Água</b>
AMBER99SB-ILDN	POPG (JÄMBECK & LYUBARTSEV, 2012)	TIP3P
CHARMM36	POPG (JANG <i>et al.</i> , 2008)	TIP3P
GROMOS54A7	POPG (KUKOL, 2009)	SPC

### 3.5. SIMULAÇÕES POR DM

Todas as simulações foram baseadas em procedimentos previamente descritos com o pacote Gromacs, versão 4.5 (DE GROOT & GRUBMÜLLER, 2001; VAN DER SPOEL *et al.*, 2005; DE AGUIAR *et al.*, 2015; PEDEBOS *et al.*, 2015), e realizadas à temperatura de 293 K para possibilitar a comparação com dados experimentais de dicroísmo circular (CD) (SHIM *et al.*, 2013). Cada molécula foi solvatada em uma caixa octaédrica utilizando condições periódicas de contorno, empregando modelos de água recomendados para cada campo de força (Tabela 3). Contraíons de sódio foram adicionados para neutralizar o sistema quando necessário. O método Lincs (HESS *et al.*, 1997) foi utilizado na restrição de ligações covalentes, de forma a permitir um tempo de integração de 2 fs, enquanto interações eletrostáticas foram calculadas pelo uso do método Particle Mesh Ewald (DARDEN *et al.*, 1993), utilizando raios de corte de Coulomb e de van der Waals de 10 Å. Foram realizadas duas etapas de minimização com o algoritmo *steepest descent*, de forma a acomodar as moléculas de água e as cadeias laterais dos peptídeos, de forma a reduzir a energia global do sistema. As simulações foram realizadas em duplicatas

independentes de 500 ns para cada sistema, partindo de velocidades iniciais diferentes, com o intuito de verificar se há consistência nos resultados das duas simulações, gerando uma janela amostral de 1  $\mu$ s.

### 3.6. ANÁLISES

#### 3.6.1. COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL

Utilizando o pacote Gromacs, as seguintes características foram avaliadas:

- 1) Estabilidade da conformação de partida: uma trajetória pode ser considerada um conjunto de diversas conformações ao longo do tempo. Podemos compará-las à conformação inicial, de forma a indicar o quanto a estrutura se modificou ao longo do tempo de simulação. Isso é feito através do cálculo do desvio quadrático médio (RMSD, *root mean square deviation*), que calcula a diferença média entre as conformações fornecidas (MAIOROV; CRIPPEN, 1994) e é descrito pela seguinte equação:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

onde  $\delta$  é a diferença entre  $N$  pares de átomos equivalentes. Esta análise permite que se veja o quanto diferente a estrutura de interesse fica da configuração original conforme o passar da simulação (VERLI, 2014). Em estudos de proteínas por DM, usa-se a estrutura tridimensional oriunda do método de difração de raios-X como referência para o cálculo de RMSD da trajetória, fornecendo uma fonte de integração com o método experimental. Há três situações principais quando comparando conformações geradas em simulações por DM à estrutura de referência:

- a) conformações muito parecidas com a informação cristalina. Isso pode indicar uma baixa amostragem do espaço conformacional (ou seja, simulações muito curtas), moléculas particularmente rígidas ou

um campo de força balanceado excessivamente para descrição da informação cristalina, não necessariamente equivalente às soluções;

- b) conformações muito diferentes da informação cristalina. Neste caso, as grandes mudanças conformacionais podem estar relacionadas a artefatos do campo de força, da estrutura de partida (baixa resolução do dado cristalino ou introdução de artefatos pelo usuário) ou a uma amostragem adequada, capaz de permitir a perda da memória conformacional do ambiente cristalino e a população de estados conformacionais na solução de interesse. Em tais situações, a informação de origem cristalográfica perde importância e outros métodos devem ser empregados para validação do perfil conformacional observado;
- c) o mais usual, contudo, é um perfil intermediário, com a manutenção da forma do arcabouço proteico e algumas regiões concentrando o maior grau de mudança conformacional.

Na presente dissertação, como as estruturas iniciais foram criadas computacionalmente, podemos comparar o quanto o peptídeo se modificou em relação a uma hélice- $\alpha$  ideal (para *CPH*), para a qual um RMSD alto seria indicativo de perda de conformação, e em relação à *CPD*, onde um distanciamento da geometria de partida pode indicar o enovelamento do peptídeo. Utilizou-se como referência o esqueleto peptídico, isto é, incluindo apenas o nitrogênio da amina, o carbono- $\alpha$  e o carbono da carboxila, eliminando a influência de cadeias laterais, que tendem a aumentar o valor de RMSD (VERLI, 2014). O efeito do grampo será avaliado indiretamente pela influência no esqueleto peptídico no RMSD médio.

- 2) Flexibilidade dos peptídeos: Embora o aumento nos valores de RMSD possa indicar flexibilidade conformacional, essa relação não é obrigatória. Por exemplo, se uma parte da molécula sofre uma grande mudança conformacional entre um estado e outro, e se estabiliza neste segundo estado pela maior parte da trajetória, o RMSD será elevado, pois a diferença entre o estado estável e a conformação de partida pode ser

grande. No entanto, sua flexibilidade pode não o ser. Assim, utiliza-se como uma das medidas da flexibilidade de resíduos (ou átomos) em uma dada estrutura a flutuação quadrática média (RMSF, do inglês *root mean square fluctuation*) de cada resíduo. Esta análise permite que se veja a flutuação da posição atômica em comparação à configuração original, independente de tempo. Isso permite identificar os resíduos mais variáveis (flexíveis) com o passar da simulação, além de poder indicar a perda de estrutura secundária com valores elevados (VERLI, 2014).

- 3) Estabilidade do conteúdo de hélice: Sendo a conformação de partida uma hélice- $\alpha$ , valores de RMSD e RMSF baixos sugerem fortemente a estabilidade desta estrutura secundária e, por conseguinte, a manutenção de um arcabouço molecular potencialmente útil terapeuticamente. Contudo, uma estrutura do tipo hélice- $\alpha$  apresenta características específicas, como diâmetro de cada volta, incremento no comprimento da hélice a cada volta e um padrão de interações por ligação de hidrogênio entre os resíduos de duas voltas consecutivas. As características de RMSD e RMSF mencionadas acima podem ser alcançadas sem que todos os critérios para a ocorrência de uma hélice- $\alpha$  sejam atendidos, produzindo arcabouços moleculares semelhantes mas não equivalentes a hélice- $\alpha$ . Para tanto, emprega-se ferramentas de análises específicas, como o conteúdo de hélice (do inglês *helicity*) e medidas mais amplas de tipos de estrutura secundária (DSSP).

A ferramenta *g\_helix* realiza uma série de análises em hélices, incluindo conteúdo de hélice (HIRST & BROOKS, 1994), que verifica um pico característico no CD específico de hélices- $\alpha$ , a 222 nm. Esta análise indica a porcentagem de tempo da simulação que cada resíduo permaneceu com a estrutura de hélice- $\alpha$ , permitindo verificar o efeito da adição dos grampos na conformação dos resíduos.

A análise de DSSP calcula a evolução de estruturas secundárias durante a simulação, incluindo hélices- $\alpha$ , estruturas desordenadas, folhas- $\beta$  e outros tipos de hélices, a partir do padrão de ligações dos hidrogênios da proteína (KABSCH & SANDER, 1983; TOUW *et al.*, 2015). Os resultados



serão apresentados de duas formas: todas as estruturas interpretadas pelo DSSP serão mostradas em uma tabela, com o valor médio e o desvio padrão das duplicatas; as hélices- $\alpha$ , por serem de especial interesse no presente trabalho, serão apresentadas separadamente em gráficos, mostrando as duplicatas individualmente para se visualizar os diferentes comportamentos em cada simulação.

### 3.6.2. DICROISMO CIRCULAR TEÓRICO

Dados de CD foram empregados para a validação experimental dos resultados obtidos. Este método permite a análise não-destrutiva do conteúdo de estrutura secundária de uma amostra, através da incidência de luz circularmente polarizada em um cromóforo quiral. A absorção diferencial da luz polarizada para a direita e para a esquerda de uma série de cromóforos gera um espectro de CD. Para proteínas, pode-se utilizar a ligação peptídica, que absorve luz na região do ultravioleta distante (240 nm a 180 nm), como cromóforo (KELLY & PRICE, 2000). Há perfis bem definidos para algumas estruturas, como visto na Figura 11, permitindo a análise de mudanças na estrutura secundária da amostra. Hélices- $\alpha$  possuem alguns picos característicos, como uma banda positiva em 190 nm e duas bandas negativas em 208 e 222 nm, sendo as duas primeiras resultantes da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ , e a última da transição  $n \rightarrow \pi^*$ . Como uma das principais características de peptídeos grampeados é o aumento do conteúdo de hélice, a análise do perfil de CD permite avaliar o sucesso dessa metodologia nesse aspecto. Dados experimentais de CD estavam previamente disponíveis para os sistemas estudados (SHIM *et al.*, 2013) e, para os sistemas simulados, foram gerados espectros teóricos de CD através do servidor DichroCalc (BULHELLER & HIRST, 2009). Nos últimos 100 ns de cada simulação, foram selecionadas conformações a cada 10 ns, resultando em 10 conformações por simulação. Tal estratégia partiu da suposição de que a etapa final das simulações seria mais representativa da situação observada experimentalmente. A obtenção de perfis a cada 10 ns foi adotada para evitar possíveis vieses causados pela aferição do perfil de CD apenas para a conformação final de cada simulação.

Todas foram submetidas ao DichroCalc, e foi realizada a média dos espectros obtidos. Após, foi feita a média dos resultados das duplicatas de cada simulação, gerando uma média dos últimos 100 ns para cada sistema em cada campo de força.

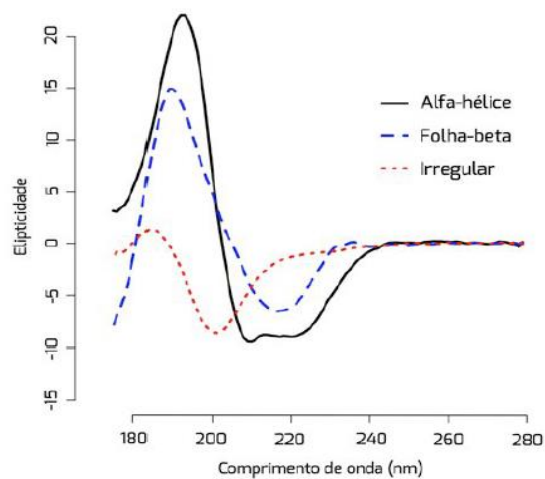


Figura 11 – Perfis de dicroísmo circular de algumas estruturas secundárias. Reproduzido de Lima *et al.*, 2014.

## 4. RESULTADOS

No decorrer do presente trabalho, a seguinte convenção foi seguida: peptídeos partindo de uma conformação de hélice- $\alpha$ , tanto sem grampo quanto grampeados, serão denotados por *CPH*, e partindo de uma conformação desenovelada, *CPD*.

### 4.1. RESULTADOS ESPERADOS

De forma a concordar com os resultados obtidos experimentalmente por Shim e colaboradores, esperam-se os seguintes comportamentos dos peptídeos:

- 1) Peptídeos não-grampeados – devido à perda de estrutura secundária, esses peptídeos devem indicar perda de hélice- $\alpha$ , com altos valores de RMSD e RMSF para *CPH*, baixo conteúdo de hélice (cerca de 25%), diminuição na detecção de hélice- $\alpha$  pelo DSSP e um perfil de CD teórico discordante de hélice- $\alpha$ .
- 2) R5S5 – sendo  $R_{i,i+3}S(8)$  o melhor grampo, em *CPH* o RMSD deve ser baixo, indicando pouca diferença em relação à hélice inicial; o RMSF também deve ser baixo; o conteúdo de hélice e a detecção de hélice- $\alpha$  pelo DSSP devem ser elevados; o perfil de CD teórico deve concordar com o perfil padrão de hélice- $\alpha$ .
- 3) R3S5 – o grampo  $R_{i,i+3}S(6)$  nessa configuração deve ter resultados similares, porém menos intensos do que R5S5.
- 4) R5S3 - o grampo  $R_{i,i+3}S(6)$  nessa configuração deve ter um desempenho similar ou inferior aos peptídeos não-grampeados.

## 4.2. CONSTRUÇÃO DE TOPOLOGIAS

Foram construídas topologias para peptídeos grampeados  $i, i+3$  nos campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7. Inicialmente, foram adaptados parâmetros já existentes para possibilitar a simulação dos peptídeos grampeados. Os resíduos de aminoácidos modificados para a formação do grampo que foram inseridos em cada campo de força estão descritos no Apêndice I. Em todos os casos, os tipos de átomos para a ligação dupla e as cargas utilizadas foram obtidas de topologias de POPG respectivas para cada campo de força.

A metodologia que utilizamos requer o fechamento do grampo diretamente na topologia, unindo as duas cadeias laterais dos aminoácidos modificados com uma ligação entre os carbonos terminais da cadeia lateral de cada resíduo do grampo. Com a adição da ligação unindo os resíduos do grampo, faz-se necessária a adição de outros parâmetros, conectando partes do peptídeo que não interagiriam anteriormente. Tais parâmetros estão descritos no Apêndice II.

O sucesso da construção de cada topologia foi inicialmente avaliado pela capacidade de iniciar a simulação. Existem passos para a verificação da topologia durante as etapas de preparo para a simulação, que será interrompida caso algum parâmetro esteja faltando ou muito inadequado. Após o início da dinâmica, as trajetórias foram analisadas visualmente para verificar a integridade dos peptídeos – parâmetros inadequados podem deformar ligações e a própria estrutura peptídica. Peptídeos que não passaram nestes testes foram reavaliados e corrigidos, enquanto peptídeos que passaram pelos critérios foram considerados adequados e submetidos ao restante das simulações.

## 4.3. COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL DE PEPTÍDEOS

O comportamento conformacional dos peptídeos simulados foi avaliado através de análises realizadas nas trajetórias resultantes das simulações por DM. Avaliou-se a diferença das estruturas resultantes à estrutura de referência,

a flexibilidade dos resíduos e a composição da estrutura secundária. Os resultados serão apresentados considerando em conjunto peptídeos não-grampeados e grampeados separados por tipo de grampo, sendo que os primeiros funcionam como controle para as simulações seguintes. Os 100 ns iniciais de cada conjunto de simulações foram considerados como um período de acomodação e não serão apresentados.

A Figura 12 mostra o RMSD calculado para o esqueleto peptídico dos peptídeos *CPH* e *CPD* não-grampeados. Para *CPH*, todos os campos de força mostram variações entre 0,4 e 0,7 nm a partir dos 200 ns. Verifica-se que as simulações com o AMBER99SB-ILDN variam amplamente; simulações com o CHARMM36 mantêm um RMSD mais baixo até a faixa dos 200 ns, quando aumentam e se estabilizam em torno de 0,6 nm; e simulações com o GROMOS54a7 geram valores de RMSD que crescem progressivamente, terminando a simulação com valores mais elevados de RMSD. Para *CPD*, os peptídeos não-grampeados variam na mesma faixa elevada de RMSD, chegando nesta antes dos 100 ns e permanecendo na mesma até o final das simulações.

Isoladamente, o RMSD é pouco informativo nesse caso. Em todas as simulações com peptídeos não-grampeados, a diferença entre as conformações geradas durante a simulação e a estrutura inicial, seja *CPH* ou *CPD*, mostrou-se elevada, indicando que os átomos do esqueleto peptídico variam de posição, podendo indicar perda de estrutura secundária e portanto concordando com os resultados esperados.

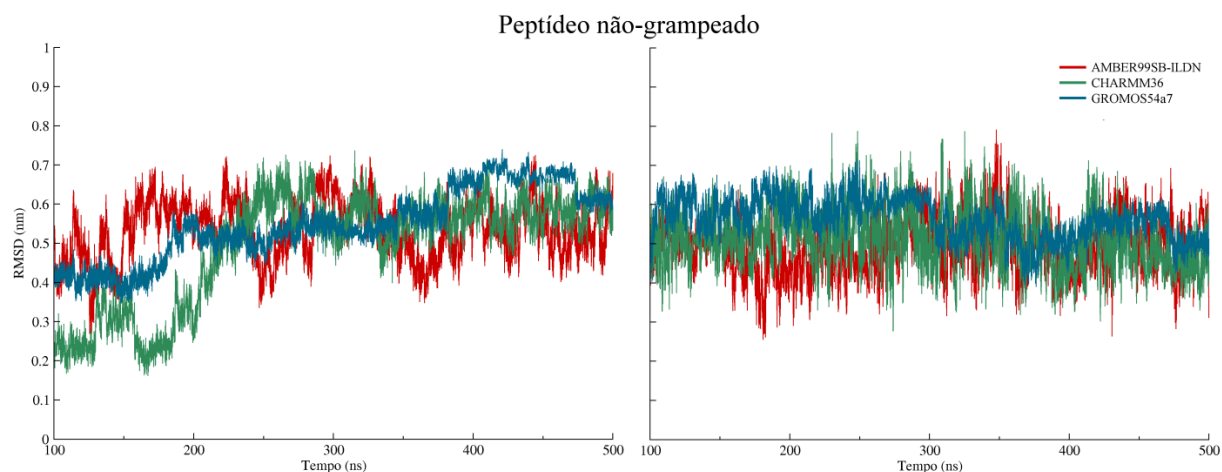


Figura 12 – RMSD do esqueleto peptídico de peptídeos não-grameados *CPH* (à esquerda) e *CPD* (à direita).

Análises de RMSD do esqueleto peptídico de R3S5 nos três campos de força mostram que as simulações com o GROMOS54a7 mantêm os valores de RMSD mais baixos, mas ainda bastante variáveis. Com os peptídeos *CPD*, os valores de RMSD permanecem na mesma faixa elevada, de 0,4 a 0,6 nm (Figura 13).

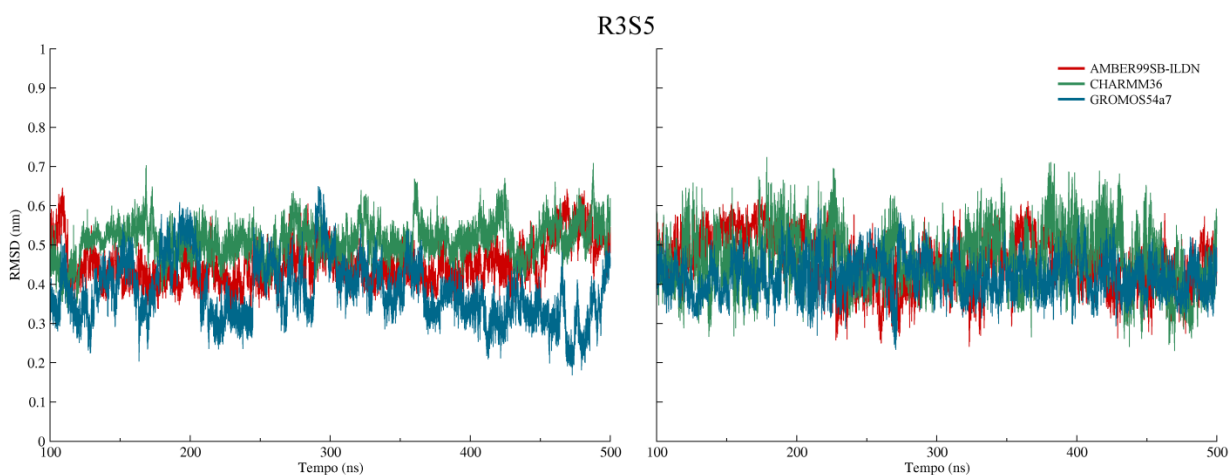


Figura 13 - RMSD do esqueleto peptídico de peptídeos R3S5 *CPH* (à esquerda) e *CPD* (à direita).

Os peptídeos R5S3 simulados nos três campos de força mostram a mesma faixa elevada de RMSD para as duas conformações de partida, sem

diferenças notáveis entre as simulações (Figura 14). O mesmo é observado nos peptídeos R5S5 (Figura 15).

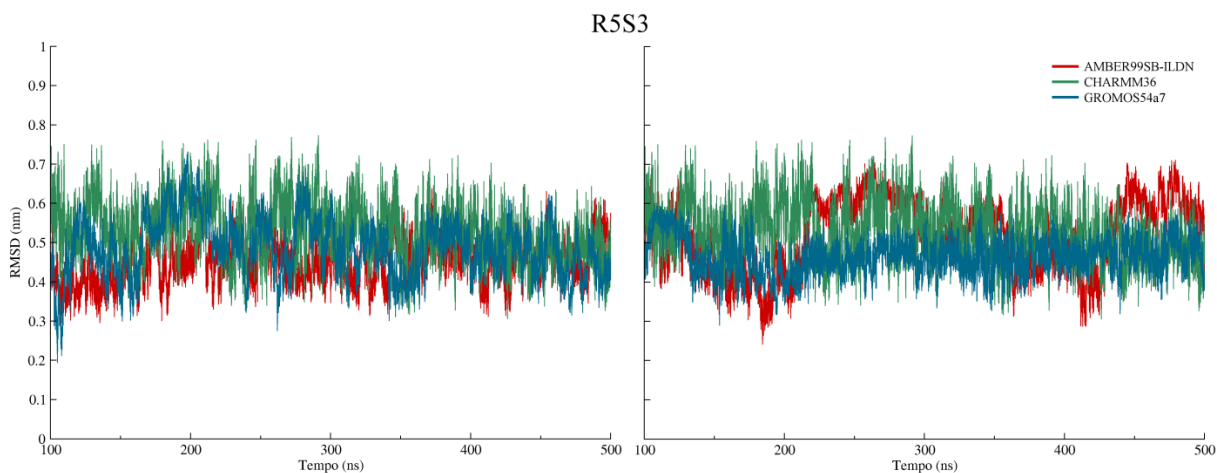


Figura 14 - RMSD do esqueleto peptídico de peptídeos R5S3 *CPH* (à esquerda) e *CPD* (à direita).

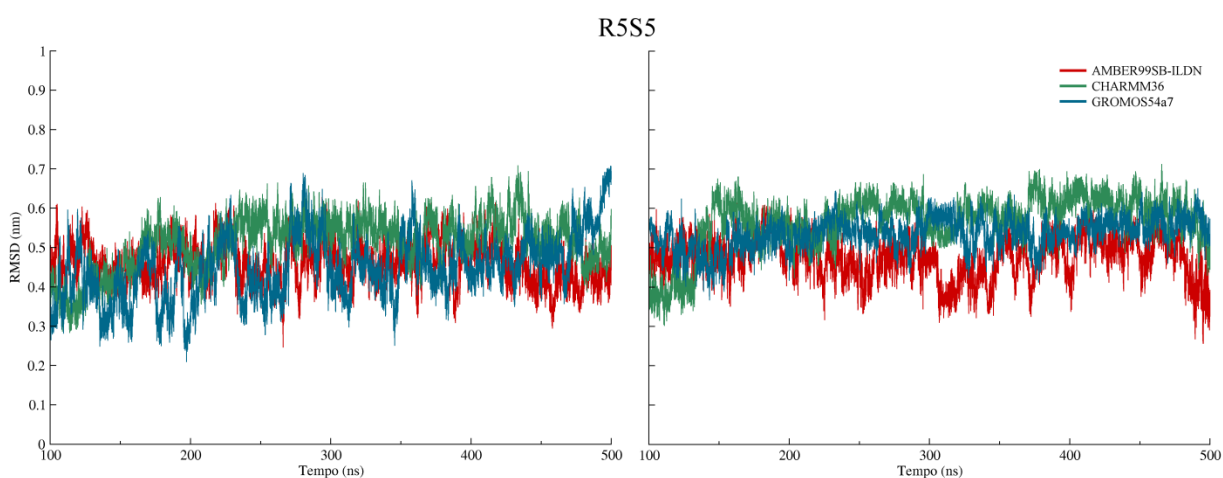


Figura 15 - RMSD do esqueleto peptídico de peptídeos R5S5 *CPH* (à esquerda) e *CPD* (à direita).

De maneira geral, todos os peptídeos *CPH* e *CPD* mostraram altos valores de RMSD, comparáveis aos obtidos com os peptídeos não-grameados, exceto R3S5 simulado com o GROMOS54a7. No entanto, os valores de RMSD, por serem elevados, não são informativos por si só.

Análises de RMSF por resíduo dos peptídeos *CPH* e *CPD* são mostradas na Figura 16. As simulações dos peptídeos *CPH* não-grampeados nos campos de força *all-atom* tiveram resíduos mais flexíveis do que no GROMOS54a7. A mesma análise para *CPD* mostra uma menor diferença entre os campos de força utilizados. Consistentemente, as alaninas nos resíduos 3 e 12 aparecem como os resíduos menos flexíveis em todas as simulações. No entanto, os valores de RMSF para todos os campos de força são elevados, podendo indicar perda de estrutura secundária e concordando com os resultados esperados.

Os peptídeos grampeados R3S5 simulados com o AMBER99SB-ILDN e o GROMOS54a7 obtiveram um RMSF menor do que os simulados com o CHARMM36, especialmente para os peptídeos *CPH*. Já os peptídeos R5S3 não apresentam diferenças evidentes entre as simulações de diferentes campos de força, exceto nos peptídeos *CPD* simulados com o AMBER99SB-ILDN, a partir do resíduo 7. Para os peptídeos R5S5, este campo de força parece gerar menor flutuação para os peptídeos *CPH*, mas em *CPD* os resíduos 4 e 5, participantes do grampo, flutuam bastante.

Em geral, apenas alguns campos de força mostraram menor flutuação para os resíduos próximos ou englobados pelo grampo olefínico, em especial os simulados com o AMBER99SB-ILDN e o GROMOS54a7. O RMSF dos peptídeos grampeados *CPH* simulados com o CHARMM36 possui valores idênticos à versão não-grampeada. O peptídeo R5S3, que deve ter um desempenho inferior ao peptídeo não-grampeado na manutenção de hélice- $\alpha$  e portanto deve flutuar mais nos peptídeos *CPH*, teve tal desempenho no GROMOS54a7. No entanto, a maior flexibilidade por si só não confirma tendências a perda de estrutura secundária.



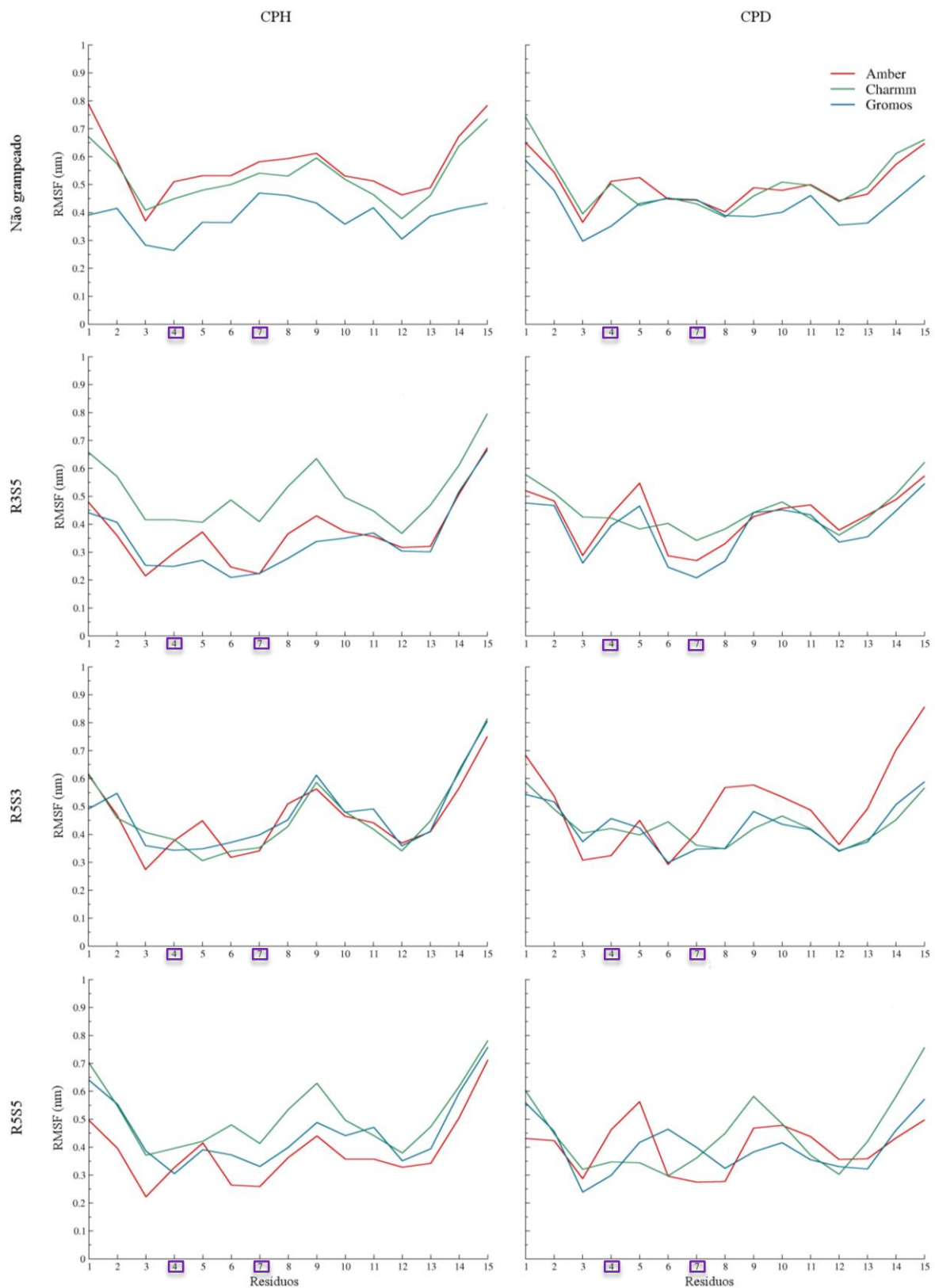


Figura 16 – RMSF de peptídeos *CPH* e *CPD* não-grampeados e grampeados para os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7, a partir dos 100ns de simulação. Os resíduos onde há a inserção do grupo estão destacados em violeta.

A avaliação de conteúdo de hélice indica a porcentagem de tempo em que cada resíduo foi detectado como hélice- $\alpha$ , feita apenas para *CPH* (Figura 17). Para os peptídeos não-grampeados, o GROMOS54a7 mostrou uma média de tempo em conformação de hélice- $\alpha$  similar ao dado experimental (26,2% e 25%, respectivamente), enquanto o AMBER99SB-ILDN e o CHARMM36 tiveram, em média, 8,5% e 18,6%, respectivamente.

A análise de conteúdo de hélice das simulações do peptídeo R3S5 mostra uma média de tempo em conformação de hélice de 13,5%, 5,6% e 45,9% para os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7, respectivamente. Quando comparado ao peptídeo não-grampeado, nota-se um grande aumento no conteúdo de hélice das simulações com o GROMOS54a7, com grande parte dos resíduos adotando esta conformação por mais de metade do tempo de simulação. As simulações dos peptídeos R5S3 resultaram em médias de 13,6%, 2,8% e 19,6% para os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7, respectivamente. Já as simulações dos peptídeos R5S5 obtiveram porcentagens de 14,8%, 11,7% e 26,4%.

Comparados ao peptídeo não modificado, as simulações com o AMBER99SB-ILDN e com o GROMOS54a7 mostram uma porcentagem média de resíduos em conformação de hélice- $\alpha$  mais expressiva. Nota-se que, em todas as simulações de peptídeos grampeados com o AMBER99SB-ILDN, há uma baixa porcentagem de tempo em conformação de hélice- $\alpha$  dos resíduos 5 e 6, adjacentes ao grampo, e picos nos resíduos 4 e 7, onde houve a inserção do grampo. Em combinação com os dados de RMSD e RMSF, podemos inferir que as simulações com o AMBER99SB-ILDN mostraram altos valores de RMSD e RMSF devido à perda de conteúdo de hélice- $\alpha$ , permitindo a correlação da diferença da estrutura de referência e da alta flexibilidade dos resíduos com a perda de estrutura secundária. As simulações de peptídeos grampeados com o CHARMM36 não mostram aumento de conteúdo de hélice em comparação ao peptídeo não modificado.

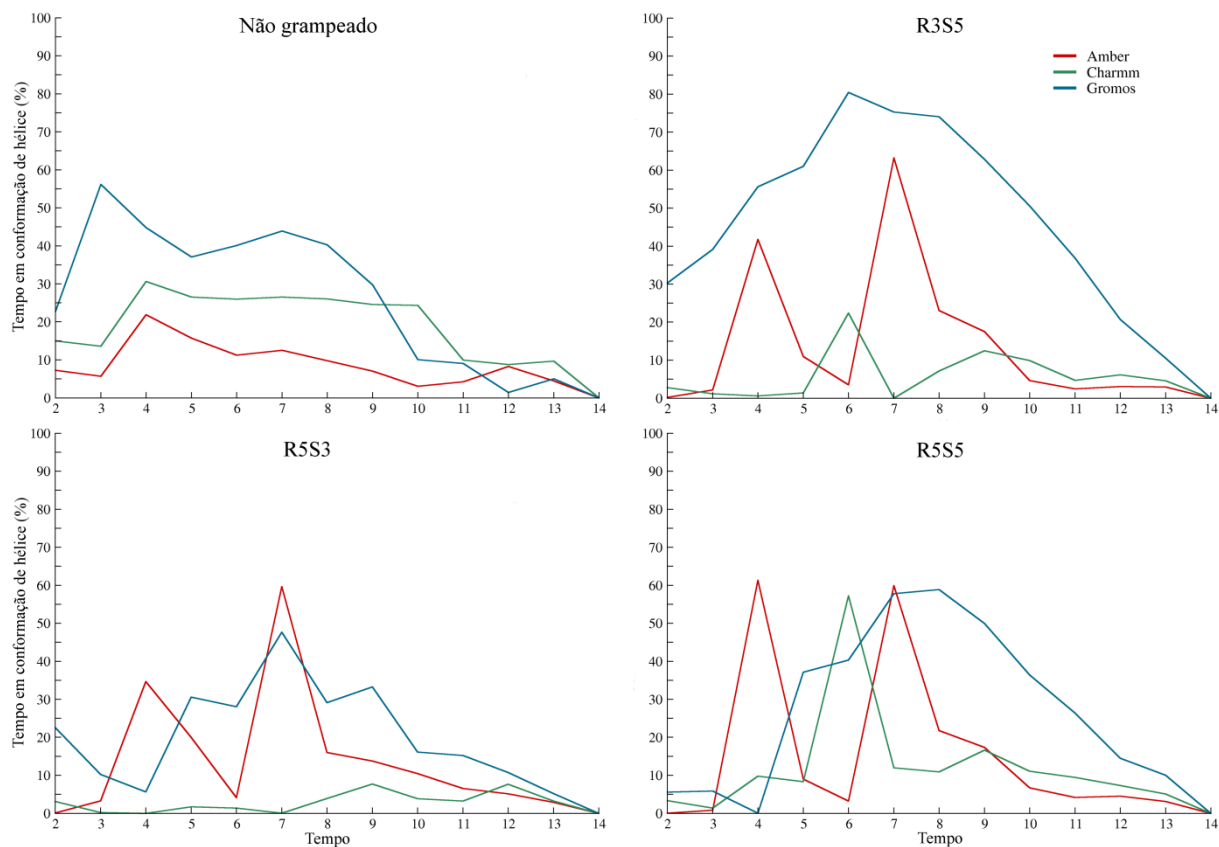


Figura 17 – Conteúdo de hélice de peptídeos *CPH* não-grampeados e grampeados para os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7, a partir dos 100ns de simulação.

A análise de DSSP indica a diversidade e evolução de estrutura secundária no decorrer da simulação. A Tabela 4 mostra a média dos valores encontrados nas duplicatas para cada estrutura definida pelo DSSP para *CPH*. Em todos os peptídeos não-modificados, nota-se a prevalência de estruturas desenoveladas (*coil*). Os peptídeos não-grampeados simulados com o AMBER99SB-ILDN possuem, em média, poucos resíduos classificados como hélice- $\alpha$ , com maior prevalência de voltas (*turns*) e *bends*, enquanto há maior abundância de resíduos detectados como hélice- $\alpha$  no CHARMM36 e no GROMOS54a7. Comparados ao peptídeo não-grampeado, os peptídeos grampeados simulados no campo de força AMBER99SB-ILDN mostraram incrementos em motivos de volta (*turn*), hélice- $\alpha$  ( $\alpha$ -*helix*) e hélices- $3_{10}$  ( $3_{10}$ -*helix*). A presença de hélices- $3_{10}$  pode indicar a continuidade de uma hélice entre os resíduos do grampo, se esta estrutura for encontrada nos resíduos 5 e

6, que ficam pouco tempo em conformação de hélice- $\alpha$ . As análises de estrutura secundária com o DSSP para o campo de força CHARMM36 mostram que os peptídeos grampeados *CPH* tiveram um aumento de estrutura desenovelada (*coil*), *bends* e voltas (*turns*), além de R5S5 ter um aumento de hélices- $3_{10}$ . Os peptídeos grampeados simulados com o GROMOS54a7 exibiram comportamentos bastante diferentes entre si: R3S5 teve incremento em hélice- $\alpha$ , R5S3 em *coil*, folhas- $\beta$ , *bends* e voltas, e R5S5 em *coil* e hélice- $\alpha$ .

A análise de DSSP das simulações de *CPD* está indicada pela Tabela 5. Para os peptídeos não-grampeados, há prevalência de estruturas desenoveladas e baixa detecção de hélice- $\alpha$ , em especial no CHARMM36. Todos os campos de força foram capazes de permitir a formação de uma a duas voltas de hélices- $\alpha$  a partir da conformação de partida desenovelada. No AMBER99SB-ILDN, houve picos de detecção de hélice- $\alpha$  para cada simulação; no CHARMM36, houve baixa detecção de hélice- $\alpha$ ; no GROMOS54a7, uma simulação foi capaz de manter pelo menos uma volta por 200 ns. Tais resultados sugerem que, partindo de uma conformação desenovelada, o peptídeo não-modificado não tem facilidade para a manutenção de hélice- $\alpha$  em solução. Os peptídeos grampeados simulados no campo de força AMBER99SB-ILDN mostraram incrementos em motivos de volta (*turn*), hélice- $\alpha$  ( $\alpha$ -*helix*) e hélices- $3_{10}$  ( $3_{10}$ -*helix*) quando comparados a sua versão não-grampeada. Nas simulações com o CHARMM36, há incremento de voltas em todos os peptídeos grampeados, de *bend* em R3S5 e R5S3, e de hélice- $\alpha$  e hélices- $3_{10}$  em R5S5. Nos peptídeos simulados com o GROMOS54a7, vemos R3S5 mais hélice- $\alpha$  e hélices- $3_{10}$ , R5S3 com incrementos em voltas, hélices- $\alpha$  e hélices-pi ( $\pi$ -*helix*), e R5S5 com maior conteúdo de folhas- $\beta$ ,  $\beta$ -*bridges* e *bends*.

Tabela 4 - DSSP médio de todas as estruturas para cada campo de força, com os peptídeos *CPH*. Média  $\pm$  desvio padrão.

	Peptídeos não-grampeados			AMBER99SB-ILDN			CHARMM36			GROMOS54a7		
	AMBER99 SB-ILDN	CHARMM 36	GROMOS 54a7	R3S5	R5S3	R5S5	R3S5	R5S3	R5S5	R3S5	R5S3	R5S5
<i>Coil</i>	8,0 $\pm$ 2,4	7,6 $\pm$ 3,9	5,4 $\pm$ 1,9	6,6 $\pm$ 1,1	6,8 $\pm$ 1,5	6,7 $\pm$ 1,2	9,0 $\pm$ 2,1	9,1 $\pm$ 1,9	9,0 $\pm$ 3,1	4,8 $\pm$ 1,4	6,3 $\pm$ 2,0	7,1 $\pm$ 2,0
<i><math>\beta</math>-sheet</i>	0,2 $\pm$ 0,9	0,2 $\pm$ 0,9	0,1 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,2
<i><math>\beta</math>-bridge</i>	0,1 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,3
<i>Bend</i>	2,0 $\pm$ 1,5	1,1 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 1,5	1,1 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 1,5	2,7 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 1,5	0,8 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 2,0	1,8 $\pm$ 1,8
<i>Turn</i>	2,6 $\pm$ 2,1	1,1 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 1,8	4,4 $\pm$ 1,5	4,3 $\pm$ 1,9	3,9 $\pm$ 1,4	2,0 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 1,5	1,3 $\pm$ 1,7	0,8 $\pm$ 1,4	2,3 $\pm$ 1,9	1,0 $\pm$ 1,4
<i><math>\alpha</math>-helix</i>	1,1 $\pm$ 2,3	3,8 $\pm$ 4,6	4,0 $\pm$ 3,8	1,2 $\pm$ 2,0	1,7 $\pm$ 2,3	1,9 $\pm$ 2,2	0,4 $\pm$ 1,8	0,3 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 3,2	8,5 $\pm$ 2,6	3,4 $\pm$ 3,5	4,9 $\pm$ 3,0
<i><math>\pi</math>-helix</i>	0,0 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 2,6	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 1,3	0,0 $\pm$ 0,1
<i>3<sub>10</sub>-helix</i>	0,9 $\pm$ 1,6	0,2 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 1,6	1,1 $\pm$ 1,6	1,3 $\pm$ 1,6	0,1 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,6

Tabela 5 – DSSP médio para todas as estruturas para cada campo de força, com os peptídeos *CPD*. Média  $\pm$  desvio padrão.

	Peptídeos não-grampeados			AMBER99SB-ILDN			CHARMM36			GROMOS54a7		
	AMBER99 SB-ILDN	CHARMM 36	GROMOS 54a7	R3S5	R5S3	R5S5	R3S5	R5S3	R5S5	R3S5	R5S3	R5S5
<i>Coil</i>	8,6 $\pm$ 2,6	10,2 $\pm$ 2,3	8,4 $\pm$ 2,5	6,7 $\pm$ 1,6	6,5 $\pm$ 1,4	6,1 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 1,7	9,5 $\pm$ 1,7	7,3 $\pm$ 2,8	6,3 $\pm$ 1,5	6,4 $\pm$ 1,9	8,0 $\pm$ 1,9
<i><math>\beta</math>-sheet</i>	0,0 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,9	0,5 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 1,6
<i><math>\beta</math>-bridge</i>	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,9
<i>Bend</i>	2,5 $\pm$ 1,6	2,4 $\pm$ 1,6	2,9 $\pm$ 1,7	1,5 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 1,3	1,1 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 1,7	2,9 $\pm$ 1,6	1,0 $\pm$ 1,5	1,1 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 2,1	4,4 $\pm$ 1,7
<i>Turn</i>	2,4 $\pm$ 2,1	0,9 $\pm$ 1,2	1,4 $\pm$ 1,7	4,1 $\pm$ 2,0	3,5 $\pm$ 2,0	2,9 $\pm$ 1,8	1,4 $\pm$ 1,5	1,4 $\pm$ 1,4	1,9 $\pm$ 1,6	1,2 $\pm$ 1,6	2,4 $\pm$ 1,9	1,1 $\pm$ 1,5
<i><math>\alpha</math>-helix</i>	0,7 $\pm$ 1,9	0,1 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 2,7	0,9 $\pm$ 1,8	1,6 $\pm$ 2,5	4,0 $\pm$ 2,9	0,1 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 3,8	6,2 $\pm$ 2,7	3,3 $\pm$ 3,2	0,0 $\pm$ 0,2
<i><math>\pi</math>-helix</i>	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 1,3	0,0 $\pm$ 0,0
<i>3<sub>10</sub>-helix</i>	0,6 $\pm$ 1,4	0,1 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 1,8	1,8 $\pm$ 2,0	0,8 $\pm$ 1,5	0,1 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,9	0,1 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,4

Na Figura 18, apenas a média corrida de hélices- $\alpha$  está representada, com o conteúdo de hélice explícito para cada uma das simulações independentes, partindo de velocidades iniciais diferentes. Para os peptídeos não-grampeados, o número de resíduos em hélice- $\alpha$  das simulações com o AMBER99SB-ILDN oscila até o final, mantendo até duas voltas de hélice nos primeiros 100 ns em uma das simulações, enquanto a outra mostra no máximo uma volta de hélice, com frequentes perdas totais dessa estrutura, o que pode explicar o caráter oscilatório do RMSD e a alta flexibilidade observada no RMSF, concordando com os resultados esperados; no CHARMM36, o número de resíduos em hélice- $\alpha$  do peptídeo *CPH* se mantém alto até os 200 ns, caindo em seguida e não sendo mais detectado até o final da simulação, com exceção de dois picos até os 300 ns em uma das simulações. Isso condiz com o RMSD baixo até os 200 ns de simulação, e, junto com a alta flexibilidade observada no RMSD, confirma a perda de estrutura secundária. Por sua vez, o peptídeo *CPD* falhou em obter a estrutura de hélice durante a simulação; no GROMOS54a7, o número de resíduos em hélice- $\alpha$  chega a até três voltas de hélice, mas oscila e cai progressivamente no decorrer da simulação, terminando apenas uma das simulações com uma volta de hélice- $\alpha$ . A diminuição do conteúdo de hélice- $\alpha$  a partir dos 400 ns coincide com o aumento de RMSD observado, e a maior quantidade de hélice, combinada com a porcentagem de tempo em que cada resíduo passa nessa conformação, ajudam a explicar o RMSF mais baixo. Os resultados do peptídeo *CPH* no GROMOS54a7 ficaram ambíguos, com ausência de hélice- $\alpha$  no final de uma das simulações e presença em outra. Os peptídeos *CPD* perdem a conformação aos 250 ns, não conseguindo recuperá-la.

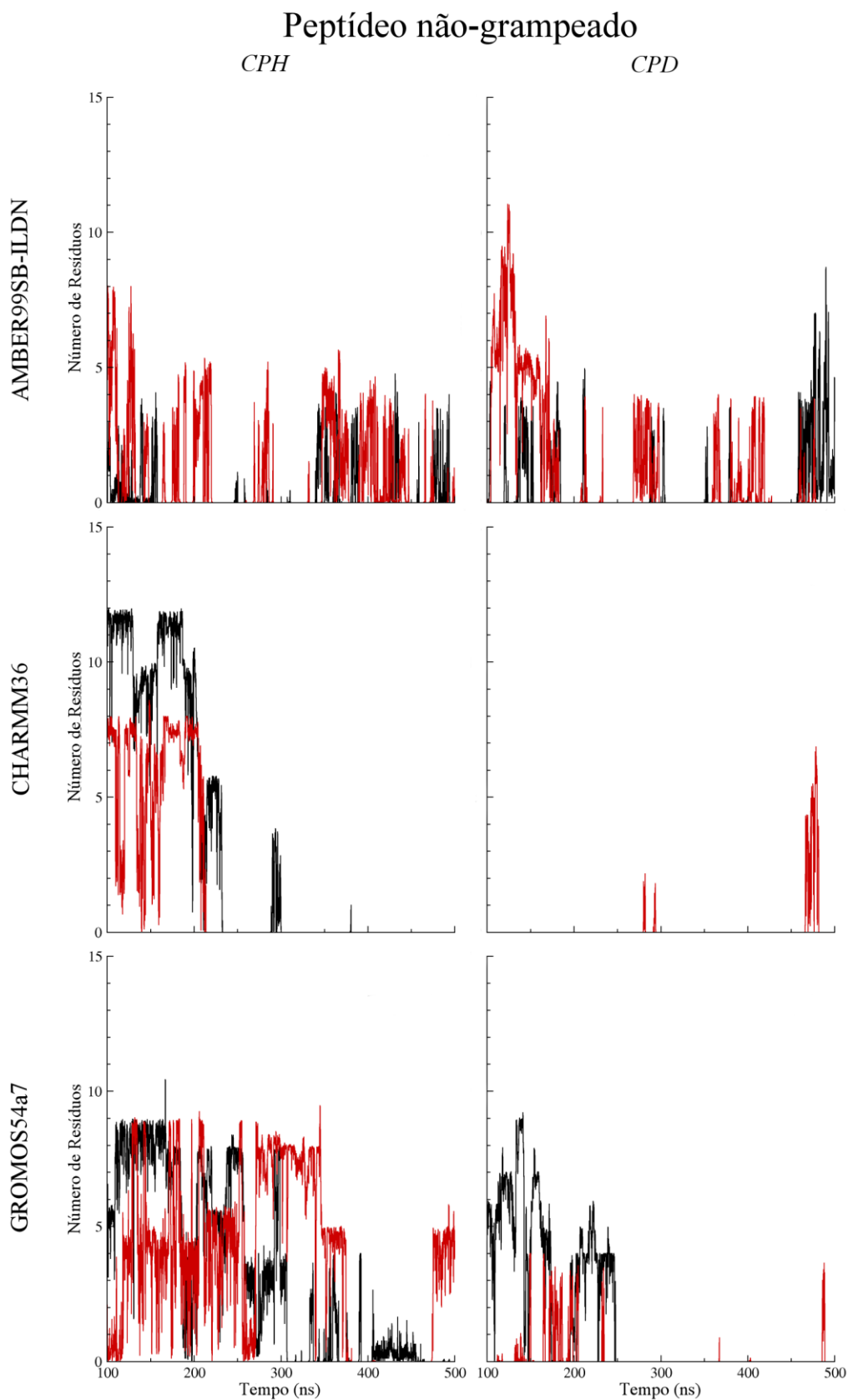


Figura 18 – Análise de DSSP exclusiva para hélice- $\alpha$  nos peptídeos não-grampeados *CPH* e *CPD* com os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7. Replicatas para o mesmo peptídeo são mostradas em preto (simulação 1) e vermelho (simulação 2).



As análises do componente de hélice- $\alpha$  para *CPH* e para *CPD* dos peptídeos R3S5 mostradas para cada simulação (Figura 19) evidenciam uma intensa flutuação no decorrer das simulações com o AMBER99SB-ILDN. Os peptídeos foram capazes de readquirir pelo menos 4 resíduos de hélice- $\alpha$ , indicando uma volta completa. A análise dos peptídeos simulados com o CHARMM36 mostra pouca prevalência de hélices, com o peptídeo *CPH* perdendo toda a conformação de hélice- $\alpha$  antes dos 200 ns e não sendo capaz de recuperá-la, e o peptídeo *CPD* falhando na obtenção da estrutura de hélice- $\alpha$ , exceto por raros e efêmeros picos de detecção. No GROMOS54a7, o peptídeo *CPH* manteve-se com duas a três voltas de hélice na maior parte da simulação, poucas vezes caindo a uma ou zero voltas de hélice nas duas simulações. A queda no conteúdo de hélice- $\alpha$  próxima aos 200 ns coincide com um aumento do RMSD. Para os peptídeos *CPD*, o GROMOS54a7 foi capaz de adquirir a conformação de hélice- $\alpha$  e de mantê-la por uma ou duas voltas durante a maior parte das simulações.

A análise exclusiva para hélice- $\alpha$  para os peptídeos R5S3 (Figura 20) mostra um ligeiro aumento de RMSD do peptídeo *CPD* simulado com o AMBER99SB-ILDN aos 250 ns, podendo estar relacionado com uma correspondente queda na detecção de hélice- $\alpha$ . Simulações com o CHARMM36 mostram pouca prevalência de hélices, com o peptídeo R5S3 tendo raros momentos em que alguns resíduos são interpretados como hélice- $\alpha$ . No GROMOS54a7, o peptídeo *CPH* comportou-se de maneiras distintas nas duas simulações, perdendo a conformação de hélice- $\alpha$  em uma e mantendo-a em outra, enquanto os peptídeos *CPD* foram capazes de obter e manter a conformação de hélice- $\alpha$ , mas em um nível mais baixo do que R3S5 no mesmo campo de força.

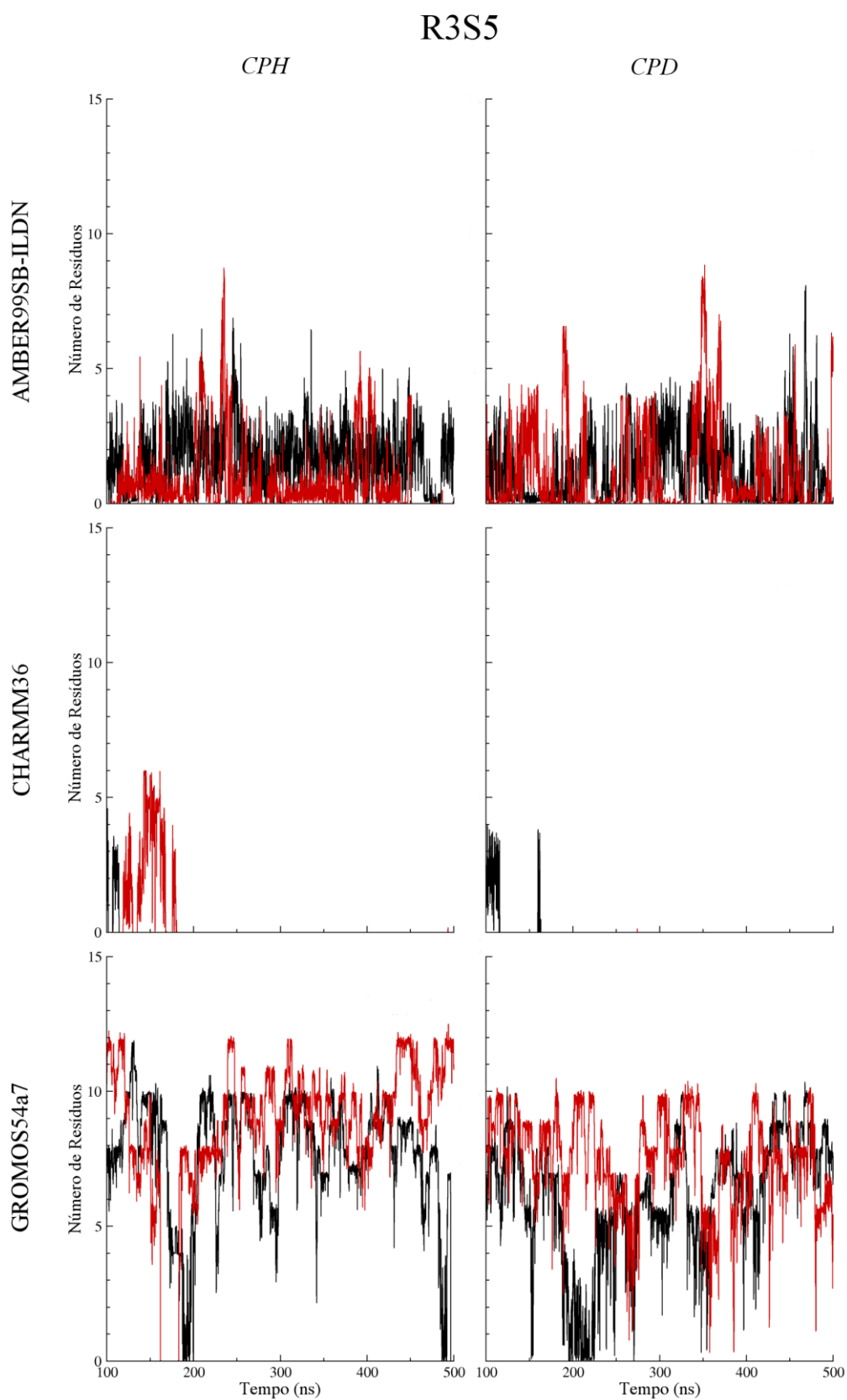


Figura 19 - Análise de DSSP exclusiva para hélice- $\alpha$  nos peptídeos R3S5 *CPH* e *CPD* com os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7. Replicatas para o mesmo peptídeo são mostradas em preto (simulação 1) e vermelho (simulação 2).

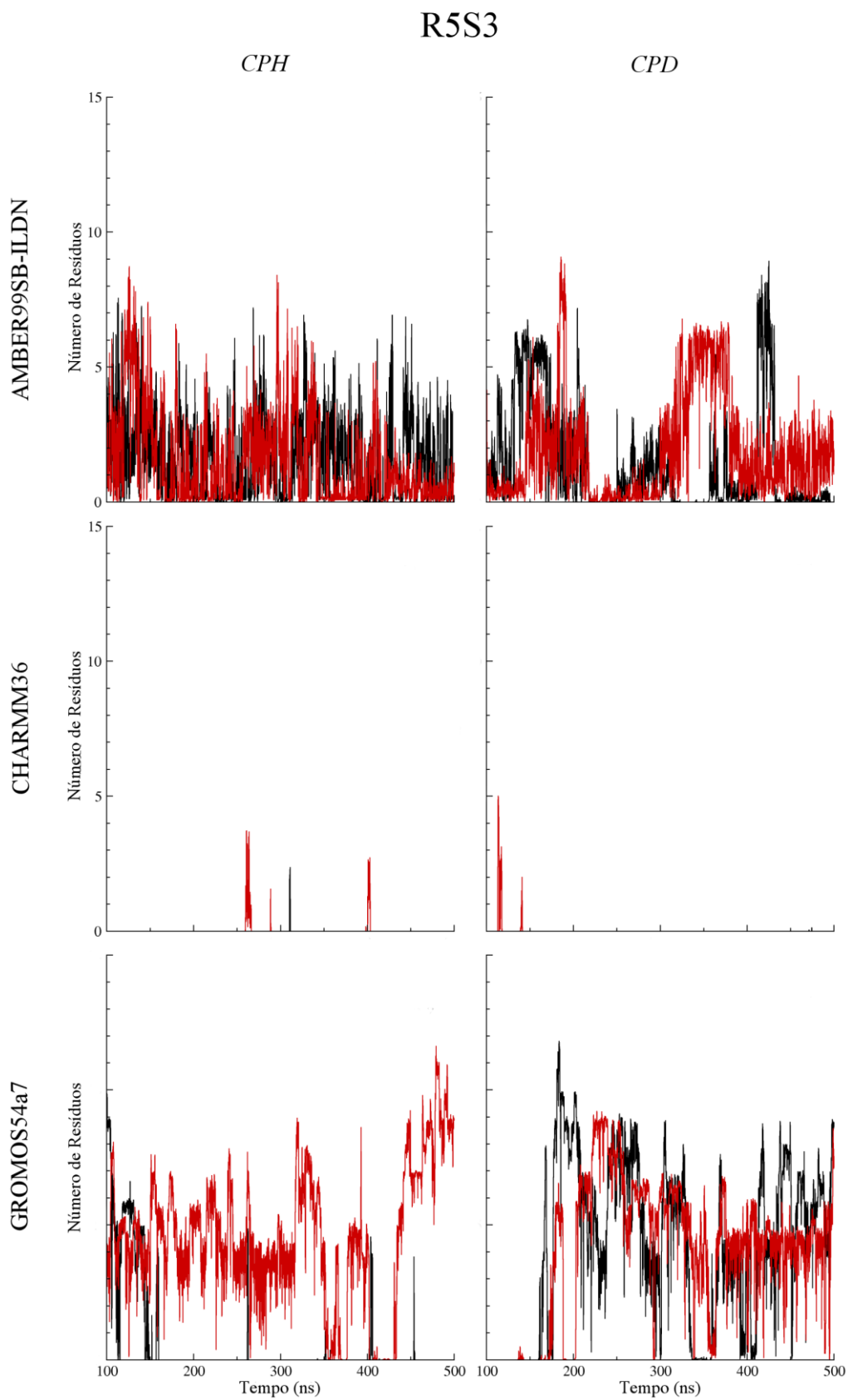


Figura 20 - Análise de DSSP exclusiva para hélice- $\alpha$  nos peptídeos R5S3 *CPH* e *CPD* com os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7. Replicatas para o mesmo peptídeo são mostradas em preto (simulação 1) e vermelho (simulação 2).

Os peptídeos R5S5 (Figura 21) simulados com o AMBER99SB-ILDN foram capazes de manter e adquirir a conformação de hélice- $\alpha$ . Os peptídeos *CPH* simulados com o CHARMM36 mostram pouca prevalência de hélices, sendo capazes de manter sua conformação até por volta dos 200 ns, só conseguindo recuperá-la no final de uma das simulações, mas tendo um desempenho similar ao peptídeo não-grampeado. Apenas um dos peptídeos *CPD* é capaz de obter e manter a estrutura de uma volta de hélice- $\alpha$  por toda a simulação. Isso pode se correlacionar com o valor ligeiramente mais alto de RMSD, estabilizando-se por volta dos 150 ns, coincidindo com a estabilização da hélice- $\alpha$ . O RMSF ligeiramente maior nos resíduos 8 e 9, próximos ao grampo, pode indicar que a hélice se forma ali, aumentando a flutuação desses resíduos anteriormente desenovelados. Com o GROMOS54a7, o peptídeo *CPH* manteve pelo menos uma volta de hélice- $\alpha$  durante a maior parte da simulação, enquanto *CPD* não foi capaz de adquirir essa conformação, com a exceção de efêmeros momentos durante as simulações, e se correlaciona com um maior valor de RMSD.

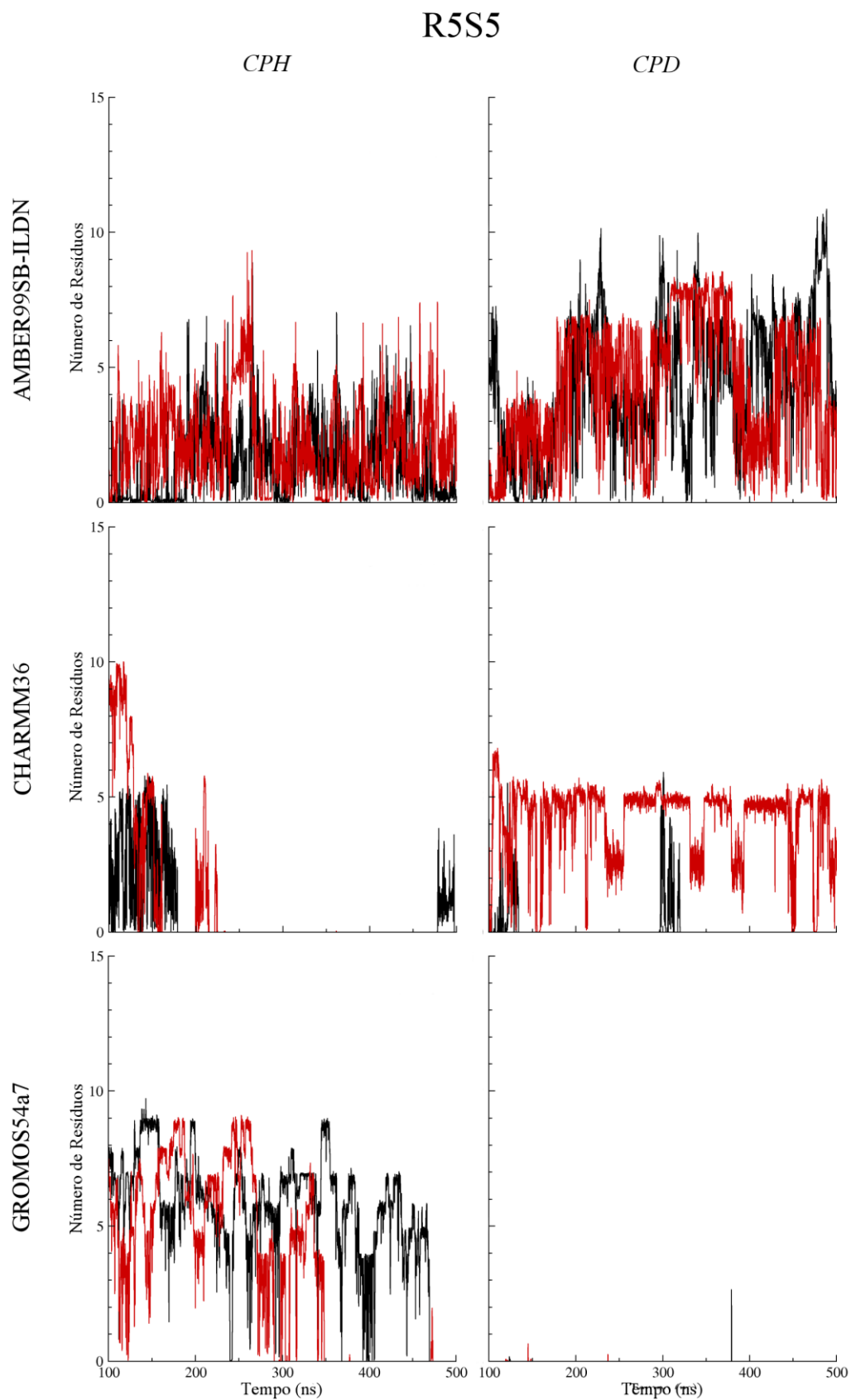


Figura 21 - Análise de DSSP exclusiva para hélice- $\alpha$  nos peptídeos R5S5 *CPH* e *CPD* com os campos de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7. Replicatas para o mesmo peptídeo são mostradas em preto (simulação 1) e vermelho (simulação 2).

A presença de hélice- $\alpha$  detectada pelo DSSP é muito similar entre todos os peptídeos grampeados simulados com o AMBER99SB-ILDN, assim como o perfil de conteúdo de hélice- $\alpha$  por resíduo, indicando que as duas análises mostram o mesmo comportamento. Além disso, neste campo de força, todos os peptídeos grampeados possuem hélices por mais tempo do que o peptídeo não-grampeado. No CHARMM36, os peptídeos com menor abundância de hélice- $\alpha$  detectada pelo DSSP coincidem com menor conteúdo de hélice- $\alpha$  detectado pelo *g\_helix*. Para o GROMOS54a7, R3S5 obteve os maiores valores nas duas análises, seguido pelo peptídeo não-grampeado, R5S3 e R5S5. O DSSP detectou maior quantidade de hélice- $\alpha$  durante as simulações com R5S5 do que para R5S3, que inclusive apenas mantém a conformação de hélice- $\alpha$  em uma simulação. No entanto, a análise do conteúdo de hélice de R5S5 tem sua média reduzida pela não-detecção do resíduo 4 como hélice- $\alpha$  em nenhum ponto da simulação.

Os peptídeos *CPD* não possuem correspondentes na análise pelo *g\_helix*. Analisando somente o DSSP, as simulações de todos os peptídeos grampeados simulados com o AMBER99SB-ILDN mostraram a capacidade de formar hélices- $\alpha$ ; com o CHARMM36, apenas o peptídeo R5S5; e com o GROMOS54a7, apenas o peptídeo R5S5 não foi capaz de fazê-lo.

#### 4.4. DICROISMO CIRCULAR TEÓRICO E EXPERIMENTAL

O dicroísmo circular teórico calculado pelo servidor DichroCalc para os peptídeos não-grampeados simulados nos três campos de força é mostrado na Figura 22. Os perfis das estruturas iniciais *CPH* e *CPD* e o perfil obtido experimentalmente por Shim e colaboradores (2013) foram incluídos para comparação. Nota-se que nenhum dos campos de força mostra perfil de CD de hélice, que teria um pico positivo em 190 nm e duas bandas negativas em 208 e 222 nm. Da mesma forma, se percebe que a estrutura inicial, uma conformação de hélice- $\alpha$  perfeita, também não possui a banda a 222 nm. O CD calculado experimentalmente (SHIM *et al.*, 2013) também não mostra perfil de hélice, mas não se aproxima de nenhum dos perfis aqui representados.

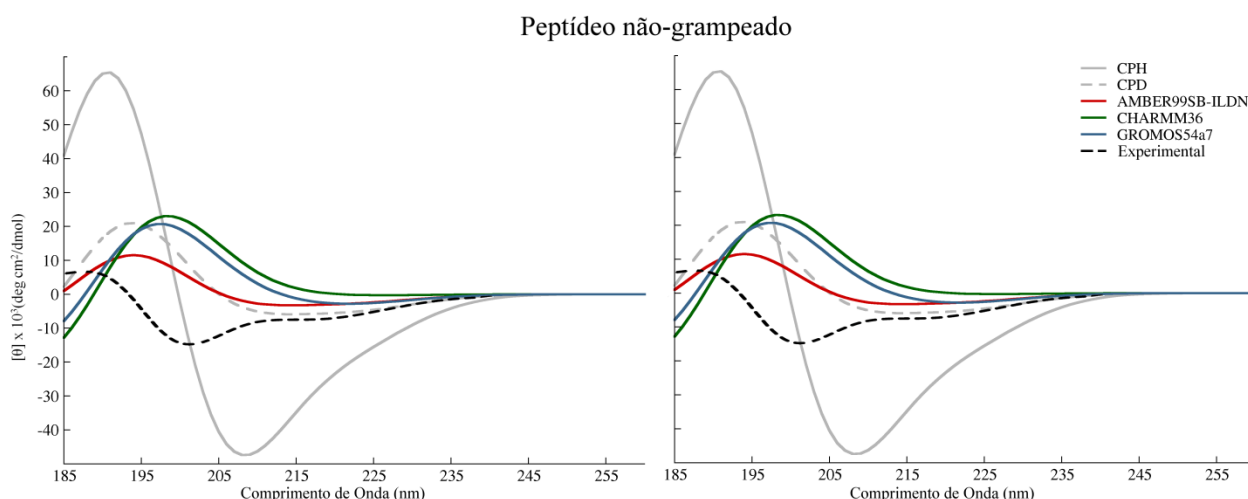


Figura 22 – Dicroísmo circular teórico nos campo de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7 para os peptídeos não-grampeados (A) *CPH* e (B) *CPD*. O perfil obtido experimentalmente por Shim *et al.* (Experimental) e os perfis para as estruturas iniciais *CPH* e *CPD* são mostrados para comparação.

Para as simulações dos peptídeos R3S5 *CPH* e *CPD* (Figura 23), os perfis de CD teórico mostram um pico a 190 nm nas simulações com os campos de força AMBER99SB-ILDN e GROMOS54a7, condizente com hélices- $\alpha$ , enquanto as simulações com o CHARMM36 não possuem esse perfil. A síntese desses peptídeos por Shim e colaboradores (2013) obteve dois perfis distintos, que provavelmente diferem apenas na configuração cis ou trans na ligação dupla. Nota-se que cada campo de força se aproxima de um perfil diferente.

Os perfis teóricos calculados para os peptídeos R5S3 não concordam com os obtidos experimentalmente em nenhum caso, com o AMBER99SB-ILDN e o GROMOS54a7 inclusive superestimando a presença de hélices (Figura 24).

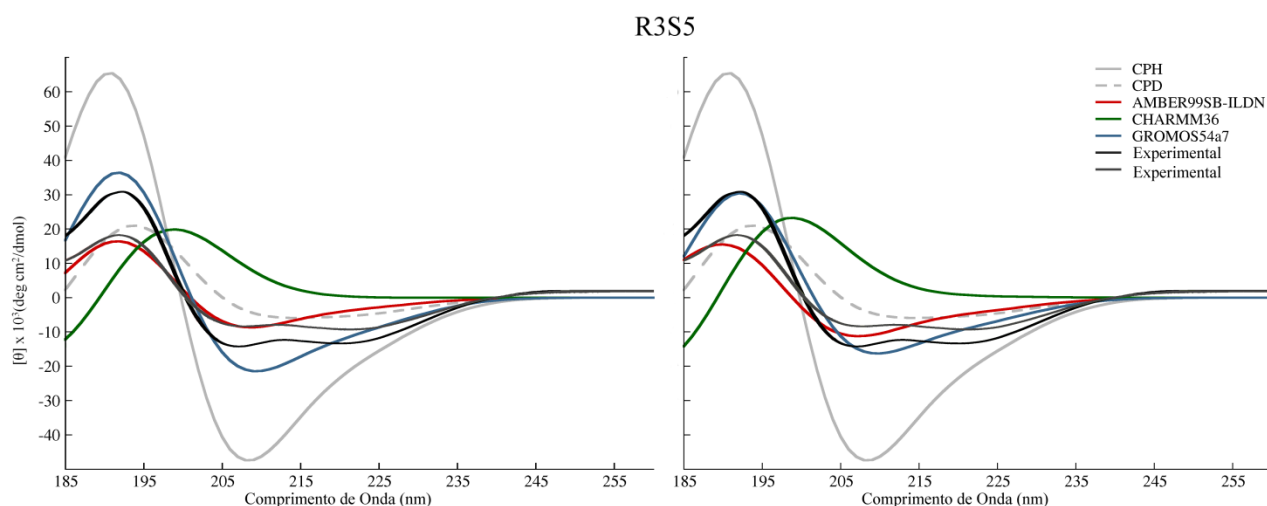


Figura 23 – Dicroísmo circular teórico nos campo de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7 para os peptídeos R3S5 (A) CPH e (B) CPD. Os perfis obtidos experimentalmente por Shim *et al.* (Experimental) e os perfis para as estruturas iniciais CPH e CPD são mostrados para comparação.

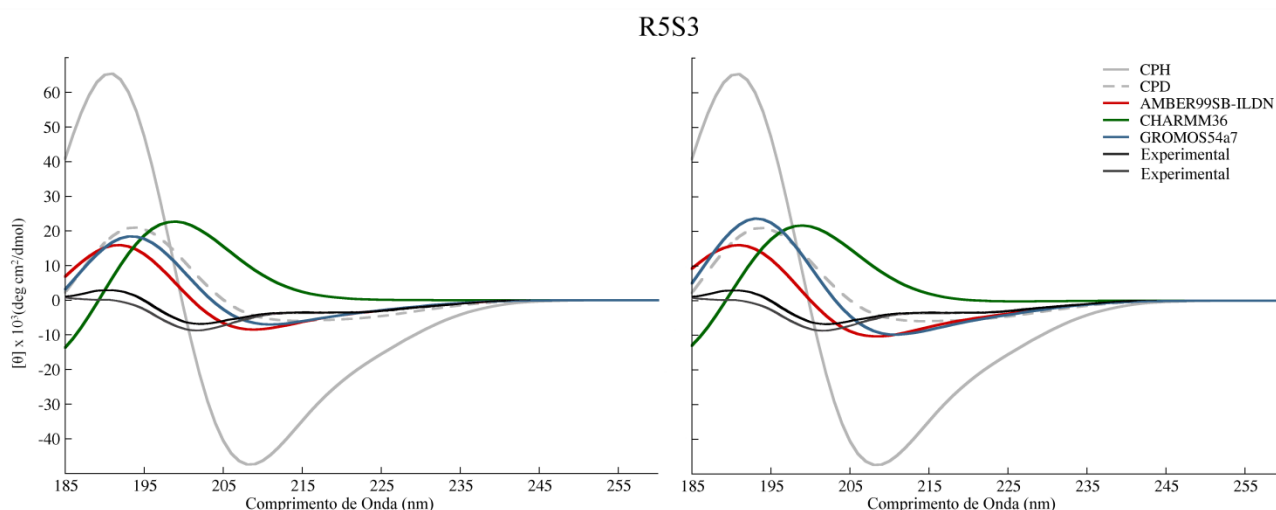


Figura 24 – Dicroísmo circular teórico nos campo de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7 para os peptídeos R5S3 (A) CPH e (B) CPD. Os perfis obtidos experimentalmente por Shim *et al.* e os perfis para as estruturas iniciais CPH e CPD são mostrados para comparação.

O CD teórico para os peptídeos R5S5 (Figura 25) simulados com o AMBER99SB-ILDN possui picos concordantes com os de hélice- $\alpha$ , embora em magnitude inferior. As simulações com o CHARMM36 e com o GROMOS54a7 não mostram o perfil característico de hélice- $\alpha$ , discordando dos resultados experimentais. Além disso, no caso do GROMOS54a7, há discordância com a



análise de DSSP, que detectou hélice- $\alpha$  em *CPH*, mas uma das simulações perde a conformação no final da simulação, o que influenciou o perfil médio de CD teórico.

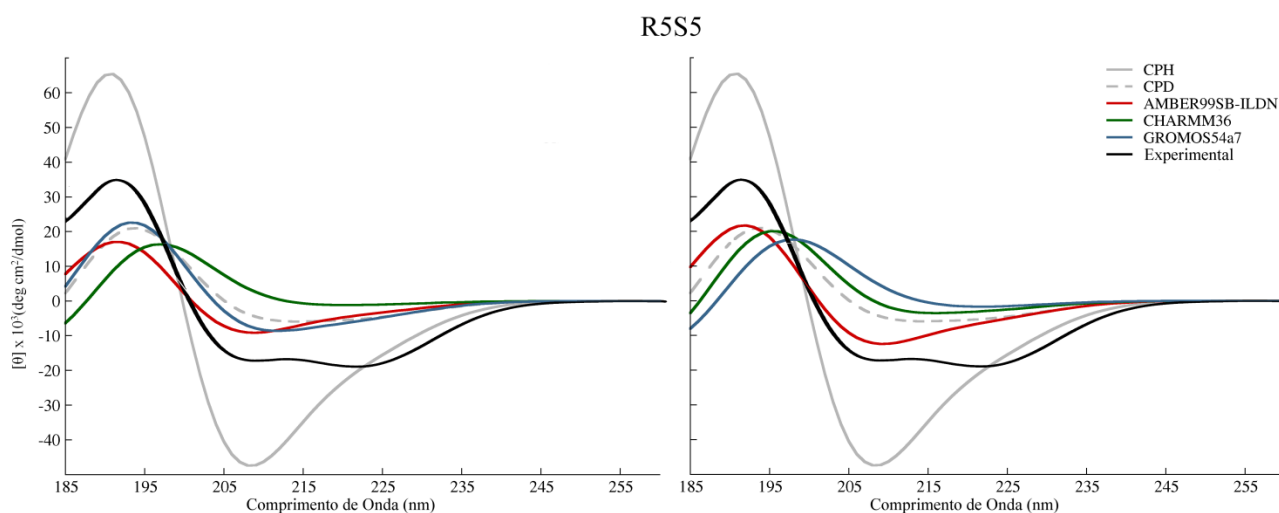


Figura 25 – Dicroísmo circular teórico no campo de força AMBER99SB-ILDN, CHARMM36 e GROMOS54a7 para os peptídeos R5S5 (A) *CPH* e (B) *CPD*. O perfil obtido experimentalmente por Shim *et al.* e os perfis para as estruturas iniciais *CPH* e *CPD* são mostrados para comparação.

#### 4.5. METODOLOGIAS UNITED-ATOM E ALL-ATOM

As análises acima permitem a comparação das metodologias *united-atom* e *all-atom* na descrição desses peptídeos. Comparativamente, os dois campos de força *all-atom* tiveram desempenhos muito diferentes entre si, com o AMBER99SB-ILDN reproduzindo conteúdos similares e constantes de hélice- $\alpha$  para todos os peptídeos, e o CHARMM36 tendo a tendência de perda total de conteúdo de hélice- $\alpha$ . O GROMOS54a7, de abordagem *united-atom*, mostrou concordância com os dados experimentais no peptídeo R3S5, mas mostrou resultados ambíguos com os outros dois peptídeos.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. EFEITO DOS GRAMPOS NO COMPORTAMENTO CONFORMACIONAL DOS PEPTÍDEOS

Análises de RMSD do esqueleto peptídico mostram que a maioria dos peptídeos simulados se distanciou da estrutura de referência, com valores de RMSD similares, independentemente da conformação de partida. Para peptídeos, que são mais flexíveis do que proteínas maiores devido à ausência de um arcabouço proteico estabilizador, uma grande variação de RMSD em relação à estrutura inicial não é incomum, e pode indicar tanto a desnaturação quanto a reorientação de estrutura secundária.

Em peptídeos *CPH*, valores elevados de RMSD poderiam indicar a perda ou reorientação de hélice- $\alpha$ . Os valores de RMSD mais baixos, no peptídeo *CPH* R3S5 simulado com o GROMOS54a7, correlacionam-se com a conformação de hélice em três voltas pela maior parte da simulação, aproximando-se da estrutura de referência. Valores próximos também são observados na simulação do peptídeo *CPH* não-grampeado simulado com o CHARMM36 até os 200 ns, momento em que perde o conteúdo de hélice. No entanto, comparando valores de RMSD de peptídeos que perderam totalmente a conformação de hélice- $\alpha$  com peptídeos que mantêm hélice, observamos que os valores máximos de RMSD para ambos os casos são semelhantes. Dessa forma, pode-se dizer que o aumento dos valores de RMSD correlaciona-se com o desenovelamento ou reestruturação da hélice- $\alpha$ .

Em peptídeos *CPD*, valores maiores de RMSD poderiam indicar a formação de hélices- $\alpha$ . No entanto, uma relação do RMSD com a aquisição de estrutura de peptídeos *CPD* não foi observada, apontando para uma simples mudança de conformação em relação à estrutura inicial.

O efeito do grampo no RMSD mostrou-se um pouco mais claro nas simulações com o GROMOS54a7. No entanto, o RMSD isoladamente não é capaz de descrever a influência conformacional dos grampos nos peptídeos

simulados, embora se observe uma tendência de valores menores de RMSD com a manutenção de três voltas nos peptídeos *CPH*.

Em um estudo computacional com a RNase A, verificou-se que a probabilidade de um resíduo encontrar-se na conformação de hélice- $\alpha$  aumenta quando este estiver adjacente ou englobado pelo grampo (KUTCHUKIAN *et al.*, 2009). Com base nisso, espera-se que resíduos adjacentes ou englobados pelo grampo mostrem valores de RMSF menores, especialmente quando comparados ao peptídeo não-grampeado. Para os peptídeos *CPH*, este foi o caso para todos os peptídeos simulados com o AMBER99SB-ILDN, para a maioria dos resíduos englobados pelo grampo com o CHARMM36, e para o grampo R3S5 com o GROMOS54a7, que flutua menos comparado a todos os outros peptídeos *CPH*. Para os peptídeos *CPD*, o AMBER99SB-ILDN e o CHARMM36 tiveram a maior parte dos resíduos nos peptídeos grampeados menos flutuantes do que os correspondentes no peptídeo não-grampeado, enquanto no GROMOS54a7 apenas o grampo R3S5 diminuiu o valor de RMSF em relação ao equivalente no peptídeo não-grampeado nos resíduos que cercam uma extremidade do grampo.

Quanto ao conteúdo de hélice- $\alpha$  em si (KUTCHUKIAN *et al.*, 2009), sua relação com a proximidade ao grampo foi observada em parte no AMBER99SB-ILDN e no GROMOS54a7, com o CHARMM36 falhando nesse quesito. Em trabalhos experimentais com os mesmos sistemas (SHIM *et al.*, 2013), o peptídeo não-modificado manteve um conteúdo médio de hélice de 25%. Em comparação, as simulações do presente trabalho mostraram uma média similar (GROMOS54a7 – 26,2%) ou menor (AMBER99SB-ILDN – 8,5%; CHARMM36 – 18,6%) à obtida experimentalmente.

Os peptídeos R3S5, R5S3 e R5S5 obtiveram um conteúdo de hélice de 55 ou 41%, 15 ou 14%, e 74%, respectivamente, com os valores não definidos para configurações cis ou trans nos grampos R3S5 e R5S3 (SHIM *et al.*, 2013). O campo de força que mais se aproxima dos resultados obtidos experimentalmente neste quesito é o GROMOS54a7, com valores de conteúdo de hélice similares para os peptídeos não-grampeados e R3S5, embora com valores muito diferentes do experimental para R5S3 e para R5S5. O peptídeo R5S3 é bem representado

no campo de força AMBER99SB-ILDN nesse quesito, mas os valores para os outros peptídeos grampeados e mesmo para o não-grampeado são muito distintos dos valores obtidos experimentalmente. Os peptídeos grampeados simulados no CHARMM36 não mostraram aumento na média de resíduos em hélice- $\alpha$ . Isso seria condizente com os resultados experimentais para o peptídeo R5S3, mas tanto a porcentagem média de tempo em conformação de hélice- $\alpha$  quanto o comportamento dos outros peptídeos indicam a falta de adequação dos parâmetros utilizados no CHARMM36 para a descrição dos grampos simulados.

As análises exclusivas de conteúdo de hélice- $\alpha$  mostram a natureza oscilatória de todas as simulações, com perda e ganho sucessivos de voltas de hélice durante a simulação. A capacidade de adquirir e readquirir hélices- $\alpha$  condiz com sugestões de que os grampos aumentam a propensão à formação de hélices, funcionando como nucleadores de hélice- $\alpha$ , e não como mantenedores de uma estrutura rígida (KUTCHUKIAN *et al.*, 2009). O peptídeo grampeado R3S5, que deve apresentar um elevado conteúdo de hélice- $\alpha$ , foi bem reproduzido no AMBER99SB-ILDN, embora com um conteúdo de hélice menor do que o experimental, e no GROMOS54a7 com precisão. O peptídeo grampeado R5S3, que deve ter um conteúdo de hélice- $\alpha$  menor do que o peptídeo não-grampeado, teve esse comportamento no CHARMM36, mas não no AMBER99SB-ILDN, onde apresentou conteúdo de hélice- $\alpha$  similar aos outros peptídeos, e nem totalmente no GROMOS54a7, onde houve manutenção de hélice- $\alpha$  em uma das simulações com *CPH*, enquanto a outra apresentou perda. Por fim, o peptídeo grampeado R5S5, que deveria ter o melhor desempenho, apresentou conformações de hélice- $\alpha$  nos campos de força AMBER99SB-ILDN, apenas em uma simulação com *CPD* no CHARMM36 e apenas em *CPH* no GROMOS54a7.

## 5.2. DICROISMO CIRCULAR

Análises do perfil de CD permitem o estudo de mudanças na estrutura secundária de uma amostra, sendo muito utilizadas no estudo experimental de peptídeos grampeados. O cálculo de um perfil teórico funciona como uma

validação de simulações *in silico*, aproximando métodos computacionais de experimentais. No presente trabalho, foi realizada a análise do perfil de CD em comparação com perfis definidos experimentalmente para os mesmos peptídeos grampeados. Os perfis gerados funcionam complementando e, em caso de concordância com o modelo experimental, validando o modelo computacional.

Analisando o dicroísmo circular calculado pelo servidor DichroCalc para os peptídeos grampeados e não-grampeados, nota-se que o peptídeo *CPH* inicial não resolveu o duplo mínimo entre 200 e 230 nm característico da conformação de hélice- $\alpha$ . De fato, os parâmetros *ab initio* utilizados pelo DichroCalc para o cálculo do cromóforo amida parecem ter essa limitação (BULHELLER *et al.*, 2007), devido à desconsideração de transições  $n\pi^*$ , observáveis na faixa de 222 nm (BESLEY & HIRST, 1999). No entanto, na faixa de 220 nm, a acurácia do CD teórico concorda quase quantitativamente com a calculada experimentalmente (BULHELLER *et al.*, 2007).

Baseando-se no máximo a 190 nm e mínimo a 108 nm, apenas os peptídeos R5S5 no AMBER99SB-ILDN e R3S5 no GROMOS54a7, tanto partindo de *CPH* quanto de *CPD*, mostram um perfil condizente com hélice- $\alpha$  e similares ao CD experimental. Comparado com resultados experimentais (SHIM *et al.*, 2013), o grampo R5S5 simulado no AMBER99SB-ILDN mostra uma magnitude mais discreta no seu perfil de CD teórico. A mesma tendência a menores picos foi verificada no desenvolvimento dos parâmetros *ab initio*, quando em comparação a dados obtidos experimentalmente para proteínas com predominância de hélices- $\alpha$  (BESLEY & HIRST, 1999). O peptídeo com o grampo R3S5, simulado no GROMOS54a7, se aproxima do dicroísmo circular medido, considerando os valores de elipticidade na faixa dos 220 nm e o máximo na faixa dos 190 nm.

Os grampos adicionados a R3S5 e R5S3 diferem apenas na posição da ligação dupla na cadeia olefínica, utilizando os mesmos parâmetros, mas diferem muito no perfil de CD obtido experimentalmente, com R3S5 mostrando um perfil de hélice- $\alpha$  comparável aos dos peptídeos R5S5, enquanto R5S3 mostra um perfil que não condiz com hélice- $\alpha$  (SHIM *et al.*, 2013). No entanto, um perfil de hélice- $\alpha$  foi detectado nas simulações de R5S3 com o AMBER99SB-ILDN e com o

GROMOS54a7. A possível detecção do perfil de hélice nesses casos pode corresponder à utilização do mesmo conjunto de parâmetros para a simulação do peptídeos R3S5 e R5S3, que parece favorecer a manutenção e formação de hélice- $\alpha$  a partir de uma volta. De fato, foi verificado que o GROMOS54a7 favorece a conversão de hélices- $3_{10}$  à hélices- $\alpha$ , sugerindo uma tendência à estabilização de hélices- $\alpha$  (SCHMID *et al.*, 2011). Isso também é visto nas simulações com o peptídeo não-grampeado, que mantiveram, e formaram (em menor grau), mais conformações de hélice- $\alpha$  do que o mesmo peptídeo simulado em outros campos de força. Por outro lado, o campo de força AMBER99SB-ILDN foi associado à subestimação da estabilidade de hélices- $\alpha$  em peptídeos de 15 aminoácidos (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2012).

Comparados à análise de hélice- $\alpha$  pelo DSSP, apenas alguns peptídeos grampeados obtiveram um perfil de CD teórico condizente com a estrutura na trajetória. Um exemplo de discordância é o peptídeo R3S5 simulado no AMBER99SB-ILDN e o peptídeo R5S5 simulado com o GROMOS54a7, que deveriam apresentar perfil de hélice- $\alpha$ , o que não condiz com o perfil teórico obtido. Possíveis fontes de divergência dos dados teóricos e experimentais incluem a escolha dos últimos 400 ns de simulação como representativos para o cálculo do CD teórico. Talvez a análise de uma janela temporal maior ou de um maior número de estruturas possa gerar perfis diferentes. Outra possível fonte de divergência é a janela amostral da simulação, que engloba apenas 1 microssegundo, significativamente menor do que a janela amostral da análise espectrofotométrica. Todas as simulações mostraram uma série de rearranjos estruturais dos peptídeos. Existe a possibilidade de que, em uma escala de tempo comparável à escala dos experimentos em bancada, haja rearranjos maiores, formando e mantendo estruturas específicas, como por exemplo as hélices- $\alpha$  que foram detectadas experimentalmente. Apesar da grande janela de simulação utilizada no presente trabalho, mais simulações com uma janela amostral maior poderiam auxiliar nesse quesito, fornecendo uma maior quantidade de dados, possivelmente aproximando as simulações dos resultados obtidos experimentalmente.

Outras formas de aumentar a amostragem incluem as metodologias de *Replica Exchange* (SUGITA & OKAMOTO, 1999) e de Monte Carlo (MORGON & COUTINHO, 2007), metodologias já utilizadas no estudo de peptídeos grampeados e que apresentam maior concordância com valores experimentais (GUO *et al.*, 2010; KUTCHUKIAN *et al.*, 2009). Essas metodologias geram mais amostras conformacionais de maneira independente de tempo. Por o sistema de interesse ser um peptídeo pequeno, seria possível esgotar todas as conformações possíveis, e assim verificar a abundância conformacional gerada por essas metodologias ordenada energeticamente.

A simulação de peptídeos farmacologicamente relevantes, especialmente em interação com sua proteína-alvo, fornecerão mais informações sobre a qualidade da descrição desse sistema por diferentes campos de força. Estudos sugerem que, mesmo que peptídeos grampeados e não-grampeados com as mesmas sequências mostrem conteúdo de hélice similar, o grampo tem um papel em manter as posições relativas das cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos importantes na p53 (SIM *et al.*, 2014). Além disso, estudos mostram que peptídeos grampeados são mais resilientes à mutações em resíduos de interação com a proteína-alvo. Adicionalmente, serão fornecidas informações sobre a interação com a água, que foi aprisionada entre o grampo e MDM2 em estudos com peptídeos grampeados derivados de p53 (SIM *et al.*, 2014).

### **5.3. METODOLOGIAS UNITED-ATOM E ALL-ATOM**

No presente trabalho, um dos principais indicadores de sucesso da descrição de grampos olefínicos por um campo de força é a capacidade de reproduzir os diferentes comportamentos conformacionais gerados pela adição de diferentes grampos em um peptídeo. Nenhum dos campos de força testados forneceu resultados concordantes com os obtidos experimentalmente para todos os grampos.

Trabalhos anteriores comparando a eficiência de modelos *all-atom* (AMBER99SB-ILDN e CHARMM36) com modelos *united-atom* (GROMOS54a7)

resultaram em representações satisfatórias de peptídeos curtos pelos últimos (BROOKS *et al.*, 1983; DUNFIELD *et al.*, 1978). Uma limitação comum de modelos de átomo unido é o incorreto tratamento de ligações de hidrogênio, que dependem da representação explícita de átomos de hidrogênio (BROOKS *et al.*, 1983). Os campos de força da família GROMOS contornam esse problema por tratarem como pseudoátomos (*i.e.* átomo unido) apenas os hidrogênios alifáticos, que não participam em ligações de hidrogênio.

O AMBER99SB-ILDN mostrou conteúdos de hélice- $\alpha$  similares para todos os peptídeos grampeados, não sendo capaz de simular adequadamente as diferenças entre grampos diferentes. No entanto, a associação deste campo de força à subestimação da estabilidade de hélices- $\alpha$  indica que os valores reais de conteúdo de hélice seriam maiores (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2012). Isso pode indicar que ajustes nos parâmetros já existentes permitiriam uma adequação melhor do campo de força à descrição do comportamento peptídico. Visto que uma grande parte dos estudos computacionais de peptídeos grampeados utiliza os campos de força AMBER99SB, é importante levar isso em consideração na interpretação dos dados.

Com os parâmetros utilizados neste estudo, o campo de força CHARMM36 não se mostrou adequado na simulação de peptídeos grampeados. O CHARMM36 é uma versão corrigida do CHARMM27, que possuía uma propensão a manter hélices- $\alpha$ . As correções feitas pelo CHARMM36 utilizaram peptídeos fracamente estruturados obtidos por NMR como base para o ajuste do esqueleto peptídico de resíduos de aminoácidos (BEST *et al.*, 2012), o que pode influenciar o peptídeo a perder a estrutura que seria mantida ou favorecida pelo grampo. Nesse caso, uma possível solução seria adequar os parâmetros para descreverem o sistema adequadamente, mas isso implica na criação de parâmetros para tipos de átomos que já estão inclusos no campo de força, prejudicando a transferabilidade.

O GROMOS54a7, de metodologia *united-atom*, conseguiu reproduzir adequadamente o peptídeo não-grampeado e um dos peptídeos grampeados com bastante acurácia, mas não foi capaz de reproduzir os resultados esperados



para os peptídeos R5S3 e R5R5. Considerando o peptídeo grampeado R5S5, que foi capaz de manter a conformação de hélice- $\alpha$  partindo de um peptídeo *CPH* mas não foi capaz de adquiri-la a partir de *CPD*, erros em parâmetros torsionais podem ter causado desequilíbrios na simulação por DM. Se a revisão de parâmetros torcionais não for suficiente, uma construção de parâmetros *ab initio* pode auxiliar nesse caso. Para *CPD*, o peptídeo pode ter ficado preso em um mínimo local, não conseguindo formar hélices- $\alpha$ . Erros de parametrização não parecem ser o caso para R5S3, que difere de R3S5 apenas na posição de sua ligação dupla. Como para *CPH* apenas uma das simulações foi capaz de manter a conformação de hélice- $\alpha$ , talvez o peptídeo tenha ficado preso em um mínimo local que favorece a formação de hélice.

Modelos de átomo unido podem ser muito vantajosos, reduzindo a complexidade do sistema a ser simulado sem perder a precisão dos modelos atomísticos, diminuindo o número de interações não-ligadas e graus de liberdade internos, consequentemente reduzindo os custos computacionais. Além disso, há evidências de que modelos de átomo unido permitem um ganho na eficiência da amostragem conformacional (HSIEH & LUO, 2010), possivelmente permitindo que as simulações visitem um número maior de conformações em um mesmo tempo de máquina, além de uma aproximação maior aos dados obtidos experimentalmente.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho avaliou a capacidade da metodologia de DM em descrever o efeito conformacional promovido por grampos olefínicos em peptídeos. Para tal, foram testados diferentes conjuntos de parâmetros, buscando identificar as melhores condições a serem empregadas em estudos futuros destes e de sistemas relacionados.

Assim, topologias para cálculos baseados em campos de força clássicos foram geradas para peptídeos grampeados em três diferentes campos de força. Apesar de todas as topologias permitirem a simulação por DM sem problemas, nenhum campo de força concorda totalmente com os resultados experimentais em todos os grampos testados.

O aumento do conteúdo de hélice- $\alpha$  em peptídeos grampeados foi observado nos campos de força AMBER99SB-ILDN e no GROMOS54a7, sem, no entanto, concordar com os dados experimentais na maioria dos casos. Os peptídeos simulados com o CHARMM36 falharam nesse quesito.

Os perfis de CD teórico pouco concordaram com as análises de hélice- $\alpha$  nas trajetórias e com os perfis obtidos experimentalmente, o que indica problemas na amostragem de estruturas para submissão ao servidor de cálculo de dicroísmo. Outra abordagem é necessária para haver a concordância com os dados teóricos e experimentais.

De forma geral, o campo de força de átomo unido GROMOS54a7 obteve mais sucesso na descrição conformacional de peptídeos grampeados, e embora tenha discrepâncias com o dado experimental em dois dos três peptídeos grampeados, é o único campo de força testado que simulou com precisão o efeito de um grampo inserido em um peptídeo. Mudanças na parametrização dos grampos e uma abordagem diferente de simulação, com mais sistemas e replicatas, podem adequar as simulações ao sistema experimental.

Em suma, não é possível determinar um campo de força totalmente adequado para simulações de peptídeos grampeados, ao menos utilizando os

parâmetros escolhidos pelo presente trabalho. Para simulações futuras com peptídeos grampeados, recomenda-se considerar as limitações de cada campo de força na interpretação dos resultados.

## 7. PERSPECTIVAS

Considerando as possíveis causas para diferenças no comportamento teórico dos peptídeos em relação aos dados obtidos experimentalmente, algumas abordagens adicionais poderiam ser empregadas. Novas simulações utilizando outros campos de força, que possuem parâmetros distintos para a descrição do movimento do sistema, podem ser mais adequadas à concordância com dados de bancada. Adicionalmente, a utilização de parâmetros diferentes para descrição dos grampos pode mostrar-se mais adequada do que a abordagem utilizada. Além disso, a simulação de outros peptídeos, especialmente peptídeos biologicamente ativos em interação com seus alvos terapêuticos, fornecerá informações em outro nível, importante para a análise da estabilização gerada por grampos olefínicos. Uma vez estabelecido um campo de força razoável e completo, será possível conceder poder preditivo às simulações computacionais no caso dos peptídeos grampeados. A partir daí, interações e modificações destes poderão ser estudadas, além de possibilitar a previsão de certas propriedades dos peptídeos sem que haja o custo de sua síntese e análise experimental. Com a união a outras metodologias computacionais, será possível prever diversas características de potenciais fármacos com alvos anteriormente considerados não-moduláveis terapeuticamente, visando melhorar a qualidade de vida de diversas espécies.

Outras possibilidades na investigação da estabilização de peptídeos incluem a simulação computacional de grampos com outras composições. Isso permitiria o aumento do conhecimento na área e o aprimoramento de outros estabilizadores conformacionais. A inserção de técnicas experimentais de estabilização de estrutura secundária na linha de pesquisa do grupo, visando a engenharia de proteínas, poderia fornecer informações para a comparação com dados experimentais da aplicação em alvos de interesse biotecnológico, ampliando a utilização desses estabilizadores conformacionais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. *The Journal of Chemical Physics*, 27(5): 1208, 1957.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal Research Reviews*, 26(5): 531–568, 2006.
- AVORN, J. The \$2.6 Billion Pill — Methodologic and Policy Considerations. *The New England Journal of Medicine*, 372:1877–1879, 2015.
- BAEK, S.; KUTCHUKIAN, P. S.; VERDINE, G. L.; HUBER, R.; HOLAK, T. A.; LEE, K. W.; POPOWICZ, G. M. Structure of the Stapled p53 Peptide Bound to Mdm2. *Journal of the American Chemical Society*, 134(1): 103–106, 2012.
- BELLMANN-SICKERT, K.; STONE, T. A.; POULSEN, B. E.; DEBER, C. M. Efflux by Small Multidrug Resistance Proteins Is Inhibited by Membrane-interactive Helix-stapled Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 290(3): 1752–1759, 2015.
- BERNAL, F.; TYLER, A. F.; KORSMEYER, S. J.; WALENSKY, L. D.; VERDINE, G. L. Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. *Journal of the American Chemical Society*, 129(9): 2456–2457, 2007.
- BERNAL, F.; WADE, M.; GODES, M.; DAVIS, T. N.; WHITEHEAD, D. G.; KUNG, A. L.; WAHL, G. M.; WALENSKY, L. D. A Stapled p53 Helix Overcomes HDMX-Mediated Suppression of p53. *Cancer Cell*, 18(5): 411–422, 2010.
- BESLEY, N. A.; HIRST, J. D. Theoretical Studies toward Quantitative Protein Circular Dichroism Calculations. *Journal of the American Chemical Society*, 121(41): 9636–9644, 1999.
- BEST, R. B.; ZHU, X.; SHIM, J.; LOPES, P. E. M.; MITTAL, J.; FEIG, M.; MACKERELL, A. D. Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and Side-Chain  $\chi$  1 and  $\chi$  2 Dihedral Angles. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9): 3257–3273, 2012.
- BHATTACHARYA, S.; ZHANG, H.; DEBNATH, A. K.; COWBURN, D. Solution Structure of a Hydrocarbon Stapled Peptide Inhibitor in Complex with Monomeric C-terminal Domain of HIV-1 Capsid. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24): 16274–16278, 2008.
- BIRD, G. H.; BOYAPALLE, S.; WONG, T.; OPOKU-NSIAH, K.; BEDI, R.; CRANNELL, W. C.; PERRY, A. F.; NGUYEN, H.; SAMPAYO, V.; DEVAREDDY, A.; MOHAPATRA, S.; MOHAPATRA, S. S.; WALENSKY, L. D. Mucosal delivery of a double-stapled RSV peptide prevents nasopulmonary infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(5): 2113–2124, 2014.
- BIRD, G. H.; MADANI, N.; PERRY, A. F.; PRINCIOTTO, A. M.; SUPKO, J. G.; HE, X.; GAVATHIOTIS, E.; SODROSKI, J. G.; WALENSKY, L. D. Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32): 14093–14098, 2010.
- BRAUN, C. R.; MINTSERIS, J.; GAVATHIOTIS, E.; BIRD, G. H.; GYGI, S. P.; WALENSKY, L. D. Photoreactive Stapled BH3 Peptides to Dissect the BCL-2 Family Interactome. *Chemistry & Biology*, 17(12): 1325–1333, 2010.
- BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R. E.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4(2): 187–217, 1983.
- BROWN, C. J.; QUAH, S. T.; JONG, J.; GOH, A. M.; CHIAM, P. C.; KHOO, K. H.; CHOONG, M. L.;

LEE, M. A.; YURLOVA, L.; ZOLGHADR, K.; JOSEPH, T. L.; VERMA, C. S.; LANE, D. P. Stapled Peptides with Improved Potency and Specificity That Activate p53. *ACS Chemical Biology*, 8(3): 506–512, 2013.

BULHELLER, B. M.; HIRST, J. D. DichroCalc--circular and linear dichroism online. *Bioinformatics*, 25(4): 539–540, 2009.

BULHELLER, B. M.; RODGER, A.; HIRST, J. D. Circular and linear dichroism of proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(17): 2020-2035, 2007.

CHANG, Y. S.; GRAVES, B.; GUERLAVALAIS, V.; TOVAR, C.; PACKMAN, K.; TO, K.-H.; OLSON, K. A.; KESAVAN, K.; GANGURDE, P.; MUKHERJEE, A.; BAKER, T.; DARLAK, K.; ELKIN, C.; FILIPOVIC, Z.; QURESHI, F. Z.; CAI, H.; BERRY, P.; FEYFANT, E.; SHI, X. E.; HORSTICK, J.; ANNIS, D. A.; MANNING, A. M.; FOTOUHI, N.; NASH, H.; VASSILEV, L. T.; SAWYER, T. K. Stapled  $\alpha$ -helical peptide drug development: A potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(36): E3445–E3454, 2013.

CHAPUIS, H.; SLANINOVÁ, J.; BEDNÁROVÁ, L.; MONINCOVÁ, L.; BUDĚŠÍNSKÝ, M.; ČEŘOVSKÝ, V. Effect of hydrocarbon stapling on the properties of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides isolated from the venom of hymenoptera. *Amino Acids*, 43(5): 2047–2058, 2012.

CHEN, C. Y.-C. A novel integrated framework and improved methodology of computer-aided drug design. *Current topics in medicinal chemistry*, 13(9): 965–988, 2013.

COLLIER, J. H.; SEGURA, T. Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials*, 32(18): 4198–4204, 2011.

CUI, H.-K.; QING, J.; GUO, Y.; WANG, Y.-J.; CUI, L.-J.; HE, T.-H.; ZHANG, L.; LIU, L. Stapled peptide-based membrane fusion inhibitors of hepatitis C virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(12): 3547–3554, 2013.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle Mesh Ewald: An N-log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.*, 98(12): 10089–10092, 1993.

DE AGUIAR, C.; COSTA, M. G. S.; VERLI, H. Dynamics on human Toll-like receptor 4 complexation to MD-2: The coreceptor stabilizing function. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 83(2): 373–382, 2015.

DE GROOT, B. L. Water Permeation Across Biological Membranes: Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 294(5550): 2353–2357, 2001.

DINH, T. T. T.; KIM, D.-H.; LEE, B.; KIM, Y. De Novo Design and Their Antimicrobial Activity of Stapled Amphipathic Helices of Heptapeptides. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 35(12): 3632–3636, 2014.

DOMAŃSKI, J.; STANSFELD, P. J.; SANSOM, M. S. P.; BECKSTEIN, O. Lipidbook: A Public Repository for Force-Field Parameters Used in Membrane Simulations. *The Journal of Membrane Biology*, 236(3): 255–258, 2010.

DROR, R. O.; DIRKS, R. M.; GROSSMAN, J. P.; XU, H.; SHAW, D. E. Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. *Annual Review of Biophysics*, 41(1): 429–452, 2012.

DUNFIELD, L. G.; BURGESS, A. W.; SCHERAGA, H. A. Energy parameters in polypeptides. 8. Empirical potential energy algorithm for the conformational analysis of large molecules. *The Journal of Physical Chemistry*, 82(24): 2609–2616, 1978.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC*

*Biology*, 9(1): 71, 2011.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20(1): 122–128, 2015.

FULLER, J. C.; BURGOYNE, N. J.; JACKSON, R. M. Predicting druggable binding sites at the protein–protein interface. *Drug Discovery Today*, 14(3-4): 155–161, 2009.

GARNER, J.; HARDING, M. M. Design and synthesis of  $\alpha$ -helical peptides and mimetics. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5(22): 355–358, 2007.

GRÖNWALL, C.; STÅHL, S. Engineered affinity proteins—Generation and applications. *Journal of Biotechnology*, 140(3-4): 254–269, 2009.

GUO, Z.; MOHANTY, U.; NOEHRE, J.; SAWYER, T. K.; SHERMAN, W.; KRILOV, G. Probing the  $\alpha$ -Helical Structural Stability of Stapled p53 Peptides: Molecular Dynamics Simulations and Analysis. *Chemical Biology & Drug Design*, 75(4): 348–359, 2010.

GUO, Z.; STREU, K.; KRILOV, G.; MOHANTY, U. Probing the Origin of Structural Stability of Single and Double Stapled p53 Peptide Analogs Bound to MDM2. *Chemical Biology & Drug Design*, 83(6): 631–642, 2014.

HAMACHER, K.; HÜBSCH, A.; MCCAMMON, J. A. A minimal model for stabilization of biomolecules by hydrocarbon cross-linking. *The Journal of Chemical Physics*, 124(16): 164907, 2006.

HENCHEY, L. K.; JOCHIM, A. L.; ARORA, P. S. Contemporary Strategies for the Stabilization of Peptides in the  $\alpha$ -Helical Conformation. *Curr Opin Chem Biol.*, 12(6): 692–697, 2009.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12): 1463–1472, 1997.

HIRST, J. D.; BROOKS, C. L. Helicity, Circular-Dichroism and Molecular-Dynamics of Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 243, 173-178, 1994.

HOLMES, T. C. Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 20(1): 16–21, 2002.

HOWL, J.; JONES, S. Insights into the molecular mechanisms of action of biopeptides: a strategy to target protein-protein interactions. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 17: e1, 2015.

HSIEH, M.-J.; LUO, R. Balancing Simulation Accuracy and Efficiency with the Amber United Atom Force Field. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(8): 2886–2893, 2010.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1): 33–38, 1996.

JÄMBECK, J. P. M.; LYUBARTSEV, A. P. Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(10): 3164–3179, 2012.

JANG, H.; MICHAUD-AGRAWAL, N.; JOHNSTON, J. M.; WOOLF, T. B. How to lose a kink and gain a helix: pH independent conformational changes of the fusion domains from influenza hemagglutinin in heterogeneous lipid bilayers. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 72(1): 299–312, 2008.

JEMLI, S.; AYADI-ZOUARI, D.; HLIMA, H. BEN; BEJAR, S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2): 246–258, 2016.

JOGALEKAR, A. Computational chemistry wins 2013 Nobel Prize in Chemistry. Disponível em: <<http://blogs.scientificamerican.com/the-curious-wavefunction/computational-chemistry-wins-2013-nobel-prize-in-chemistry/>>. Acesso em: 15 set. 2015.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45): 11225–11236, 1996.

JOSEPH, T. L.; LANE, D. P.; VERMA, C. S. Stapled BH3 Peptides against MCL-1: Mechanism and Design Using Atomistic Simulations. *PLoS ONE*, 7(8): e43985, 2012.

JOSEPH, T. L.; MADHUMALAR, A.; BROWN, C. J.; LANE, D. P.; VERMA, C. S. Differential binding of p53 and nutlin to MDM2 and MDMX: Computational studies. *Cell Cycle*, 9(6): 1167–1181, 2010.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12): 2577–2637, 1983.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9): 646–652, 2002.

KELLY, S.; PRICE, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein & Peptide Science*, 1(4): 349–384, 2000.

KIM, Y.; KUTCHUKIAN, P. S.; VERDINE, G. L. Introduction of All-Hydrocarbon  $i, i+3$  Staples into  $\alpha$ -Helices via Ring-Closing Olefin Metathesis. *Organic Letters*, 12(13): 3046–3049, 2010.

KIM, Y.-W.; GROSSMANN, T. N.; VERDINE, G. L. Synthesis of all-hydrocarbon stapled  $\alpha$ -helical peptides by ring-closing olefin metathesis. *Nature Protocols*, 6(6): 761–771, 2011.

KIM, Y.-W.; VERDINE, G. L. Stereochemical effects of all-hydrocarbon tethers in  $i, i+4$  stapled peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(9): 2533–2536, 2009.

KRITZER, J. A. Stapled peptides: Magic bullets in nature's arsenal. *Nature Chemical Biology*, 6(8): 566–567, 2010.

KUKOL, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(3): 615–626, 2009.

KUTCHUKIAN, P. S.; YANG, J. S.; VERDINE, G. L.; SHAKHNOVICH, E. I. All-Atom Model for Stabilization of  $\alpha$ -Helical Structure in Peptides by Hydrocarbon Staples. *Journal of the American Chemical Society*, 131(13): 4622–4627, 2009.

LAMA, D.; QUAH, S. T.; VERMA, C. S.; LAKSHMINARAYANAN, R.; BEUERMAN, R. W.; LANE, D. P.; BROWN, C. J. Rational Optimization of Conformational Effects Induced By Hydrocarbon Staples in Peptides and their Binding Interfaces. *Scientific Reports*, 3(3451), 2013.

LAU, Y. H.; DE ANDRADE, P.; SKÖLD, N.; MCKENZIE, G. J.; VENKITARAMAN, A. R.; VERMA, C.; LANE, D. P.; SPRING, D. R. Investigating peptide sequence variations for “double-click” stapled p53 peptides. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(24): 4074–4077, 2014.

LEACH, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2 edição, Cingapura, Longman, 2001.

LEE, J. P.; LIU, C.; LI, T.; ZHU, G.; LI, X. Development of stapled helical peptides to perturb the Cdt1-Mcm6 interaction. *Journal of Peptide Science*, 21(7): 593–598, 2015.

LEI, H.; DUAN, Y. Improved sampling methods for molecular simulation. *Current Opinion in*



*Structural Biology*, 17(2): 187–191, 2007.

LEVITT, M.; WARSHEL, A. Computer simulation of protein folding. *Nature*, 253(5494): 694–698, 1975.

LILL, M. A.; DANIELSON, M. L. Computer-aided drug design platform using PyMOL. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 25(1): 13–19, 2011.

LIMA, M. A.; YATES, E. A.; TERSARIOL, I. L. S.; NADER, H. B. Dicroísmo Circular. In: *Bioinformática*. p. 210–219, 2014.

LINDORFF-LARSEN, K.; MARAGAKIS, P.; PIANA, S.; EASTWOOD, M. P.; DROR, R. O.; SHAW, D. E. Systematic Validation of Protein Force Fields against Experimental Data. *PLoS ONE*, 7(2): e32131, 2012.

LINDORFF-LARSEN, K.; PIANA, S.; PALMO, K.; MARAGAKIS, P.; KLEPEIS, J. L.; DROR, R. O.; SHAW, D. E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8): 1950-1958, 2010.

LONG, Y.-Q.; HUANG, S.-X.; ZAWAHIR, Z.; XU, Z.-L.; LI, H.; SANCHEZ, T. W.; ZHI, Y.; DE HOUWER, S.; CHRIST, F.; DEBYSER, Z.; NEAMATI, N. Design of Cell-Permeable Stapled Peptides as HIV-1 Integrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(13): 5601–5612, 2013.

MACKERELL, A. D.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK, R. L.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T. K.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D. T.; PRODHOM, B.; REIHER, W. E.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J. C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WIÓRKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D.; KARPLUS, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins †. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18): 3586–3616, 1998.

MAIOROV, V. N.; CRIPPEN, G. M. Significance of Root-Mean-Square Deviation in Comparing Three-dimensional Structures of Globular Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 235(2): 625–634, 1994.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. *European Journal of Pharmacology*, 625(1-3): 90–100, 2009.

MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612): 585–590, 1977.

MILLER, S. J.; GRUBBS, R. H. Synthesis of Conformationally Restricted Amino Acids and Peptides Employing Olefin Metathesis. *Journal of the American Chemical Society*, 117(21): 5855–5856, 1995.

MORGON, N.; COUTINHO, K. *Métodos de Química Teórica E Modelagem Molecular*. [s.l.] Editora Livraria da Física, 2007.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. DA; SILVA, C. H. T. P. DA. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, 33(4): 13–24, 2008.

NIČ, M.; JIRÁT, J.; KOŠATA, B.; JENKINS, A.; MCNAUGHT, A. (EDS.). *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.

PEDEBOS, C.; ARANTES, P. R.; GIESEL, G. M.; VERLI, H. In silico Investigation of the PglB Active Site Reveals Transient Catalytic States and Octahedral Metal Ion Coordination. *Glycobiology*, 25(11): 1183–1195, 2015.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13): 1605–1612, 2004.

PHAM, T. K.; YOO, J.; KIM, Y. Comparison of Oct-2-enyl and Oct-4-enyl Staples for Their Formation and  $\alpha$ -Helix Stabilizing Effects. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(9): 2640–2644, 2013.

PHILLIPS, C.; ROBERTS, L. R.; SCHADE, M.; BAZIN, R.; BENT, A.; DAVIES, N. L.; MOORE, R.; PANNIFER, A. D.; PICKFORD, A. R.; PRIOR, S. H.; READ, C. M.; SCOTT, A.; BROWN, D. G.; XU, B.; IRVING, S. L. Design and Structure of Stapled Peptides Binding to Estrogen Receptors. *Journal of the American Chemical Society*, 133(25): 9696–9699, 2011.

PIANA, S.; LINDORFF-LARSEN, K.; SHAW, D. E. How Robust Are Protein Folding Simulations with Respect to Force Field Parameterization? *Biophysical Journal*, 100(9): L47–L49, 2011.

RAHMAN, A. Molecular Dynamics Study of Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*, 55(7): 3336, 1971.

RAPAPORT, D. C. Molecular dynamics simulation: a tool for exploration and discovery using simple models. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 26(50): 503104, 2014.

RICHARDSON, J. S. The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. In: *Journal of Molecular Biology*. [s.l.: s.n.]. v. 109p. 167–339.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). *Química Nova*, 25(3): 505–512, 2002.

SCHAFMEISTER, C. E.; PO, J.; VERDINE, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 122(24): 5891–5892, 2000.

SCHAFTENAAR, G.; NOORDIK, J. H. No Title. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 14(2): 123–134, 2000.

SCHLICK, T. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. New York, NY: Springer New York, 2010. v. 21

SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*, 40(7): 843–856, 2011.

SCOTT, W. R. P.; HÜNENBERGER, P. H.; TIRONI, I. G.; MARK, A. E.; BILLETER, S. R.; FENNEN, J.; TORDA, A. E.; HUBER, T.; KRÜGER, P.; VAN GUNSTEREN, W. F. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(19): 3596–3607, 1999.

SHIM, S. Y.; KIM, Y.-W.; VERDINE, G. L. A New  $i, i + 3$  Peptide Stapling System for  $\alpha$ -Helix Stabilization. *Chemical Biology & Drug Design*, 82(6): 635–642, 2013.

SIM, A. Y. L.; JOSEPH, T.; LANE, D. P.; VERMA, C. Mechanism of Stapled Peptide Binding to MDM2: Possible Consequences for Peptide Design. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(4): 1753–1761, 2014.

SIM, A. Y. L.; VERMA, C. How does a hydrocarbon staple affect peptide hydrophobicity? *Journal of Computational Chemistry*, 36(10): 773–784, 2015.

SUGITA, Y.; OKAMOTO, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding.

*Chemical Physics Letters*, 314(1-2): 141–151, 1999.

SVIRIDOV, D. O.; IKPOT, I. Z.; STONIK, J.; DRAKE, S. K.; AMAR, M.; OSEI-HWEDIEH, D. O.; PISZCZEK, G.; TURNER, S.; REMALEY, A. T. Helix stabilization of amphipathic peptides by hydrocarbon stapling increases cholesterol efflux by the ABCA1 transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410(3): 446–451, 2011.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

TOUW, W. G.; BAAKMAN, C.; BLACK, J.; TE BEEK, T. A. H.; KRIEGER, E.; JOOSTEN, R. P.; VRIEND, G. A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Research*, 43(D1): D364–D368, 2015.

URSU, O.; RAYAN, A.; GOLDBLUM, A.; OPREA, T. I. Understanding drug-likeness. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(5): 760–781, 2011.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16): 1701–1718, 2005.

VASSILEV, L. T. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science*, 303(5659): 844–848, 2004.

VERDINE, G. L.; HILINSKI, G. J. All-hydrocarbon stapled peptides as Synthetic Cell-Accessible Mini-Proteins. *Drug Discovery Today: Technologies*, 9(1): e41–e47, 2012.

VERDINE, G. L.; WALENSKY, L. D. The Challenge of Drugging Undruggable Targets in Cancer: Lessons Learned from Targeting BCL-2 Family Members. *Clinical Cancer Research*, 13(24): 7264–7270, 2007.

VERLI, H. (org.). *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular*. Porto Alegre: 1 ed. 2014.

WALENSKY, L. D. Activation of Apoptosis in Vivo by a Hydrocarbon-Stapled BH3 Helix. *Science*, 305(5689): 1466–1470, 2004.

WALENSKY, L. D.; BIRD, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(15): 6275–6288, 2014.

WALENSKY, L. D.; PITTER, K.; MORASH, J.; OH, K. J.; BARBUTO, S.; FISHER, J.; SMITH, E.; VERDINE, G. L.; KORSMEYER, S. J. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Molecular cell*, 24(2): 199–210, 2006.

WANG, Y.; HO, T. G.; BERTINETTI, D.; NEDDERMANN, M.; FRANZ, E.; MO, G. C. H.; SCHENDOWICH, L. P.; SUKHU, A.; SPELTS, R. C.; ZHANG, J.; HERBERG, F. W.; KENNEDY, E. J. Isoform-Selective Disruption of AKAP-Localized PKA Using Hydrocarbon Stapled Peptides. *ACS Chemical Biology*, 9(3): 635–642, 2014.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In: *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. v. 47p. 5.6.1–5.6.32.

XIANG, M.; CAO, Y.; FAN, W.; CHEN, L.; MO, Y. Computer-Aided Drug Design: Lead Discovery and Optimization. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 15(4): 328–337, 2012.

YANG, X.; TSCHAPLINSKI, T. J.; HURST, G. B.; JAWDY, S.; ABRAHAM, P. E.; LANKFORD, P. K.; ADAMS, R. M.; SHAH, M. B.; HETTICH, R. L.; LINDQUIST, E.; KALLURI, U. C.; GUNTER, L. E.; PENNACCHIO, C.; TUSKAN, G. A. Discovery and annotation of small proteins using genomics, proteomics, and computational approaches. *Genome Research*, 21(4): 634–641, 2011.

YOO, J.; KIM, Y. Effective  $\alpha$ -Helix Stabilization via Hexenyl Propionate Cross-Link. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 35(12): 3627–3631, 2014.

ZHANG, H.; CURRELI, F.; ZHANG, X.; BHATTACHARYA, S.; WAHEED, A. A; COOPER, A.; COWBURN, D.; FREED, E. O.; DEBNATH, A. K. Antiviral activity of  $\alpha$ -helical stapled peptides designed from the HIV-1 capsid dimerization domain. *Retrovirology*, 8(1): 2011.

ZHANG, H.; ZHAO, Q.; BHATTACHARYA, S.; WAHEED, A. A; TONG, X.; HONG, A.; HECK, S.; CURRELI, F.; GOGER, M.; COWBURN, D.; FREED, E. O.; DEBNATH, A. K. A Cell-penetrating Helical Peptide as a Potential HIV-1 Inhibitor. *Journal of Molecular Biology*, 378(3): 565–580, 2008.

ZHANG, Q. Z.; TIAN, Y.; LAO, Y. Z.; LI, Z. Peptides-Staple Method Development and Its Application in Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 21(21): 2438–2452, 2014.

## 9. APÊNDICES

Dados necessários à reprodução dos resultados obtidos neste trabalho estão apresentados nos Apêndices I e II.

No Apêndice I, estão descritos os resíduos que formarão o grampo, com informações como tipo de átomo e carga, ligações intra-resíduo e diedros.

No Apêndice II, estão descritos os átomos de cada peptídeo e os parâmetros adicionados diretamente à topologia. Como os peptídeos dos campos de força *all-atom* possuem os mesmos números de átomos, apresentamos esses dados apenas uma vez, utilizando os peptídeos simulados com o AMBER99SB-ILDN como base. A topologia com o CHARMM36 foi omitida por sua similaridade com a do AMBER99SB-ILDN, que difere em alguns tipos de átomos, que são mostrados no Apêndice I.

## 9.1. APÊNDICE I - RESÍDUOS ADICIONADOS AOS CAMPOS DE FORÇA

### 9.1.1. RESÍDUOS PARA PEPTÍDEOS GRAMPEADOS -AMBER99SB-ILDN

[ D5R ]				[ D5S ]			
[ atoms ]				[ atoms ]			
N	N	-0.41570	1	N	N	-0.41570	1
H	H	0.27190	2	H	H	0.27190	2
CA	CT	0.11440	3	CA	CT	0.11440	3
CB1	CT	-0.27000	4	CB1	CT	-0.27000	4
HB11	HC	0.09000	5	HB11	HC	0.09000	5
HB12	HC	0.09000	6	HB12	HC	0.09000	6
HB13	HC	0.09000	7	HB13	HC	0.09000	7
CB2	CT	-0.18000	8	CB2	CT	-0.18000	8
HB21	HC	0.09000	9	HB21	HC	0.09000	9
HB22	HC	0.09000	10	HB22	HC	0.09000	10
CG	CT	-0.18000	11	CG	CT	-0.18000	11
HG1	HC	0.09000	12	HG1	HC	0.09000	12
HG2	HC	0.09000	13	HG2	HC	0.09000	13
CD	CT	-0.18000	14	CD	CT	-0.18000	14
HD1	HC	0.09000	15	HD1	HC	0.09000	15
HD2	HC	0.09000	16	HD2	HC	0.09000	16
CE	CA	-0.15000	17	CE	CA	-0.15000	17
HE1	HA	0.15000	18	HE1	HA	0.15000	18
CZ	CA	-0.15000	19	CZ	CA	-0.15000	19
HZ1	HA	0.15000	20	HZ1	HA	0.15000	20
C	C	0.59730	21	C	C	0.59730	21
O	O	-0.56790	22	O	O	-0.56790	22
[ bonds ]				[ bonds ]			
N	H			N	H		
N	CA			N	CA		
CA	CB1			CA	CB1		
CB1	HB11			CB1	HB11		
CB1	HB12			CB1	HB12		
CB1	HB13			CB1	HB13		
CA	CB2			CA	CB2		
CA	C			CA	C		
CB2	HB21			CB2	HB21		
CB2	HB22			CB2	HB22		
CB2	CG			CB2	CG		
CG	HG1			CG	HG1		
CG	HG2			CG	HG2		
CG	CD			CG	CD		
CD	HD1			CD	HD1		
CD	HD2			CD	HD2		
CD	CE			CD	CE		
CE	HE1			CE	HE1		
CE	CZ			CE	CZ		
CZ	HZ1			CZ	HZ1		
C	O			C	O		
-C	N			-C	N		
[ impropers ]				[ impropers ]			
-C	CA	N	H	-C	CA	N	H
CA	+N	C	O	CA	+N	C	O
N	C	CA	CB2	N	C	CA	CB2
N	C	CA	CB1	N	C	CA	CB1
C	CB2	N	CA	N	CB2	C	CA
CB1	CB2	C	CA	C	CB2	CB1	CA
N	CB2	CB1	CA	CB1	CB2	N	CA

[ D3R ]					[ D3S ]				
[ atoms ]					[ atoms ]				
N	N	-0.41570	1		N	N	-0.41570	1	
H	H	0.27190	2		H	H	0.27190	2	
CA	CT	0.11440	3		CA	CT	0.11440	3	
CB1	CT	-0.27000	4		CB1	CT	-0.27000	4	
HB11	HC	0.09000	5		HB11	HC	0.09000	5	
HB12	HC	0.09000	6		HB12	HC	0.09000	6	
HB13	HC	0.09000	7		HB13	HC	0.09000	7	
CB2	CT	-0.18000	8		CB2	CT	-0.18000	8	
HB21	HC	0.09000	9		HB21	HC	0.09000	9	
HB22	HC	0.09000	10		HB22	HC	0.09000	10	
CG	CA	-0.15000	11		CG	CA	-0.15000	11	
HG1	HA	0.15000	12		HG1	HA	0.15000	12	
CD	CA	-0.15000	13		CD	CA	-0.15000	13	
HD1	HA	0.15000	14		HD1	HA	0.15000	14	
C	C	0.59730	15		C	C	0.59730	15	
O	O	-0.56790	16		O	O	-0.56790	16	
[ bonds ]					[ bonds ]				
N	H				N	H			
N	CA				N	CA			
CA	CB1				CA	CB1			
CB1	HB11				CB1	HB11			
CB1	HB12				CB1	HB12			
CB1	HB13				CB1	HB13			
CA	CB2				CA	CB2			
CA	C				CA	C			
CB2	HB21				CB2	HB21			
CB2	HB22				CB2	HB22			
CB2	CG				CB2	CG			
CG	HG1				CG	HG1			
CG	CD				CG	CD			
CD	HD1				CD	HD1			
C	O				C	O			
-C	N				-C	N			
[ impropers ]					[ impropers ]				
-C	CA	N	H		-C	CA	N	H	
CA	+N	C	O		CA	+N	C	O	
N	C	CA	CB2		N	C	CA	CB2	
N	C	CA	CB1		N	C	CA	CB1	
C	CB2	N	CA		N	CB2	C	CA	
C	CB1	CA	CB2		C	CB2	CB1	CA	
N	CB2	CB1	CA		CB1	CB2	N	CA	

```
[ S3R ]
[ atoms ]
  N   N   -0.41570   1
  H   H   0.27190   2
  CA  CT   0.11440   3
  CB1 CT  -0.27000   4
  HB11 HC  0.09000   5
  HB12 HC  0.09000   6
  HB13 HC  0.09000   7
  CB2  CT  -0.18000   8
  HB21 HC  0.09000   9
  HB22 HC  0.09000  10
  CG   CT  -0.18000  11
  HG1  HC  0.09000  12
  HG2  HC  0.09000  13
  CD   CT  -0.18000  14
  HD1  HC  0.09000  15
  HD2  HC  0.09000  16
  C    C   0.59730  17
  O    O  -0.56790  18
```

```
[ bonds ]
  N   H
  N   CA
  CA  CB1
  CB1 HB11
  CB1 HB12
  CB1 HB13
  CA  CB2
  CA   C
  CB2 HB21
  CB2 HB22
  CB2  CG
  CG  HG1
  CG  HG2
  CG  CD
  CD  HD1
  CD  HD2
  C   O
  -C  N
```

```
[ impropers ]
  -C  CA   N   H
  CA  +N  C   O
  N   C   CA  CB2
  N   C   CA  CB1
  C   CB2  N   CA
  CB1 CB2  C   CA
  N   CB2  CB1  CA
```

```
[ S3S ]
[ atoms ]
  N   N   -0.41570   1
  H   H   0.27190   2
  CA  CT   0.11440   3
  CB1 CT  -0.27000   4
  HB11 HC  0.09000   5
  HB12 HC  0.09000   6
  HB13 HC  0.09000   7
  CB2  CT  -0.18000   8
  HB21 HC  0.09000   9
  HB22 HC  0.09000  10
  CG   CT  -0.18000  11
  HG1  HC  0.09000  12
  HG2  HC  0.09000  13
  CD   CT  -0.18000  14
  HD1  HC  0.09000  15
  HD2  HC  0.09000  16
  C    C   0.59730  17
  O    O  -0.56790  18
```

```
[ bonds ]
  N   H
  N   CA
  CA  CB1
  CB1 HB11
  CB1 HB12
  CB1 HB13
  CA  CB2
  CA   C
  CB2 HB21
  CB2 HB22
  CB2  CG
  CG  HG1
  CG  HG2
  CG  CD
  CD  HD1
  CD  HD2
  C   O
  -C  N
```

```
[ impropers ]
  -C  CA   N   H
  CA  +N  C   O
  N   C   CA  CB2
  CA  CB1  N   C
  CA  CB2  N   C
  CA  CB2  CB1  C
  CB1 CB2  N   CA
```



## 9.1.2. RESÍDUOS PARA PEPTÍDEOS GRAMPEADOS – CHARMM36

```
[ D5S ]
[ atoms ]
  N  NH1  -0.47   0
  HN  H    0.31   0
  CA  CT1  0.16   0
  CB1 CT3  -0.27   1
  HB11 HA3  0.09   1
  HB12 HA3  0.09   1
  HB13 HA3  0.09   1
  CB2 CTL2 -0.18   2
  HB21 HAL2 0.09   2
  HB22 HAL2 0.09   2
  CG  CTL2 -0.18   3
  HG1 HAL2  0.09   3
  HG2 HAL2  0.09   3
  CD  CTL2 -0.18   4
  HD1 HAL2  0.09   4
  HD2 HAL2  0.09   4
  CE  CEL1 -0.15   5
  HE1 HEL1  0.15   5
  CZ  CEL1 -0.15   6
  HZ1 HEL1  0.15   6
  C   C     0.51   7
  O   O    -0.51   7
[ bonds ]
  CB1 CA
  CB2 CA
  CG  CB2
  CD  CG
  CE  CD
  CZ  CE
  N   HN
  N   CA
  C   CA
  C   +N
  CB1 HB11
  CB1 HB12
  CB1 HB13
  CB2 HB21
  CB2 HB22
  CG  HG1
  CG  HG2
  CD  HD1
  CD  HD2
  CE  HE1
  O   C
  CZ  HZ1
[ impropers ]
  N  -C  CA  HN
  C  CA  +N  O
[ cmap ]
  -C  N  CA  C  +N

[ D5R ]
[ atoms ]
  N  NH1  -0.47   0
  HN  H    0.31   0
  CA  CT1  0.16   0
  CB1 CT3  -0.27   1
  HB11 HA3  0.09   1
  HB12 HA3  0.09   1
  HB13 HA3  0.09   1
  CB2 CTL2 -0.18   2
  HB21 HAL2 0.09   2
  HB22 HAL2 0.09   2
  CG  CTL2 -0.18   3
  HG1 HAL2  0.09   3
  HG2 HAL2  0.09   3
  CD  CTL2 -0.18   4
  HD1 HAL2  0.09   4
  HD2 HAL2  0.09   4
  CE  CEL1 -0.15   5
  HE1 HEL1  0.15   5
  CZ  CEL1 -0.15   6
  HZ1 HEL1  0.15   6
  C   C     0.51   7
  O   O    -0.51   7
[ bonds ]
  CB1 CA
  CB2 CA
  CG  CB2
  CD  CG
  CE  CD
  CZ  CE
  N   HN
  N   CA
  C   CA
  C   +N
  CB1 HB11
  CB1 HB12
  CB1 HB13
  CB2 HB21
  CB2 HB22
  CG  HG1
  CG  HG2
  CD  HD1
  CD  HD2
  CE  HE1
  O   C
  CZ  HZ1
[ impropers ]
  N  -C  CA  HN
  C  CA  +N  O
[ cmap ]
  -C  N  CA  C  +N
```

```

[ D3S ]
[ atoms ]
  N   NH1   -0.47   0
  HN  H     0.31   0
  CA  CT1   0.16   0
  CB1 CT3   -0.27   1
  HB11 HA3   0.09   1
  HB12 HA3   0.09   1
  HB13 HA3   0.09   1
  CB2 CTL2  -0.18   2
  HB21 HAL2  0.09   2
  HB22 HAL2  0.09   2
  CG  CEL1  -0.15   3
  HG1 HEL1  0.15   3
  CD  CEL1  -0.15   4
  HD1 HEL1  0.15   4
  C   C     0.51   5
  O   O    -0.51   5
[ bonds ]
  CB1 CA
  CB2 CA
  CG  CB2
  CD  CG
  N   HN
  N   CA
  C   CA
  C   +N
  CB1 HB11
  CB1 HB12
  CB1 HB13
  CB2 HB21
  CB2 HB22
  CG  HG1
  CD  HD1
  O   C
[ impropers ]
  N   -C   CA   HN
  C   CA   +N   O
[ cmap ]
  -C   N   CA   C   +N

```

```

[ D3R ]
[ atoms ]
  N   NH1   -0.47   0
  HN  H     0.31   0
  CA  CT1   0.16   0
  CB1 CT3   -0.27   1
  HB11 HA3   0.09   1
  HB12 HA3   0.09   1
  HB13 HA3   0.09   1
  CB2 CTL2  -0.18   2
  HB21 HAL2  0.09   2
  HB22 HAL2  0.09   2
  CG  CEL1  -0.15   3
  HG1 HEL1  0.15   3
  CD  CEL1  -0.15   4
  HD1 HEL1  0.15   4
  C   C     0.51   5
  O   O    -0.51   5
[ bonds ]
  CB1 CA
  CB2 CA
  CG  CB2
  CD  CG
  N   HN
  N   CA
  C   CA
  C   +N
  CB1 HB11
  CB1 HB12
  CB1 HB13
  CB2 HB21
  CB2 HB22
  CG  HG1
  CD  HD1
  O   C
[ impropers ]
  N   -C   CA   HN
  C   CA   +N   O
[ cmap ]
  -C   N   CA   C   +N

```

```

[ S3S ]
[ atoms ]
  N   NH1  -0.47    0
  HN  H     0.31    0
  CA  CT1   0.16    0
  CB1 CT3  -0.27    1
  HB11 HA3  0.09    1
  HB12 HA3  0.09    1
  HB13 HA3  0.09    1
  CB2 CTL2 -0.18    2
  HB21 HAL2 0.09    2
  HB22 HAL2 0.09    2
  CG   CTL2 -0.18    3
  HG1  HAL2 0.09    3
  HG2  HAL2 0.09    3
  CD   CTL2 -0.18    4
  HD1  HAL2 0.09    4
  HD2  HAL2 0.09    4
  C    C     0.51    5
  O    O    -0.51    5
[ bonds ]
  CB1 CA
  CB2 CA
  CG  CB2
  CD  CG
  N   HN
  N   CA
  C   CA
  C   +N
  CB1 HB11
  CB1 HB12
  CB1 HB13
  CB2 HB21
  CB2 HB22
  CG  HG1
  CG  HG2
  CD  HD1
  CD  HD2
  O   C
[ impropers ]
  N   -C   CA   HN
  C   CA   +N   O
[ cmap ]
  -C   N   CA   C   +N

```

```

[ S3R ]
[ atoms ]
  N   NH1  -0.47    0
  HN  H     0.31    0
  CA  CT1   0.16    0
  CB1 CT3  -0.27    1
  HB11 HA3  0.09    1
  HB12 HA3  0.09    1
  HB13 HA3  0.09    1
  CB2 CTL2 -0.18    2
  HB21 HAL2 0.09    2
  HB22 HAL2 0.09    2
  CG   CTL2 -0.18    3
  HG1  HAL2 0.09    3
  HG2  HAL2 0.09    3
  CD   CTL2 -0.18    4
  HD1  HAL2 0.09    4
  HD2  HAL2 0.09    4
  C    C     0.51    5
  O    O    -0.51    5
[ bonds ]
  CB1 CA
  CB2 CA
  CG  CB2
  CD  CG
  N   HN
  N   CA
  C   CA
  C   +N
  CB1 HB11
  CB1 HB12
  CB1 HB13
  CB2 HB21
  CB2 HB22
  CG  HG1
  CG  HG2
  CD  HD1
  CD  HD2
  O   C
[ impropers ]
  N   -C   CA   HN
  C   CA   +N   O
[ cmap ]
  -C   N   CA   C   +N

```

### 9.1.3. RESÍDUOS PARA GRAMPOS – GROMOS54A7

```

[ D5S ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000    0
  H      H      0.31000    0
  CA     C      0.00000    1
  CB1    CH3    0.00000    1
  CB2    CH2    0.00000    1
  CG     CH2    0.00000    2
  CD     CH2    0.00000    2
  CE     CR1    0.00000    3
  CZ     CR1    0.00000    3
  C      C      0.450      4
  O      O      -0.450     4

[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_21
  CA     CB1    gb_27
  CA     CB2    gb_27
  CA     C      gb_27
  CB2    CG     gb_27
  CG     CD     gb_27
  CD     CE     gb_27
  CE     CZ     gb_10
  C      O      gb_5
  C      +N     gb_10

[ angles ]
  -C     N      H      ga_32
  -C     N      CA     ga_31
  H      N      CA     ga_18
  N      CA     CB1    ga_13
  N      CA     C      ga_13
  N      CA     CB2    ga_13
  CB1    CA     C      ga_13
  CB2    CA     C      ga_13
  CB1    CA     CB2    ga_13
  CA     CB2    CG     ga_15
  CB2    CG     CD     ga_15
  CG     CD     CE     ga_15
  CD     CE     CZ     ga_27
  CA     C      O      ga_30
  CA     C      +N     ga_19
  O      C      +N     ga_33

[ impropers ]
  N      -C     CA     H      gi_1
  CA     N      C      CB2    gi_2
  CA     N      C      CB1    gi_5
  C      N      CB2    CA     gi_2
  CB1    C      CB2    CA     gi_2
  N      CB1    CB2    CA     gi_2
  C      CA     +N     O      gi_1

[ dihedrals ]
  -CA    -C     N      CA     gd_14
  -C     N      CA     C      gd_44
  -C     N      CA     C      gd_43
  CB1    CA     N      -C     gd_43
  CB1    CA     N      -C     gd_44

```

```

[ D5R ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000    0
  H      H      0.31000    0
  CA     C      0.00000    1
  CB1    CH3    0.00000    1
  CB2    CH2    0.00000    1
  CG     CH2    0.00000    2
  CD     CH2    0.00000    2
  CE     CR1    0.00000    3
  CZ     CR1    0.00000    3
  C      C      0.450      4
  O      O      -0.450     4

[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_21
  CA     CB1    gb_27
  CA     CB2    gb_27
  CA     C      gb_27
  CB2    CG     gb_27
  CG     CD     gb_27
  CD     CE     gb_27
  CE     CZ     gb_10
  C      O      gb_5
  C      +N     gb_10

[ angles ]
-C      N      H      ga_32
-C      N      CA     ga_31
  H      N      CA     ga_18
  N      CA     CB1    ga_13
  N      CA     C      ga_13
  N      CA     CB2    ga_13
  CB1    CA     C      ga_13
  CB2    CA     C      ga_13
  CB1    CA     CB2    ga_13
  CA     CB2    CG     ga_15
  CB2    CG     CD     ga_15
  CG     CD     CE     ga_15
  CD     CE     CZ     ga_27
  CA     C      O      ga_30
  CA     C      +N     ga_19
  O      C      +N     ga_33

[ impropers ]
  N      -C     CA     H      gi_1
  CA     N      C      CB2    gi_2
  CA     N      C      CB1    gi_5
  N      C      CB2    CA     gi_2
  C      CB1    CB2    CA     gi_2
  CB1    N      CB2    CA     gi_2
  C      CA     +N     O      gi_1

[ dihedrals ]
-CA     -C     N      CA     gd_14
-C      N      CA     C      gd_44
-C      N      CA     C      gd_43
CB1     CA     N      -C     gd_43
CB1     CA     N      -C     gd_44
  N      CA     C      +N     gd_45
  N      CA     C      +N     gd_42
  N      CA     CB2    CG     gd_34
  CA     CB2    CG     CD     gd_34

```

[ D3S ]	[ D3R ]
[ atoms ]	[ atoms ]
N N -0.31000 0	N N -0.31000 0
H H 0.31000 0	H H 0.31000 0
CA C 0.00000 1	CA C 0.00000 1
CB1 CH3 0.00000 1	CB1 CH3 0.00000 1
CB2 CH2 0.00000 1	CB2 CH2 0.00000 1
CG CR1 0.00000 2	CG CR1 0.00000 2
CD CR1 0.00000 2	CD CR1 0.00000 2
C C 0.450 3	C C 0.450 3
O O -0.450 3	O O -0.450 3
[ bonds ]	[ bonds ]
N H gb_2	N H gb_2
N CA gb_21	N CA gb_21
CA CB1 gb_27	CA CB1 gb_27
CA CB2 gb_27	CA CB2 gb_27
CA C gb_27	CA C gb_27
CB2 CG gb_27	CB2 CG gb_27
CG CD gb_10	CG CD gb_10
C O gb_5	C O gb_5
C +N gb_10	C +N gb_10
[ angles ]	[ angles ]
-C N H ga_32	-C N H ga_32
-C N CA ga_31	-C N CA ga_31
H N CA ga_18	H N CA ga_18
N CA CB1 ga_13	N CA CB1 ga_13
N CA C ga_13	N CA C ga_13
N CA CB2 ga_13	N CA CB2 ga_13
CB1 CA C ga_13	CB1 CA C ga_13
CB2 CA C ga_13	CB2 CA C ga_13
CB1 CA CB2 ga_13	CB1 CA CB2 ga_13
CA CB2 CG ga_15	CA CB2 CG ga_15
CB2 CG CD ga_27	CB2 CG CD ga_27
CA C O ga_30	CA C O ga_30
CA C +N ga_19	CA C +N ga_19
O C +N ga_33	O C +N ga_33
[ impropers ]	[ impropers ]
N -C CA H gi_1	N -C CA H gi_1
CA N C CB2 gi_2	CA N C CB2 gi_2
CA N C CB1 gi_5	CA N C CB1 gi_5
C N CB2 CA gi_2	N C CB2 CA gi_2
CB1 C CB2 CA gi_2	C CB1 CB2 CA gi_2
N CB1 CB2 CA gi_2	CB1 N CB2 CA gi_2
C CA +N O gi_1	C CA +N O gi_1
[ dihedrals ]	[ dihedrals ]
-CA -C N CA gd_14	-CA -C N CA gd_14
-C N CA C gd_44	-C N CA C gd_44
-C N CA C gd_43	-C N CA C gd_43
CB1 CA N -C gd_43	CB1 CA N -C gd_43
CB1 CA N -C gd_44	CB1 CA N -C gd_44
N CA C +N gd_45	N CA C +N gd_45
N CA C +N gd_42	N CA C +N gd_42
N CA CB2 CG gd_34	N CA CB2 CG gd_34

```

[ S3S ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000    0
  H      H      0.31000    0
  CA     C      0.00000    1
  CB1    CH3    0.00000    1
  CB2    CH2    0.00000    1
  CG     CH2    0.00000    2
  CD     CH2    0.00000    2
  C      C      0.450      3
  O      O      -0.450      3
[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_21
  CA     CB1    gb_27
  CA     CB2    gb_27
  CA     C      gb_27
  CB2    CG     gb_27
  CG     CD     gb_27
  C      O      gb_5
  C      +N     gb_10
[ angles ]
  -C     N      H      ga_32
  -C     N      CA     ga_31
  H      N      CA     ga_18
  N      CA     CB1    ga_13
  N      CA     C      ga_13
  N      CA     CB2    ga_13
  CB1    CA     C      ga_13
  CB2    CA     C      ga_13
  CB1    CA     CB2    ga_13
  CA     CB2    CG     ga_15
  CB2    CG     CD     ga_15
  CA     C      O      ga_30
  CA     C      +N     ga_19
  O      C      +N     ga_33
[ impropers ]
  N      -C     CA     H      gi_1
  CA     N      C      CB2    gi_2
  CA     N      C      CB1    gi_5
  C      N      CB2    CA     gi_2
  CB1    C      CB2    CA     gi_2
  N      CB1    CB2    CA     gi_2
  C      CA     +N     O      gi_1
[ dihedrals ]
  -CA    -C     N      CA     gd_14
  -C     N      CA     C      gd_44
  -C     N      CA     C      gd_43
  CB1    CA     N      -C     gd_43
  CB1    CA     N      -C     gd_44
  N      CA     C      +N     gd_45
  N      CA     C      +N     gd_42
  N      CA     CB2    CG     gd_34
  CA     CB2    CG     CD     gd_34

[ S3R ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000    0
  H      H      0.31000    0
  CA     C      0.00000    1
  CB1    CH3    0.00000    1
  CB2    CH2    0.00000    1
  CG     CH2    0.00000    2
  CD     CH2    0.00000    2
  C      C      0.450      3
  O      O      -0.450      3
[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_21
  CA     CB1    gb_27
  CA     CB2    gb_27
  CA     C      gb_27
  CB2    CG     gb_27
  CG     CD     gb_27
  C      O      gb_5
  C      +N     gb_10
[ angles ]
  -C     N      H      ga_32
  -C     N      CA     ga_31
  H      N      CA     ga_18
  N      CA     CB1    ga_13
  N      CA     C      ga_13
  N      CA     CB2    ga_13
  CB1    CA     C      ga_13
  CB2    CA     C      ga_13
  CB1    CA     CB2    ga_13
  CA     CB2    CG     ga_15
  CB2    CG     CD     ga_15
  CA     C      O      ga_30
  CA     C      +N     ga_19
  O      C      +N     ga_33
[ impropers ]
  N      -C     CA     H      gi_1
  CA     N      C      CB2    gi_2
  CA     N      C      CB1    gi_5
  N      C      CB2    CA     gi_2
  C      CB1    CB2    CA     gi_2
  CB1    N      CB2    CA     gi_2
  C      CA     +N     O      gi_1
[ dihedrals ]
  -CA    -C     N      CA     gd_14
  -C     N      CA     C      gd_44
  -C     N      CA     C      gd_43
  CB1    CA     N      -C     gd_43
  CB1    CA     N      -C     gd_44
  N      CA     C      +N     gd_45
  N      CA     C      +N     gd_42
  N      CA     CB2    CG     gd_34
  CA     CB2    CG     CD     gd_34

```

## 9.2. APÊNDICE II – PARÂMETROS ADICIONADOS DIRETAMENTE À TOPOLOGIA

### 9.2.1. PARÂMETROS ADICIONADOS NOS CAMPOS DE FORÇA ALL-ATOM

#### 9.2.1.1. Peptídeos R3S5

```

[ atoms ]
; nr   type  resnr atom
; residue 1   GLU  NGLU
1   N3   1   N
2   H    1   H1
3   H    1   H2
4   H    1   H3
5   CT   1   CA
6   HP   1   HA
7   CT   1   CB
8   HC   1   HB1
9   HC   1   HB2
10  CT   1   CG
11  HC   1   HG1
12  HC   1   HG2
13  C    1   CD
14  O2   1   OE1
15  O2   1   OE2
16  C    1   C
17  O    1   O
; residue 2   TRP  TRP
18  N    2   N
19  H    2   H
20  CT   2   CA
21  H1   2   HA
22  CT   2   CB
23  HC   2   HB1
24  HC   2   HB2
25  C*   2   CG
26  CW   2   CD1
27  H4   2   HD1
28  NA   2   NE1
29  H    2   HE1
30  CN   2   CE2
31  CA   2   CZ2
32  HA   2   HZ2
33  CA   2   CH2
34  HA   2   HH2
35  CA   2   CZ3
36  HA   2   HZ3
37  CA   2   CE3
38  HA   2   HE3
39  CB   2   CD2
40  C    2   C
41  O    2   O
; residue 3   ALA  ALA
42  N    3   N
43  H    3   H
44  CT   3   CA
45  H1   3   HA
46  CT   3   CB
47  HC   3   HB1
48  HC   3   HB2
49  HC   3   HB3
50  C    3   C
51  O    3   O
; residue 4   D6R  D6R
52  N    4   N
53  H    4   H
54  CT   4   CA
55  CT   4   CB1
56  HC   4   HB11
57  HC   4   HB12
58  HC   4   HB13
59  CT   4   CB2
60  HC   4   HB21
61  HC   4   HB22
62  CA   4   CG
63  HA   4   HG1
64  CA   4   CD
65  HA   4   HD1
66  C    4   C
67  O    4   O
; residue 5   THR  THR
68  N    5   N
69  H    5   H
70  CT   5   CA
71  H1   5   HA
72  CT   5   CB
73  H1   5   HB
74  CT   5   CG2
75  HC   5   HG21
76  HC   5   HG22
77  HC   5   HG23
78  OH   5   OG1
79  HO   5   HG1
80  C    5   C
81  O    5   O
; residue 6   ALA  ALA
82  N    6   N
83  H    6   H
84  CT   6   CA
85  H1   6   HA
86  CT   6   CB
87  HC   6   HB1
88  HC   6   HB2

```



	89	HC	6	HB3			138	H	9	HZ2		
	90	C	6	C			139	H	9	HZ3		
	91	O	6	O			140	C	9	C		
;	residue		7	S8S	S8S		141	O	9	O		
	92	N	7	N		;	residue		10	PHE	PHE	
	93	H	7	H			142	N	10	N		
	94	CT	7	CA			143	H	10	H		
	95	CT	7	CB1			144	CT	10	CA		
	96	HC	7	HB11			145	H1	10	HA		
	97	HC	7	HB12			146	CT	10	CB		
	98	HC	7	HB13			147	HC	10	HB1		
	99	CT	7	CB2			148	HC	10	HB2		
	100	HC	7	HB21			149	CA	10	CG		
	101	HC	7	HB22			150	CA	10	CD1		
	102	CT	7	CG			151	HA	10	HD1		
	103	HC	7	HG1			152	CA	10	CE1		
	104	HC	7	HG2			153	HA	10	HE1		
	105	CT	7	CD			154	CA	10	CZ		
	106	HC	7	HD1			155	HA	10	HZ		
	107	HC	7	HD2			156	CA	10	CE2		
	108	C	7	C			157	HA	10	HE2		
	109	O	7	O			158	CA	10	CD2		
;	residue		8	ALA	ALA		159	HA	10	HD2		
	110	N	8	N			160	C	10	C		
	111	H	8	H			161	O	10	O		
	112	CT	8	CA		;	residue		11	LEU	LEU	
	113	H1	8	HA			162	N	11	N		
	114	CT	8	CB			163	H	11	H		
	115	HC	8	HB1			164	CT	11	CA		
	116	HC	8	HB2			165	H1	11	HA		
	117	HC	8	HB3			166	CT	11	CB		
	118	C	8	C			167	HC	11	HB1		
	119	O	8	O			168	HC	11	HB2		
;	residue		9	LYS	LYS		169	CT	11	CG		
	120	N	9	N			170	HC	11	HG		
	121	H	9	H			171	CT	11	CD1		
	122	CT	9	CA			172	HC	11	HD11		
	123	H1	9	HA			173	HC	11	HD12		
	124	CT	9	CB			174	HC	11	HD13		
	125	HC	9	HB1			175	CT	11	CD2		
	126	HC	9	HB2			176	HC	11	HD21		
	127	CT	9	CG			177	HC	11	HD22		
	128	HC	9	HG1			178	HC	11	HD23		
	129	HC	9	HG2			179	C	11	C		
	130	CT	9	CD			180	O	11	O		
	131	HC	9	HD1		;	residue		12	ALA	ALA	
	132	HC	9	HD2			181	N	12	N		
	133	CT	9	CE			182	H	12	H		
	134	HP	9	HE1			183	CT	12	CA		
	135	HP	9	HE2			184	H1	12	HA		
	136	N3	9	NZ			185	CT	12	CB		
	137	H	9	HZ1			186	HC	12	HB1		

```

187  HC  12  HB2          59  105  1
188  HC  12  HB3          63  105  1
189  C   12  C           62  102  1
190  O   12  O           62  106  1
; residue 13  ALA  ALA    62  107  1
191  N   13  N           64  103  1
192  H   13  H           64  104  1
193  CT  13  CA          64  99   1
194  H1  13  HA          65  106  1
195  CT  13  CB          65  107  1
196  HC  13  HB1          65  102  1
197  HC  13  HB2          [ angles ]
198  HC  13  HB3          ; ai  aj  ak  funct
199  C   13  C           64  105  106  1
200  O   13  O           64  105  107  1
; residue 14  HID  HID    62  64  105  1
201  N   14  N           65  64  105  1
202  H   14  H           [ dihedrals ]
203  CT  14  CA          ; ai  aj  ak  al  funct
204  H1  14  HA          65  64  105  106  9
205  CT  14  CB          65  64  105  107  9
206  HC  14  HB1         62  64  105  106  9
207  HC  14  HB2         62  64  105  107  9
208  CC  14  CG          63  62  64  106  9
209  NA  14  ND1         65  64  105  102  9
210  H   14  HD1         64  105  102  103  9
211  CR  14  CE1         64  105  102  104  9
212  H5  14  HE1         64  105  102  99   9
213  NA  14  NE2
214  H   14  HE2
215  CW  14  CD2
216  H4  14  HD2
217  C   14  C
218  O   14  O
; residue 15  ALA  CALA
219  N   15  N
220  H   15  H
221  CT  15  CA
222  H1  15  HA
223  CT  15  CB
224  HC  15  HB1
225  HC  15  HB2
226  HC  15  HB3
227  C   15  C
228  O2  15  OC1
229  O2  15  OC2

[ bonds ]
; ai  aj  funct
  64  105  1

[ pairs ]
; ai  aj  funct

[ atoms ]
; nr  type  resnr  atom
; residue 1  GLU  NGLU
  1  N3  1  N
  2  H  1  H1
  3  H  1  H2
  4  H  1  H3
  5  CT  1  CA
  6  HP  1  HA
  7  CT  1  CB
  8  HC  1  HB1
  9  HC  1  HB2
 10  CT  1  CG
 11  HC  1  HG1
 12  HC  1  HG2
 13  C  1  CD
 14  O2  1  OE1
 15  O2  1  OE2
 16  C  1  C
 17  O  1  O
; residue 2  TRP  TRP
 18  N  2  N

```

### 9.2.1.2. Peptídeos R5S3

19	H	2	H		69	O	4	O	
20	CT	2	CA		;	residue	5	THR	THR
21	H1	2	HA		70	N	5	N	
22	CT	2	CB		71	H	5	H	
23	HC	2	HB1		72	CT	5	CA	
24	HC	2	HB2		73	H1	5	HA	
25	C*	2	CG		74	CT	5	CB	
26	CW	2	CD1		75	H1	5	HB	
27	H4	2	HD1		76	CT	5	CG2	
28	NA	2	NE1		77	HC	5	HG21	
29	H	2	HE1		78	HC	5	HG22	
30	CN	2	CE2		79	HC	5	HG23	
31	CA	2	CZ2		80	OH	5	OG1	
32	HA	2	HZ2		81	HO	5	HG1	
33	CA	2	CH2		82	C	5	C	
34	HA	2	HH2		83	O	5	O	
35	CA	2	CZ3		;	residue	6	ALA	ALA
36	HA	2	HZ3		84	N	6	N	
37	CA	2	CE3		85	H	6	H	
38	HA	2	HE3		86	CT	6	CA	
39	CB	2	CD2		87	H1	6	HA	
40	C	2	C		88	CT	6	CB	
41	O	2	O		89	HC	6	HB1	
;	residue	3	ALA	ALA	90	HC	6	HB2	
42	N	3	N		91	HC	6	HB3	
43	H	3	H		92	C	6	C	
44	CT	3	CA		93	O	6	O	
45	H1	3	HA		;	residue	7	D6S	D6S
46	CT	3	CB		94	N	7	N	
47	HC	3	HB1		95	H	7	H	
48	HC	3	HB2		96	CT	7	CA	
49	HC	3	HB3		97	CT	7	CB1	
50	C	3	C		98	HC	7	HB11	
51	O	3	O		99	HC	7	HB12	
;	residue	4	S8R	S8R	100	HC	7	HB13	
52	N	4	N		101	CT	7	CB2	
53	H	4	H		102	HC	7	HB21	
54	CT	4	CA		103	HC	7	HB22	
55	CT	4	CB1		104	CA	7	CG	
56	HC	4	HB11		105	HA	7	HG1	
57	HC	4	HB12		106	CA	7	CD	
58	HC	4	HB13		107	HA	7	HD1	
59	CT	4	CB2		108	C	7	C	
60	HC	4	HB21		109	O	7	O	
61	HC	4	HB22		;	residue	8	ALA	ALA
62	CT	4	CG		110	N	8	N	
63	HC	4	HG1		111	H	8	H	
64	HC	4	HG2		112	CT	8	CA	
65	CT	4	CD		113	H1	8	HA	
66	HC	4	HD1		114	CT	8	CB	
67	HC	4	HD2		115	HC	8	HB1	
68	C	4	C		116	HC	8	HB2	

	117	HC	8	HB3		166	CT	11	CB	
	118	C	8	C		167	HC	11	HB1	
	119	O	8	O		168	HC	11	HB2	
;	residue		9	LYS	LYS	169	CT	11	CG	
	120	N	9	N		170	HC	11	HG	
	121	H	9	H		171	CT	11	CD1	
	122	CT	9	CA		172	HC	11	HD11	
	123	H1	9	HA		173	HC	11	HD12	
	124	CT	9	CB		174	HC	11	HD13	
	125	HC	9	HB1		175	CT	11	CD2	
	126	HC	9	HB2		176	HC	11	HD21	
	127	CT	9	CG		177	HC	11	HD22	
	128	HC	9	HG1		178	HC	11	HD23	
	129	HC	9	HG2		179	C	11	C	
	130	CT	9	CD		180	O	11	O	
	131	HC	9	HD1		;	residue	12	ALA	ALA
	132	HC	9	HD2		181	N	12	N	
	133	CT	9	CE		182	H	12	H	
	134	HP	9	HE1		183	CT	12	CA	
	135	HP	9	HE2		184	H1	12	HA	
	136	N3	9	NZ		185	CT	12	CB	
	137	H	9	HZ1		186	HC	12	HB1	
	138	H	9	HZ2		187	HC	12	HB2	
	139	H	9	HZ3		188	HC	12	HB3	
	140	C	9	C		189	C	12	C	
;	residue		10	PHE	PHE	;	residue	13	ALA	ALA
	142	N	10	N		191	N	13	N	
	143	H	10	H		192	H	13	H	
	144	CT	10	CA		193	CT	13	CA	
	145	H1	10	HA		194	H1	13	HA	
	146	CT	10	CB		195	CT	13	CB	
	147	HC	10	HB1		196	HC	13	HB1	
	148	HC	10	HB2		197	HC	13	HB2	
	149	CA	10	CG		198	HC	13	HB3	
	150	CA	10	CD1		199	C	13	C	
	151	HA	10	HD1		200	O	13	O	
	152	CA	10	CE1		;	residue	14	HID	HID
	153	HA	10	HE1		201	N	14	N	
	154	CA	10	CZ		202	H	14	H	
	155	HA	10	HZ		203	CT	14	CA	
	156	CA	10	CE2		204	H1	14	HA	
	157	HA	10	HE2		205	CT	14	CB	
	158	CA	10	CD2		206	HC	14	HB1	
	159	HA	10	HD2		207	HC	14	HB2	
	160	C	10	C		208	CC	14	CG	
;	residue		11	LEU	LEU	209	NA	14	ND1	
	162	N	11	N		210	H	14	HD1	
	163	H	11	H		211	CR	14	CE1	
	164	CT	11	CA		212	H5	14	HE1	
	165	H1	11	HA		213	NA	14	NE2	
						214	H	14	HE2	

```

215  CW  14  CD2
216  H4  14  HD2
217  C   14  C
218  O   14  O
; residue 15  ALA  CALA
219  N   15  N
220  H   15  H
221  CT  15  CA
222  H1  15  HA
223  CT  15  CB
224  HC  15  HB1
225  HC  15  HB2
226  HC  15  HB3
227  C   15  C
228  O2  15  OC1
229  O2  15  OC2

[ bonds ]
; ai aj  funct
  65 106    1

[ pairs ]
; ai  aj  funct
  59 106    1
  63 106    1
  64 106    1
  65 107    1
  65 101    1
  66 107    1
  67 107    1
  66 104    1
  67 104    1
  62 107    1
  62 104    1

[ angles ]
; ai  aj  ak  funct
  62  65 106    1
  66  65 106    1
  67  65 106    1
  65 106 107    1
  65 106 104    1

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  funct
  59 62 65 106    9
  62 65 106 107    9
  62 65 106 104    9
  63 62 65 106    9
  64 62 65 106    9
  65 106 104 105    9
  65 106 104 101    9
  66 65 106 104    9
  66 65 106 107    9
  67 65 106 104    9

```

```

67 65 106 107 9

```

### 9.2.1.3. Peptídeos R5S5

```

[ atoms ]
; nr  type  resnr  atom
; residue 1  GLU  NGLU
  1  N3  1  N
  2  H  1  H1
  3  H  1  H2
  4  H  1  H3
  5  CT  1  CA
  6  HP  1  HA
  7  CT  1  CB
  8  HC  1  HB1
  9  HC  1  HB2
 10  CT  1  CG
 11  HC  1  HG1
 12  HC  1  HG2
 13  C  1  CD
 14  O2  1  OE1
 15  O2  1  OE2
 16  C  1  C
 17  O  1  O
; residue 2  TRP  TRP
 18  N  2  N
 19  H  2  H
 20  CT  2  CA
 21  H1  2  HA
 22  CT  2  CB
 23  HC  2  HB1
 24  HC  2  HB2
 25  C*  2  CG
 26  CW  2  CD1
 27  H4  2  HD1
 28  NA  2  NE1
 29  H  2  HE1
 30  CN  2  CE2
 31  CA  2  CZ2
 32  HA  2  HZ2
 33  CA  2  CH2
 34  HA  2  HH2
 35  CA  2  CZ3
 36  HA  2  HZ3
 37  CA  2  CE3
 38  HA  2  HE3
 39  CB  2  CD2
 40  C  2  C
 41  O  2  O
; residue 3  ALA  ALA
 42  N  3  N

```

	43	H	3	H		92	C	6	C	
	44	CT	3	CA		93	O	6	O	
	45	H1	3	HA	;	residue		7	D5S	D5S
	46	CT	3	CB		94	N	7	N	
	47	HC	3	HB1		95	H	7	H	
	48	HC	3	HB2		96	CT	7	CA	
	49	HC	3	HB3		97	CT	7	CB1	
	50	C	3	C		98	HC	7	HB11	
	51	O	3	O		99	HC	7	HB12	
;	residue		4	S8R	S8R	100	HC	7	HB13	
	52	N	4	N		101	CT	7	CB2	
	53	H	4	H		102	HC	7	HB21	
	54	CT	4	CA		103	HC	7	HB22	
	55	CT	4	CB1		104	CT	7	CG	
	56	HC	4	HB11		105	HC	7	HG1	
	57	HC	4	HB12		106	HC	7	HG2	
	58	HC	4	HB13		107	CT	7	CD	
	59	CT	4	CB2		108	HC	7	HD1	
	60	HC	4	HB21		109	HC	7	HD2	
	61	HC	4	HB22		110	CA	7	CE	
	62	CT	4	CG		111	HA	7	HE1	
	63	HC	4	HG1		112	CA	7	CZ	
	64	HC	4	HG2		113	HA	7	HZ1	
	65	CT	4	CD		114	C	7	C	
	66	HC	4	HD1		115	O	7	O	
	67	HC	4	HD2	;	residue		8	ALA	ALA
	68	C	4	C		116	N	8	N	
	69	O	4	O		117	H	8	H	
;	residue		5	THR	THR	118	CT	8	CA	
	70	N	5	N		119	H1	8	HA	
	71	H	5	H		120	CT	8	CB	
	72	CT	5	CA		121	HC	8	HB1	
	73	H1	5	HA		122	HC	8	HB2	
	74	CT	5	CB		123	HC	8	HB3	
	75	H1	5	HB		124	C	8	C	
	76	CT	5	CG2		125	O	8	O	
	77	HC	5	HG21	;	residue		9	LYS	LYS
	78	HC	5	HG22		126	N	9	N	
	79	HC	5	HG23		127	H	9	H	
	80	OH	5	OG1		128	CT	9	CA	
	81	HO	5	HG1		129	H1	9	HA	
	82	C	5	C		130	CT	9	CB	
	83	O	5	O		131	HC	9	HB1	
;	residue		6	ALA	ALA	132	HC	9	HB2	
	84	N	6	N		133	CT	9	CG	
	85	H	6	H		134	HC	9	HG1	
	86	CT	6	CA		135	HC	9	HG2	
	87	H1	6	HA		136	CT	9	CD	
	88	CT	6	CB		137	HC	9	HD1	
	89	HC	6	HB1		138	HC	9	HD2	
	90	HC	6	HB2		139	CT	9	CE	
	91	HC	6	HB3		140	HP	9	HE1	

```

141  HP    9    HE2
142  N3    9    NZ
143  H     9    HZ1
144  H     9    HZ2
145  H     9    HZ3
146  C     9    C
147  O     9    O
; residue 10  PHE  PHE
148  N    10  N
149  H    10  H
150  CT   10  CA
151  H1   10  HA
152  CT   10  CB
153  HC   10  HB1
154  HC   10  HB2
155  CA   10  CG
156  CA   10  CD1
157  HA   10  HD1
158  CA   10  CE1
159  HA   10  HE1
160  CA   10  CZ
161  HA   10  HZ
162  CA   10  CE2
163  HA   10  HE2
164  CA   10  CD2
165  HA   10  HD2
166  C    10  C
167  O    10  O
; residue 11  LEU  LEU
168  N    11  N
169  H    11  H
170  CT   11  CA
171  H1   11  HA
172  CT   11  CB
173  HC   11  HB1
174  HC   11  HB2
175  CT   11  CG
176  HC   11  HG
177  CT   11  CD1
178  HC   11  HD11
179  HC   11  HD12
180  HC   11  HD13
181  CT   11  CD2
182  HC   11  HD21
183  HC   11  HD22
184  HC   11  HD23
185  C    11  C
186  O    11  O
; residue 12  ALA  ALA
187  N    12  N
188  H    12  H
189  CT   12  CA

190  H1   12  HA
191  CT   12  CB
192  HC   12  HB1
193  HC   12  HB2
194  HC   12  HB3
195  C    12  C
196  O    12  O
; residue 13  ALA  ALA
197  N    13  N
198  H    13  H
199  CT   13  CA
200  H1   13  HA
201  CT   13  CB
202  HC   13  HB1
203  HC   13  HB2
204  HC   13  HB3
205  C    13  C
206  O    13  O
; residue 14  HID  HID
207  N    14  N
208  H    14  H
209  CT   14  CA
210  H1   14  HA
211  CT   14  CB
212  HC   14  HB1
213  HC   14  HB2
214  CC   14  CG
215  NA   14  ND1
216  H    14  HD1
217  CR   14  CE1
218  H5   14  HE1
219  NA   14  NE2
220  H    14  HE2
221  CW   14  CD2
222  H4   14  HD2
223  C    14  C
224  O    14  O
; residue 15  ALA  CALA
225  N    15  N
226  H    15  H
227  CT   15  CA
228  H1   15  HA
229  CT   15  CB
230  HC   15  HB1
231  HC   15  HB2
232  HC   15  HB3
233  C    15  C
234  O2   15  OC1
235  O2   15  OC2

[ bonds ]
; ai aj funct
   65  112    1

```

```

[ pairs ]
; ai      aj      funct
  59     112     1
  63     112     1
  64     112     1
  65     111     1
  65     107     1
  66     113     1
  67     113     1
  66     110     1
  67     110     1
  62     113     1
  62     110     1

[ angles ]
; ai      aj      ak      funct
  62      65     112     1
  66      65     112     1

[ dihedrals ]
; ai      aj      ak      al      funct
  67      65     112     1
  65      112    113     1
  6       112    110     1
  59     62      65     112     9
  62     65     112    113     9
  62     65     112    110     9
  63     62      65     112     9
  64     62      65     112     9
  65     112    110    111     9
  65     112    110    107     9
  66     65     112    110     9
  66     65     112    113     9
  67     65     112    110     9
  67     65     112    113     9

```



## 9.2.2. PARÂMETROS ADICIONADOS NO GROMOS54A7

### 9.2.2.1. Peptídeos R3S5

```

[ atoms ]
; nr      type  resnr atom
; residue 1     GLU  GLU
  1      NL    1     N
  2      H     1     H1
  3      H     1     H2
  4      H     1     H3
  5      CH1   1     CA
  6      CH2   1     CB
  7      CH2   1     CG
  8      C     1     CD
  9      OM    1     OE1
 10      OM    1     OE2
 11      C     1     C
 12      O     1     O
; residue 2     TRP  TRP
 13      N     2     N
 14      H     2     H
 15      CH1   2     CA
 16      CH2   2     CB
 17      C     2     CG
 18      C     2     CD1
 19      HC    2     HD1
 20      C     2     CD2
 21      NR    2     NE1
 22      H     2     HE1
 23      C     2     CE2
 24      C     2     CE3
 25      HC    2     HE3
 26      C     2     CZ2
 27      HC    2     HZ2
 28      C     2     CZ3
 29      HC    2     HZ3
 30      C     2     CH2
 31      HC    2     HH2
 32      C     2     C
 33      O     2     O
; residue 3     ALA  ALA
 34      N     3     N
 35      H     3     H
 36      CH1   3     CA
 37      CH3   3     CB
 38      C     3     C
 39      O     3     O
; residue 4     D3R  D3R
 40      N     4     N
 41      H     4     H
 42      C     4     CA
 43      CH3   4     CB1
 44      CH2   4     CB2
 45      CR1   4     CG
 46      CR1   4     CD
 47      C     4     C
 48      O     4     O
; residue 5     THR  THR
 49      N     5     N
 50      H     5     H
 51      CH1   5     CA
 52      CH1   5     CB
 53      OA    5     OG1
 54      H     5     HG1
 55      CH3   5     CG2
 56      C     5     C
 57      O     5     O
; residue 6     ALA  ALA
 58      N     6     N
 59      H     6     H
 60      CH1   6     CA
 61      CH3   6     CB
 62      C     6     C
 63      O     6     O
; residue 7     S3S  S3S
 64      N     7     N
 65      H     7     H
 66      C     7     CA
 67      CH3   7     CB1
 68      CH2   7     CB2
 69      CH2   7     CG
 70      CH2   7     CD
 71      C     7     C
 72      O     7     O
; residue 8     ALA  ALA
 73      N     8     N
 74      H     8     H
 75      CH1   8     CA
 76      CH3   8     CB
 77      C     8     C
 78      O     8     O
; residue 9     LYS  LYS
 79      N     9     N
 80      H     9     H
 81      CH1   9     CA
 82      CH2   9     CB
 83      CH2   9     CG
 84      CH2   9     CD
 85      CH2   9     CE
 86      NL    9     NZ
 87      H     9     HZ1

```

```

88   H   9   HZ2
89   H   9   HZ3
90   C   9   C
91   O   9   O
; residue 10 PHE PHE
92   N  10   N
93   H  10   H
94  CH1 10   CA
95  CH2 10   CB
96   C  10   CG
97   C  10   CD1
98  HC  10   HD1
99   C  10   CD2
100  HC  10   HD2
101  C  10   CE1
102  HC  10   HE1
103  C  10   CE2
104  HC  10   HE2
105  C  10   CZ
106  HC  10   HZ
107  C  10   C
108  O  10   O
; residue 11 LEU LEU
109  N  11   N
110  H  11   H
111  CH1 11   CA
112  CH2 11   CB
113  CH1 11   CG
114  CH3 11   CD1
115  CH3 11   CD2
116  C  11   C
117  O  11   O
; residue 12 ALA ALA
118  N  12   N
119  H  12   H

120  CH1 12   CA
121  CH3 12   CB
122  C  12   C
123  O  12   O
; residue 13 ALA ALA
124  N  13   N
125  H  13   H
126  CH1 13   CA
127  CH3 13   CB
128  C  13   C
129  O  13   O
; residue 14 HIS HISA
130  N  14   N
131  H  14   H
132  CH1 14   CA
133  CH2 14   CB
134  C  14   CG
135  NR  14   ND1
136  C  14   CD2
137  HC  14   HD2
138  C  14   CE1
139  HC  14   HE1
140  NR  14   NE2
141  H  14   HE2
142  C  14   C
143  O  14   O
; residue 15 ALA ALA
144  N  15   N
145  H  15   H
146  CH1 15   CA
147  CH3 15   CB
148  C  15   C
149  OM  15   O1
150  OM  15   O2

```

[ bonds ]

```

; ai  aj  funct
  46  70   2    gb_27

```

[ pairs ]

```

; ai  aj  funct
  45  70   1
  46  69   1

```

[ angles ]

```

; ai  aj  ak  funct
  45  46  70   2    ga_27
  46  70  69   2    ga_27

```

[ dihedrals ]

```

; ai  aj  ak  al  funct  c0  c1  c2  c3  c4  c5
  42  44  45  46   3    2.885 4.17 7.8 4.4 0.0 0.0
  45  46  70  69   3    2.885 4.17 7.8 4.4 0.0 0.0

```

### 9.2.2.2. Peptides R5S3

```

[ atoms ]
; nr      type  resnr atom
; residue 1     GLU  GLU
  1      NL    1     N
  2      H     1     H1
  3      H     1     H2
  4      H     1     H3
  5      CH1   1     CA
  6      CH2   1     CB
  7      CH2   1     CG
  8      C     1     CD
  9      OM    1     OE1
 10     OM    1     OE2
 11     C     1     C
 12     O     1     O
; residue 2     TRP  TRP
 13     N     2     N
 14     H     2     H
 15     CH1   2     CA
 16     CH2   2     CB
 17     C     2     CG
 18     C     2     CD1
 19     HC    2     HD1
 20     C     2     CD2
 21     NR    2     NE1
 22     H     2     HE1
 23     C     2     CE2
 24     C     2     CE3
 25     HC    2     HE3
 26     C     2     CZ2
 27     HC    2     HZ2
 28     C     2     CZ3
 29     HC    2     HZ3
 30     C     2     CH2
 31     HC    2     HH2
 32     C     2     C
 33     O     2     O
; residue 3     ALA  ALA
 34     N     3     N
 35     H     3     H
 36     CH1   3     CA
 37     CH3   3     CB
 38     C     3     C
 39     O     3     O
; residue 4     S3R  S3R
 40     N     4     N
 41     H     4     H
 42     C     4     CA
 43     CH3   4     CB1
 44     CH2   4     CB2
 45     CH2   4     CG
 46     CH2   4     CD
 47     C     4     C
 48     O     4     O
; residue 5     THR  THR
 49     N     5     N
 50     H     5     H
 51     CH1   5     CA
 52     CH1   5     CB
 53     OA    5     OG1
 54     H     5     HG1
 55     CH3   5     CG2
 56     C     5     C
 57     O     5     O
; residue 6     ALA  ALA
 58     N     6     N
 59     H     6     H
 60     CH1   6     CA
 61     CH3   6     CB
 62     C     6     C
 63     O     6     O
; residue 7     D3S  D3S
 64     N     7     N
 65     H     7     H
 66     C     7     CA
 67     CH3   7     CB1
 68     CH2   7     CB2
 69     CR1   7     CG
 70     CR1   7     CD
 71     C     7     C
 72     O     7     O
; residue 8     ALA  ALA
 73     N     8     N
 74     H     8     H
 75     CH1   8     CA
 76     CH3   8     CB
 77     C     8     C
 78     O     8     O
; residue 9     LYS  LYSH
 79     N     9     N
 80     H     9     H
 81     CH1   9     CA
 82     CH2   9     CB
 83     CH2   9     CG
 84     CH2   9     CD
 85     CH2   9     CE
 86     NL    9     NZ
 87     H     9     HZ1
 88     H     9     HZ2
 89     H     9     HZ3
 90     C     9     C
 91     O     9     O
; residue 10    PHE  PHE
 92     N     10    N
 93     H     10    H
 94     CH1   10    CA
 95     CH2   10    CB
 96     C     10    CG
 97     C     10    CD1
 98     HC    10    HD1
 99     C     10    CD2
100    HC    10    HD2
101    C     10    CE1
102    HC    10    HE1
103    C     10    CE2
104    HC    10    HE2

```

```

105  C    10    CZ
106  HC   10    HZ
107  C    10    C
108  O    10    O
; residue 11    LEU    LEU
109  N    11    N
110  H    11    H
111  CH1  11    CA
112  CH2  11    CB
113  CH1  11    CG
114  CH3  11    CD1
115  CH3  11    CD2
116  C    11    C
117  O    11    O
; residue 12    ALA    ALA
118  N    12    N
119  H    12    H
120  CH1  12    CA
121  CH3  12    CB
122  C    12    C
123  O    12    O
; residue 13    ALA    ALA
124  N    13    N
125  H    13    H
126  CH1  13    CA
127  CH3  13    CB

128  C    13    C
129  O    13    O
; residue 14    HIS    HISA
130  N    14    N
131  H    14    H
132  CH1  14    CA
133  CH2  14    CB
134  C    14    CG
135  NR   14    ND1
136  C    14    CD2
137  HC   14    HD2
138  C    14    CE1
139  HC   14    HE1
140  NR   14    NE2
141  H    14    HE2
142  C    14    C
143  O    14    O
; residue 15    ALA    ALA
144  N    15    N
145  H    15    H
146  CH1  15    CA
147  CH3  15    CB
148  C    15    C
149  OM   15    O1
150  OM   15    O2

```

[ bonds ]

```

; ai  aj  funct
  46  70   2    gb_27

```

[ pairs ]

```

; ai  aj  funct
  44  70   1
  45  69   1
  46  68   1

```

[ angles ]

```

; ai  aj  ak  funct
  45  46  70   1    ga_15
  46  70  69   1    ga_27

```

[ dihedrals ]

```

; ai  aj  ak  al  funct    c0    c1    c2    c3    c4    c5
  45  46  70  69   3    2.885  4.17  7.8   4.4  0.0  0.0
  66  68  69  70   3    2.885  4.17  7.8   4.4  0.0  0.0

```

### 9.2.2.3. Peptides R5S5

[ atoms ]

```

; nr  type  resnr  atom
; residue 1    GLU    GLU
  1    NL    1     N
  2    H     1     H1
  3    H     1     H2
  4    H     1     H3
  5    CH1   1     CA
  6    CH2   1     CB
  7    CH2   1     CG

  8    C     1     CD
  9    OM    1     OE1
 10    OM    1     OE2
 11    C     1     C
 12    O     1     O
; residue 2    TRP    TRP
 13    N     2     N
 14    H     2     H
 15    CH1   2     CA

```

16	CH2	2	CB		71	CR1	7	CE	
17	C	2	CG		72	CR1	7	CZ	
18	C	2	CD1		73	C	7	C	
19	HC	2	HD1		74	O	7	O	
20	C	2	CD2		; residue		8	ALA	ALA
21	NR	2	NE1		75	N	8	N	
22	H	2	HE1		76	H	8	H	
23	C	2	CE2		77	CH1	8	CA	
24	C	2	CE3		78	CH3	8	CB	
25	HC	2	HE3		79	C	8	C	
26	C	2	CZ2		80	O	8	O	
27	HC	2	HZ2		; residue		9	LYS	LYSH
28	C	2	CZ3		81	N	9	N	
29	HC	2	HZ3		82	H	9	H	
30	C	2	CH2		83	CH1	9	CA	
31	HC	2	HH2		84	CH2	9	CB	
32	C	2	C		85	CH2	9	CG	
33	O	2	O		86	CH2	9	CD	
; residue		3	ALA	ALA	87	CH2	9	CE	
34	N	3	N		88	NL	9	NZ	
35	H	3	H		89	H	9	HZ1	
36	CH1	3	CA		90	H	9	HZ2	
37	CH3	3	CB		91	H	9	HZ3	
38	C	3	C		92	C	9	C	
39	O	3	O		93	O	9	O	
; residue		4	S3S	S3S	; residue		10	PHE	PHE
40	N	4	N		94	N	10	N	
41	H	4	H		95	H	10	H	
42	C	4	CA		96	CH1	10	CA	
43	CH3	4	CB1		97	CH2	10	CB	
44	CH2	4	CB2		98	C	10	CG	
45	CH2	4	CG		99	C	10	CD1	
46	CH2	4	CD		100	HC	10	HD1	
47	C	4	C		101	C	10	CD2	
48	O	4	O		102	HC	10	HD2	
; residue		5	THR	THR	103	C	10	CE1	
49	N	5	N		104	HC	10	HE1	
50	H	5	H		105	C	10	CE2	
51	CH1	5	CA		106	HC	10	HE2	
52	CH1	5	CB		107	C	10	CZ	
53	OA	5	OG1		108	HC	10	HZ	
54	H	5	HG1		109	C	10	C	
55	CH3	5	CG2		110	O	10	O	
56	C	5	C		; residue		11	LEU	LEU
57	O	5	O		111	N	11	N	
; residue		6	ALA	ALA	112	H	11	H	
58	N	6	N		113	CH1	11	CA	
59	H	6	H		114	CH2	11	CB	
60	CH1	6	CA		115	CH1	11	CG	
61	CH3	6	CB		116	CH3	11	CD1	
62	C	6	C		117	CH3	11	CD2	
63	O	6	O		118	C	11	C	
; residue		7	D5R	D5R	119	O	11	O	
64	N	7	N		; residue		12	ALA	ALA
65	H	7	H		120	N	12	N	
66	C	7	CA		121	H	12	H	
67	CH3	7	CB1		122	CH1	12	CA	
68	CH2	7	CB2		123	CH3	12	CB	
69	CH2	7	CG		124	C	12	C	
70	CH2	7	CD		125	O	12	O	

```

; residue      13      ALA      ALA
126  N      13      N
127  H      13      H
128  CH1     13      CA
129  CH3     13      CB
130  C      13      C
131  O      13      O
; residue      14      HIS      HISA
132  N      14      N
133  H      14      H
134  CH1     14      CA
135  CH2     14      CB
136  C      14      CG
137  NR      14      ND1
138  C      14      CD2
[ bonds ]
; ai      aj      funct
  46      72      2      gb_27

[ pairs ]
; ai      aj      funct
  45      72      1
  46      71      1

[ angles ]
; ai      aj      ak      funct
  45      46      72      1      ga_15
  46      72      71      1      ga_27

[ dihedrals ]
; ai      aj      ak      al      funct      c0      c1      c2      c3      c4      c5
  45      46      72      71      3      2.885      4.17      7.8      4.4      0.0      0.0
  69      70      71      72      3      2.885      4.17      7.8      4.4      0.0      0.0

```

## 10. CURRICULUM VITÆ

### I. DADOS PESSOAIS

**Nome:**

Bianca Villavicencio

**Local e data de nascimento:**

Bento Gonçalves - RS, Brasil, 01/01/1990.

**Endereço Profissional:**

Grupo de Bioinformática Estrutural

Laboratório 202 - Centro de Biotecnologia

Universidade Federal do Estado do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Porto Alegre, RS, Brasil

CEP 91500 970

**Telefone Profissional:**

+55 51 33087770

**E-mail:**

bia.villavicencio@gmail.com

bvillav@cbiot.ufrgs.br

### II. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, de 2009/1 a 2013/2, com período sanduíche em Pomona College, Estados Unidos.

### III. ESTÁGIOS

2010 – 2011

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Bolsista PIBIC – CNPq

Profa. Dra. Guendalina Turcato Oliveira - Laboratório de Fisiologia da Conservação

Projeto de avaliação do impacto ambiental de metabólitos produzidos por *Pinus* sp. (CONIFERAE) utilizando indicadores biológicos autóctones.

2011 – 2012

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Bolsista BPA/PUCRS

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. - Laboratório de Bioquímica Estrutural.

Projeto de computação biologicamente inspirada aplicada ao estudo da interação proteína-ligante com ênfase em novos candidatos a fármacos anticoagulantes.

2013 – 2013

Pomona College, Califórnia, Estados Unidos

André Ricardo de Oliveira Cavalcanti – Department of Biology

Bolsista Ciência sem Fronteiras - CAPES

Análise de relações filogenéticas de eucariotos através de avaliação da rota de salvamento de metionina.

2013 – 2014

CLONAGRO Comércio e Produção Vegetal LTDA

Produção *in vitro* de mudas de orquídea; Desenvolvimento de produto: cogumelos comestíveis para cultivo em casa.



#### IV. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

AZEVEDO, L. S.; MORAES, F. P.; XAVIER, M. M.; PANTOJA, E. O.; **VILLAVICENCIO, B.**; FINCK, J. A.; PROENCA, A. M.; ROCHA, K. B.; AZEVEDO JR., W. F. Recent Progress of Molecular Docking Simulations Applied to Development of Drugs. *Current Bioinformatics*, v. 7, p. 352-365, 2012.

#### V. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

##### a. Nacionais:

**Villavicencio, B.**; Braun, R. L.; Verli, H. **2014**. Parametrização de estabilizadores conformacionais com potencial biotecnológico. *Anais da VII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos*, 16. VII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, 18 a 22 de agosto de 2014, Petrópolis, RJ, Brasil.

**Villavicencio, B.**; Braun, R. L.; Verli, H. **2015**. Molecular dynamics of stapled peptides. Escola Gaúcha de Bioinformática, 27 a 31 de julho de 2015, Porto Alegre, RS, Brasil.

##### b. Internacionais:

**Villavicencio, B.**; Braun, R. L.; Verli, H. **2015**. Molecular dynamics of stapled peptides. *Abstract Book of the 23<sup>rd</sup> IUBMB Congress and 44<sup>th</sup> Annual Meeting of SBBq*, C-059. 23<sup>rd</sup> IUBMB Congress and 44<sup>th</sup> Annual Meeting of SBBq, 24 a 28 de agosto de 2015, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

#### VI. Bolsa recebida

Bolsista CNPq do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS, a partir de março de 2014.