

## ESTUDO DA ESTRUTURA E DA SOLVATAÇÃO DO HNP-3, UM ANTIBIÓTICO NATURAL, POR DINÂMICA MOLECULAR

Adriana M. Namba e Léo Degève\*

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901 Ribeirão Preto - SP

Recebido em 27/11/02; aceito em 3/7/03

STUDY OF THE STRUCTURE AND SOLVATION OF THE HNP-3, A NATURAL ANTIBIOTIC, BY MOLECULAR DYNAMICS. The structure and hydration of the HNP-3 have been derived from molecular dynamics data using root mean square deviation, radial and energy distributions. Three antiparallel  $\beta$  sheets were found to be preserved. 15 intramolecular hydrogen bonds were identified together with 36 hydrogen bonds on the backbone and 35 on the side chain atoms. From the point of view of the hydration dynamics, the analysis shows a high solvent accessibility of the monomer and attractive interactions with water molecules.

Keywords: defensin; molecular dynamics; solvation.

## INTRODUÇÃO

O aumento da resistência das linhagens de bactérias aos antibióticos convencionais tem despertado, progressivamente, o interesse pelos peptídeos antimicrobianos naturais. As  $\alpha$ -defensinas HNP-1, 2 e 3 compreendem uma família de peptídeos catiônicos, de baixo peso molecular (< 3500 Da), encontrada em altas concentrações nos grânulos azurófilos dos neutrófilos humanos<sup>1</sup>. Estudos comprovam que esses peptídeos apresentam potente atividade antimicrobiana, *in vitro*, contra uma vasta gama de agentes patogênicos, incluindo bactérias<sup>2</sup>, fungos<sup>3</sup>, vírus<sup>4</sup> e células tumorais<sup>5</sup>. Evidências sugerem que todas as defensinas atuam através da permeabilização da membrana celular do organismo patogênico<sup>6,7</sup>, mas os detalhes do processo lítico ainda não estão esclarecidos.

Muitas das propriedades das proteínas dependem da forma pela qual elas interagem com o solvente<sup>8</sup>. Como a água é o fluido biológico mais abundante, o conhecimento da estrutura e solvatação dos peptídeos antimicrobianos, em solução aquosa, é um passo inicial para o entendimento de sua ação antibiótica. A defensina HNP-3 ("Human Neutrophil Peptide"-3) é constituída por 30 aminoácidos. A análise da estrutura cristalina revela que esse peptídeo existe como dímero formado pelos monômeros A e B, constituídos de três folhas  $\beta$  antiparalelas, estabilizadas por ligações de hidrogênio, ligações -S-S e interações hidrofóbicas<sup>9</sup>. Essa característica estrutural, diferentemente de outros peptídeos líticos, sugere os mecanismos pelos quais essa defensina deve se ligar e desestabilizar os lipídeos de membranas<sup>9,10</sup>.

Como primeiro passo dos estudos da defensina HNP-3, o presente trabalho propõe-se estudar o comportamento do monômero em meio aquoso. Posteriormente, o estudo será estendido à forma dimerica e ao seu modo de ação na danificação de membranas celulares.

Com o avanço das técnicas computacionais, as simulações de dinâmica molecular têm sido muito utilizadas em estudos de sistemas moleculares complexos<sup>11-13</sup>. O método de DM resolve as equações de movimento de Newton para um sistema molecular, o que resulta em trajetórias para todos os átomos presentes<sup>14</sup>. Desta forma,

a partir das trajetórias atômicas é possível calcular e analisar uma variedade de propriedades importantes nos processos bioquímicos como, por exemplo, a estrutura e hidratação de biomoléculas<sup>15</sup>.

## MÉTODOS

## Simulações de dinâmica molecular

Os modelos de proteínas devem levar em conta a existência de vários graus de liberdade internos, além das interações intermoleculares. Isto resulta em energias, numa classificação simples, de vibração (alongamento, angular e torção), de atração-repulsão e de interações puramente eletrostáticas. Dos campos de força disponíveis, um adequado para a simulação de biomoléculas, em solução aquosa, é o chamado GROMOS96<sup>16</sup>, que foi escolhido por ter sido parametrizado exatamente para esta finalidade. Como é usual e para maior facilidade de entendimento e uso, este potencial de interação intramolecular efetivo é desmembrado segundo os vários graus de liberdade presentes. Isso resulta nas seguintes energias de interação:

## Vibração

$$V_1(r_{i,j}) = \frac{1}{4} K_{vib} [r_{ij}^2 - r_0^2]^2 \quad (1)$$

onde  $r_{ij}$  é a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ ;  $K_{vib}$  é uma constante ajustada para descrever a vibração específica que tem  $r_0$  como distância de equilíbrio.

## Vibração angular

$$V_2(\theta) = \frac{1}{2} K_\theta [\cos(\theta) - \cos(\theta^0)]^2 \quad (2)$$

onde  $K_\theta$  é uma constante a ser ajustada para descrever a vibração angular específica que tem  $\theta^0$  como ângulo de equilíbrio.

## Vibração diedral imprópria

$$V_3(\xi) = \frac{1}{2} K_\xi [\xi - \xi^0]^2 \quad (3)$$

\*e-mail: leo@obelix.ffclrp.usp.br

onde  $K_\xi$  é uma constante a ser ajustada para descrever a vibração diedral imprópria específica que tem  $\xi^0$  como ângulo de equilíbrio. Se esta ocorrer entre átomos 1-2-3-4, tem-se que:

$$\vec{R}_{\alpha,2} = \vec{r}_{1,2} \times \vec{r}_{3,2} \text{ et } \vec{R}_{\alpha,3} = \vec{r}_{3,2} \times \vec{r}_{3,4}$$

$$\xi_n = \text{sign}(\xi_n) \cdot \arccos \frac{\vec{R}_{\alpha,2} \cdot \vec{R}_{\alpha,3}}{R_{\alpha,2} \cdot R_{\alpha,3}} \quad (4)$$

onde  $\text{sign}(\xi_n) = \text{sign}(\vec{r}_{1,2} \cdot \vec{R}_{\alpha,3})$  e é o sinal de  $\vec{r}_{1,2} \cdot \vec{R}_{\alpha,3}$ .

*Vibração diedral*

$$V_4(\varphi) = \frac{1}{2} K_\varphi [1 + \cos(\delta) \cos(m\varphi)] \quad (5)$$

onde  $K_\varphi$  e  $\delta$  são constantes que devem ser ajustadas para descrever a vibração diedral específica. Se a vibração diedral ocorrer entre os átomos 1-2-3-4, tem-se que:

$$\vec{R}_{1,\alpha} = \vec{r}_{1,2} - \frac{(\vec{r}_{1,2} \cdot \vec{r}_{3,2}) \cdot \vec{r}_{3,2}}{r_{3,2}^2}$$

$$\vec{R}_{4,\beta} = -\vec{r}_{3,4} + \frac{(\vec{r}_{3,4} \cdot \vec{r}_{3,2}) \cdot \vec{r}_{3,2}}{r_{3,2}^2} \quad (6)$$

$$\varphi = \text{sign}(\varphi) \cdot \arccos \frac{\vec{R}_{1,\alpha} \cdot \vec{R}_{4,\beta}}{R_{1,\alpha} \cdot R_{4,\beta}}$$

onde

$$\cos(\varphi) = \cos \frac{\vec{R}_{1,\alpha} \cdot \vec{R}_{4,\beta}}{R_{1,\alpha} \cdot R_{4,\beta}}$$

onde o índice  $m$  é igual a 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, definindo sete funções diferentes  $\cos(m\varphi)$ .

*Interações entre átomos não ligados*

Essas interações são subdivididas em um termo de interação 6-12, energias de van der Waals, abrangendo todas as interações não coulombianas, compreendendo as interações entre dipolos induzidos ou não, energias de superposição e de dispersão,  $V_{6-12}(r_{ij})$ , e as interações coulombianas,  $V_{Coulomb}(r_{ij})$ :

$$V_{6-12}(r_{ij}) = \frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i,j)}{r_{ij}^6} \quad (7)$$

$$V_{Coulomb}(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon} \left[ \frac{1}{r_{ij}} + \frac{a_{CR}}{r_{ij}} + b_{CR} r_{ij}^2 + c_{CR} \right] \quad (8)$$

onde  $r_{ij}$  é a distância entre os centros interativos  $i$  e  $j$ ,  $C_{12}$  e  $C_6$  são parâmetros,  $q_i$  é a carga do átomo  $i$ ,  $\epsilon_0$  é a permissividade do vácuo,  $\epsilon$  é a permissividade do meio e  $\frac{a_{CR}}{r_{ij}} + b_{CR} r_{ij}^2 + c_{CR}$  é o potencial coulombiano e as contribuições do campo de reação<sup>17</sup>.

Para desenvolver uma simulação parte-se de uma geometria inicial, determinada experimentalmente por difração de raios-X no estado cristalino ou por RMN, que pode ser adquirida de algum banco de dados, como o PDB ("Protein Data Bank")<sup>18</sup>, que utiliza o código 1dfn para o HNP-3<sup>9</sup>.

O monômero de HNP-3 foi colocado no centro de uma caixa cúbica com dimensões de 49,24×49,24×49,24 Å<sup>3</sup>, contendo água à concentração de 55,5 M. Um número de moléculas de água foi removido para acomodar o peptídeo dentro da caixa, resultando em um sistema com 3777 moléculas de água, as quais foram descritas pelo modelo SPC/E<sup>19</sup>. Quatro íons cloreto e dois íons sódio foram adicionados para manter a eletroneutralidade local. As simulações de DM foram desenvolvidas no "ensemble" NVT a 298K, usando condições periódicas e

convenção de imagem mínima<sup>14,20</sup>. Um "cutoff" em 1,0 nm foi aplicado juntamente com um campo de reação generalizado de Poisson-Boltzmann<sup>17</sup>, para indicar interações eletrostáticas de longo alcance. As equações de movimento foram integradas usando o algoritmo de Verlet<sup>17</sup>, com um intervalo de tempo de integração de 2,0 fs para uma trajetória de 2,0 ns. O algoritmo SHAKE<sup>21</sup> foi utilizado para restringir todos os comprimentos de ligação. As trajetórias foram gravadas, para análise subsequente, a cada 0,02 ps.

### Ligações de hidrogênio intermoleculares

Ligações de hidrogênio (LH) são ligações formadas pelo recobrimento de um par eletrônico de um átomo de oxigênio com a carga positiva de um átomo de hidrogênio. As energias destas LH encontram-se na faixa de -5 a -15 kcal/mol e a distância entre os átomos de oxigênio e de hidrogênio na faixa de 2 Å. A presença de uma ou mais moléculas nesta distância é facilmente detectada pela função de distribuição radial e a energia atrativa, pela distribuição das energias de interação entre os átomos do soluto e as moléculas de água. Deste modo, as LH entre os átomos da proteína e as moléculas de água foram caracterizadas utilizando as funções de distribuição radial e, simultaneamente, as distribuições de energia de pares calculados entre átomos de soluto selecionados e moléculas de água.

A função de distribuição radial é definida pela Equação 9<sup>14,22</sup>:

$$g_{AW}(r) = \frac{n_W(r)V}{\Delta V N_W} \quad (9)$$

onde  $A$  corresponde aos átomos do polipeptídeo e  $W$ , aos átomos de hidrogênio ( $H_W$ ) ou de oxigênio ( $O_W$ ) das moléculas de água;  $n_W(r)$  é o número médio de átomos  $W$  encontrados no volume  $\Delta V$  a uma distância  $r$  do átomo  $A$ .  $V$  é o volume total do sistema que contém  $N_W$  átomos do tipo  $W$ .

O número de hidratação é o número de moléculas de água presente na primeira camada de solvatação do átomo. Uma vez que  $\frac{N_W}{V} g_{AW}(r)$  representa o número de moléculas de água a uma distância  $r$  de  $A$ , o número de hidratação,  $(N_h)^{14,22}$ , será a integral:

$$N_h = \frac{N_W}{V} 4\pi \int_0^{r_{\min}} g_{AW}(r) r^2 dr \quad (10)$$

onde  $r_{\min}$  é a posição do primeiro mínimo de  $g_{AW}(r)$ , que identifica a espessura da camada de hidratação.

Quando  $g_{AW}(r)$  apresenta um pico nas regiões apropriadas e  $N_h$  maior que 0,1, sugere-se a existência de uma LH confirmada, ou não, pela distribuição de energia correspondente. As distribuições de energia entre átomos de soluto e moléculas de água permitem identificar as ligações de hidrogênio intermoleculares e calcular suas energias médias,  $\langle E \rangle$ <sup>22</sup>. A presença de um pico (ou ombro), nas regiões de energia iguais ou menores que -5 kcal/mol, caracteriza a presença das LH intermoleculares. A área do pico até  $E_{\min}$  gera o número de ligações de hidrogênio,  $n_{HB}$ , sendo que  $E_{\min}$  é a energia do mínimo (-5 kcal/mol; ver Figura 7).

### Ligações de hidrogênio intramoleculares

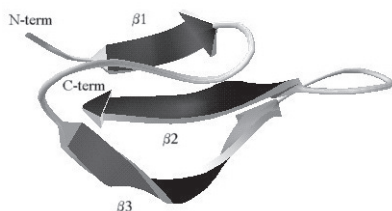
Os critérios utilizados para a identificação das ligações de hidrogênio intramoleculares no monômero de HNP-3 foram: (a) máximo da função de distribuição radial ( $g_{AW}(r)$ ) a uma distância máxima  $H \dots$  receptor de 2,35 Å e (b) uma porcentagem de ocorrência,  $PO$ ,

maior que 10%. O procedimento para a identificação e caracterização das ligações de hidrogênio foi realizado em dois passos. Inicialmente, os pares H...receptor, com porcentagem de ocorrência maior que 10% até uma distância interatômica de 3,0 Å, foram identificados. Em seguida, as funções de distribuição radial para esses pares de átomos foram calculadas para manter somente os pares onde os máximos das  $g_{AW}(r)$  fossem encontrados para distâncias menores ou iguais a 2,35 Å.

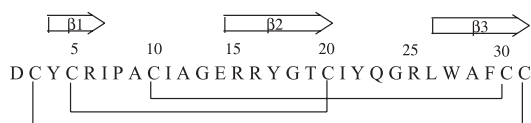
## RESULTADOS

### Análise estrutural

A estrutura tridimensional do monômero de HNP-3 (Figura 1), obtida das simulações de DM em solução aquosa, possui um par de folhas  $\beta$  antiparalelas (folhas  $\beta 2$  e  $\beta 3$ ) ligadas por uma pequena volta, formando um grampo  $\beta$  que compreende os 17 resíduos finais (Figura 2). Além disso, o monômero de HNP-3 possui uma folha  $\beta$ , próxima ao grupo amino terminal, que se encontra interligada com o grampo  $\beta$  através de LH intramoleculares. Assim, a folha  $\beta 1$  (Tyr4 à Arg6) apresenta interligação com a folha  $\beta 3$  (Trp27 à Cys31) que, por sua vez, liga-se à folha  $\beta 2$  (Arg15 à Cys 20), gerando três folhas  $\beta$  antiparalelas (Figuras 1 e 2). A extensão das folhas  $\beta$  está limitada pela presença de duas voltas definidas pelos resíduos Ile7 à Glu14 (volta 1) e Ile21 à Leu 26 (volta 2) (Figura 2).



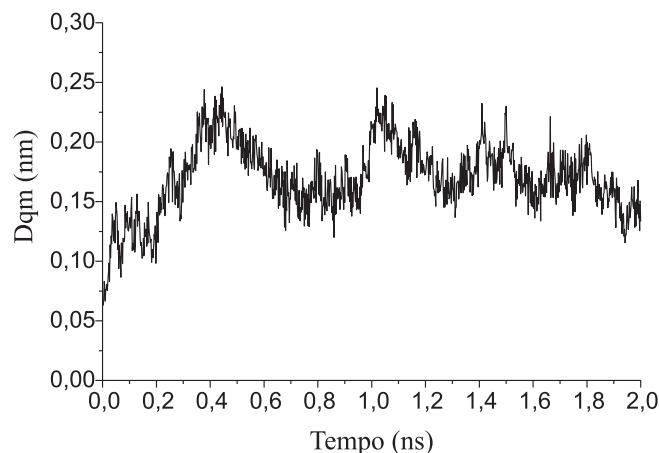
**Figura 1.** Conformação do monômero de HNP-3 no último passo de simulação. As folhas  $\beta$  antiparalelas estão representadas com setas. A figura foi preparada usando o programa Swiss PDB Viewer<sup>27</sup>



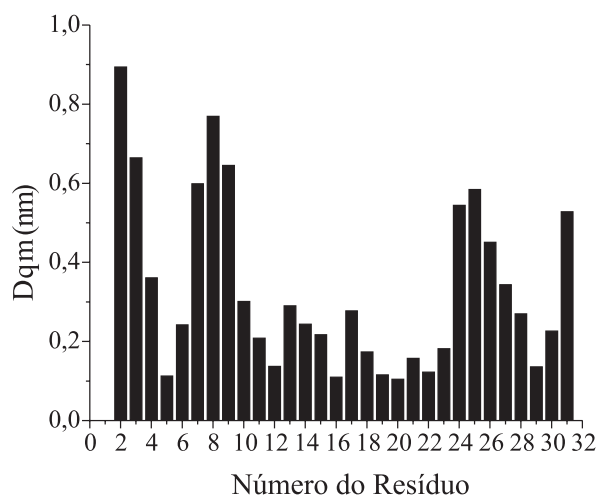
**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura secundária da defensina HNP-3. Os aminoácidos estão representados por códigos de uma letra<sup>23</sup>. As linhas conectando as cisteínas representam as ligações -S-S-

O comportamento do monômero de HNP-3 em solução foi analisado pela trajetória dos seus átomos ao longo do tempo. Para a análise das mudanças estruturais desse peptídeo, com relação à estrutura obtida por raios-X, os desvios quadráticos médios (dqms) dos átomos da cadeia principal foram utilizados como parâmetro de mobilidade. Assim, foi observado que, em meio aquoso, o monômero não sofre mudanças significativas com relação à estrutura de partida, uma vez que os dqms variam de 0,11 a 0,25 nm (Figura 3). Os ângulos de Ramachandran<sup>23</sup> indicam que a estrutura da cadeia principal está em excelente acordo com os dados experimentais (dados não mostrados). A Figura 4 ilustra os dqms para os resíduos do monômero que foram obtidos pela média, ao longo da simulação, dos desvios quadráticos de cada resíduo observados na sobreposição do peptídeo com a referência. Esses resultados mostram que as regiões de maior

flexibilidade compreendem as regiões das voltas, envolvendo, principalmente, os resíduos localizados próximo às Cys3, Pro8 e Arg25. Nas regiões próximas às Cys5, Arg15-Tyr22, Ala28-Cys30, regiões das folhas  $\beta$ , pouca flexibilidade foi observada. De um modo geral, a estrutura do monômero de HNP-3 mostrou-se bastante rígida e estável em meio aquoso.



**Figura 3.** O perfil dos dqms para os átomos da cadeia principal do monômero de HNP-3 com relação à estrutura obtida por raio-X



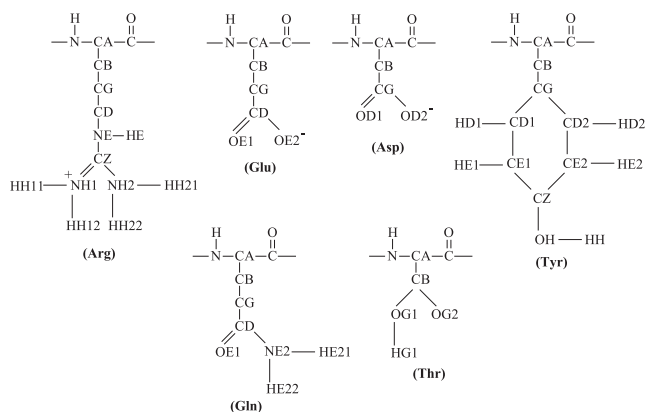
**Figura 4.** Os dqms dos resíduos do monômero de HNP-3 com relação à estrutura obtida por raio-X

### Ligações intramoleculares

As simbologias utilizadas para representar os átomos da cadeia principal e os das cadeias laterais do HNP-3 seguem a determinação IUPAC<sup>24</sup>. Assim, CO e NH correspondem aos átomos O dos grupos carbonílicos e H dos grupos amídicos da cadeia principal, respectivamente. A Figura 5 mostra as simbologias para os átomos das cadeias laterais dos resíduos polares presentes no monômero. Os átomos H e O das moléculas de água estão representados por H<sub>w</sub> e O<sub>w</sub>, respectivamente.

#### Ligações -O...H- e -S-S-

A Tabela 1 relaciona as ligações de hidrogênio intramoleculares encontradas, os valores das posições dos máximos ( $x_{max}$ ) das  $g_{AW}(r)$  entre H...receptor e respectivas porcentagens de ocorrência (PO). As ligações entre Tyr4(NH)-Cys30(CO), Tyr4(CO)-Cys30(NH),



**Figura 5.** Simbologia utilizada para a representação dos átomos das cadeias laterais dos resíduos polares presentes no monômero de HNP-3, de acordo com a recomendação IUPAC<sup>24</sup>

**Tabela 1.** Ligações de hidrogênio intramoleculares encontradas durante as simulações de DM. As porcentagens de ocorrência (PO) e as posições dos máximos ( $x_{max}$ ) para cada LH estão indicadas

Cadeia principal - Cadeia principal	$x_{max}$ (Å)	PO (%)
Asp2(NH1) - Cys31(CO)	2,25	30,2
Asp2(NH3) - Cys31(CO)	2,25	31,4
Tyr4(NH) - Cys30(CO)	2,05	98,7
Tyr4(CO) - Cys30(NH)	1,95	98,7
Arg6(NH) - Ala28(CO)	1,95	97,6
Arg6(CO) - Ala28(NH)	2,15	77,6
Ile11(CO) - Glu14(NH)	2,35	55,2
Arg15(NH) - Cys31(CO)	2,05	37,1
Arg15(CO) - Cys31(NH)	2,05	83,0
Tyr17(NH) - Phe29(CO)	1,95	96,9
Gly18(NH) - Phe29(CO)	2,35	47,7
Cys20(NH) - Trp27(CO)	1,85	98,8
Cys20(CO) - Trp27(NH)	2,35	80,4
Cadeia principal - Cadeia lateral		
Cys10(CO) - Arg16(HH22)	2,25	29,6
Leu26(CO) - Arg25(HH12)	2,05	28,6

Arg6(NH)-Ala28(CO) e Arg6(CO)-Ala28(NH), interligam as folhas  $\beta 1$  e  $\beta 3$ . As ligações de hidrogênio entre Arg15(NH)-Cys31(CO), Arg15(CO)-Cys31(NH), Cys20(NH)-Trp27(CO) e Cys20(CO)-Trp27(NH) interligam as folhas  $\beta 2$  e  $\beta 3$ . Assim, dos 14 resíduos que compõem as três folhas  $\beta$ , apenas três (Cys5, Thr19 e Arg16) não formam LH intramoleculares do tipo NH-CO, fato que comprova a disposição antiparalela das folhas  $\beta$ . Além disso, foi detectada a presença de uma saliência  $\beta^{25,26}$  envolvendo os resíduos Tyr17, Gly18 e Phe29 (Tyr17(NH)-Phe29(CO) e Gly18(NH)-Phe29(CO)). LH entre resíduos de uma mesma volta também são observadas entre Ile11(CO)-Glu14(NH) (volta 1) e Arg25(HH12)-Leu26(CO) (volta 2). Essas duas interações aparecem com baixa PO, possivelmente devido à competição com a formação de LH com as moléculas do solvente.

A LH observada entre Arg15(NH)-Cys31(CO) apresenta uma baixa ocorrência; isso ocorre devido à participação de Cys31(CO) em outras duas ligações de hidrogênio intramoleculares com dois dos átomos H do grupo amônio terminal, originando uma ponte sa-

lina (Tabela 1). Esse tipo de interação mantém as extremidades do monômero unidas e estabilizadas. A presença da ligação de hidrogênio entre Cys10(CO)-Arg16(HH22) faz com que a volta 1 apresente uma ligeira deformação (saliência). A volta 2 não se encontra estabilizada por qualquer ligação de hidrogênio intramolecular. Essas LH intramoleculares têm forte influência na manutenção da conformação antiparalela das três folhas  $\beta$ .

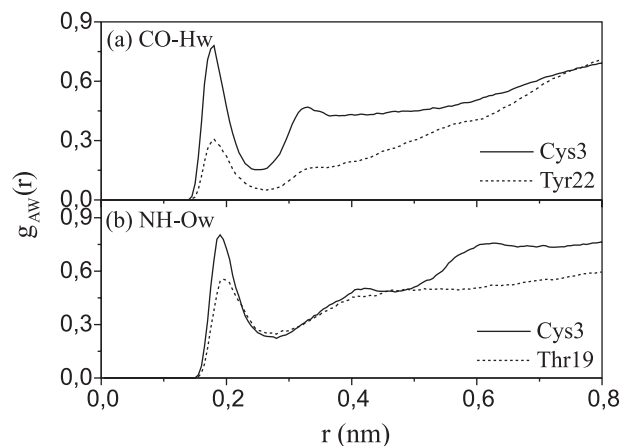
Um outro fator primordial na estabilização da estrutura tridimensional é a existência de pontes dissulfeto. Estas pontes são formadas por várias ligações químicas que são energeticamente mais estabilizadoras que as LH (a energia de dissociação de uma ponte -S-S- é cerca de 63 kcal/mol, enquanto que a energia de LH é da ordem de 10 kcal/mol). Entretanto, o número de pontes dissulfeto é menor que o número de LH. Na HNP-3 três pontes dissulfeto foram encontradas entre Cys5-Cys20, Cys3-Cys31 e Cys10-Cys30 (Figura 2). A ponte entre Cys5 e Cys20 mantém unidas as folhas  $\beta 2$  e  $\beta 3$ ; o par Cys3 e Cys31 mantém os resíduos C- e N- terminais espacialmente próximos e é responsável pela LH Asp2(NH)-Cys31(CO). A ponte Cys10-Cys30, além de impedir grandes movimentos da região próxima ao C-terminal, impede a flexibilidade dos resíduos presentes na volta 1. Dessa forma, as pontes participam ativamente da manutenção estrutural do grupo  $\beta$ , dificultando sua abertura. A presença dessas três ligações S-S é uma característica típica das defensinas<sup>1</sup>.

### Solvatação do HNP-3

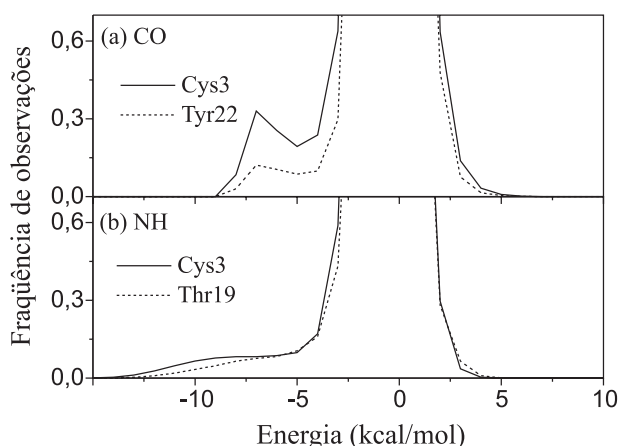
#### Solvatação dos átomos O e H da cadeia principal

A camada de solvatação envolvendo o esqueleto do monômero foi analisada através das funções de distribuição radial de pares,  $g_{AW}(r)$ , bem como através das informações sobre as distribuições de energia de interação entre átomos dos aminoácidos e as moléculas de água. Um perfil típico de  $g_{AW}(r)$  está ilustrado na Figura 6, para os átomos CO dos resíduos Tyr22 e Cys3 (Figura 6a), e para os átomos NH dos resíduos Thr19 e Cys3 (Figura 6b). A Figura 7 exemplifica as distribuições de energia para as moléculas de água e os átomos CO e NH da cadeia principal do peptídeo em estudo.

Quando há formação de LH entre CO-Hw, as funções de distribuição radial mostram máximos para os primeiros picos localizados por volta de 1,8 Å, com baixas intensidades variando de 0,22 (Tyr22) à 0,76 (Cys3) (Tabela 2). Entretanto, o número de ligações e suas  $\langle E \rangle$  estão condizentes com a formação de LH (Tabela 2). As distribuições de energia de pares mostram picos nas regiões apropriadas,



**Figura 6.** Funções de distribuição radial,  $g_{AW}(r)$  entre (a) átomos de hidrogênio da água (Hw) e oxigênio carbonílico (CO), da cadeia principal, dos resíduos Cys3 e Tyr22 e (b) átomo de oxigênio da água (Ow) e hidrogênio amídico (NH), da cadeia principal, dos resíduos Cys3 e Thr19



**Figura 7.** Distribuições de energia de pares entre (a) moléculas de água e átomos de oxigênios carbonílicos da cadeia principal (CO) dos resíduos Cys3 e Tyr22 e (b) moléculas de água e átomos de hidrogênios amídicos da cadeia principal (NH) dos resíduos Cys3 e Thr19

**Tabela 2.** Máximos ( $r_{max,1}$ , em Å) e intensidades ( $g_{max,1}$ ) dos primeiros picos das funções de distribuição radial dos CO da cadeia principal, que formam LH com a água. O número de LH ( $n_{HB}$ ), e suas energias médias ( $\langle E \rangle$ , em kcal/mol), estão indicados

Resíduo	$r_{max,1}$	$g_{max,1}$	$n_{HB}$	$\langle E \rangle$
Cys3	1,78	0,76	1,05	-6,39
Cys5	1,80	0,58	0,96	-6,02
Ile7	1,80	0,48	0,71	-6,26
Pro8	1,80	0,23	0,42	-5,92
Ala9	1,80	0,48	0,65	-6,37
Cys10	1,80	0,35	0,50	-6,29
Ile11	1,75	0,35	0,57	-6,38
Ala12	1,80	0,69	1,01	-6,31
Gly13	1,81	0,64	1,00	-6,24
Glu14	1,75	0,63	0,99	-6,08
Arg16	1,75	0,57	0,83	-6,30
Tyr17	1,80	0,59	0,92	-6,33
Gly18	1,80	0,27	0,42	-6,34
Thr19	1,80	0,55	0,82	-6,26
Ile21	1,80	0,74	1,06	-6,35
Tyr22	1,80	0,22	0,37	-6,21
Gln23	1,78	0,52	0,78	-6,38
Gly24	1,80	0,58	0,90	-6,29
Arg25	1,80	0,27	0,46	-6,18
Leu26	1,75	0,30	0,49	-6,17
Cys31	1,80	1,27	1,74	-9,90

com valores de  $\langle E \rangle$  variando de  $-5,92$  à  $-9,90$  kcal/mol (Tabela 2). Assim, os átomos CO dos resíduos Cys3, Cys5, Ile7, Pro8, Ala9, Cys10, Ile11, Ala12, Gly13, Glu14, Arg16, Tyr17, Gly18, Thr19, Ile21, Tyr22, Gln23, Gly24, Arg25 e Leu 26 formam LH com as moléculas de água (Tabela 2), como mostram as funções de distribuição radial. Por outro lado, os átomos CO dos resíduos Tyr4, Arg6, Arg15, Cys20, Trp27, Ala28, Phe29 e Cys30 estão envolvidos apenas em ligações de hidrogênio intramoleculares (Tabela 1), sendo inacessíveis às moléculas de solvente. No caso dos resíduos Cys10, Ile11, Leu26, os átomos de oxigênios da cadeia principal participam tanto de LH intramoleculares quanto de LH intermoleculares. Para o N-terminal não foi detectada LH do tipo CO...Hw.

No caso das  $g_{AW}(r)$  que detectam LH, a posição dos máximos dos primeiros picos encontra-se na faixa de 1,90 (Cys3) à 2,04 (Ala9) Å, com as intensidades variando de 0,20 (Thr19) à 0,81 (Cys3) (Tabela 3). As energias das ligações de hidrogênio entre átomos H do esqueleto e as moléculas de água também foram consideradas para esse estudo de solvatação. Assim, as distribuições de energia indicam que apenas os resíduos Cys3, Cys5, Ile7, Ala12, Gly13, Arg15, Arg16, Thr19, Ile21, Gly24 e Leu26 formam LH com as moléculas de água. Em todos esses casos, os perfis de distribuição de energia apresentam ombros, ao invés de picos, possibilitando a detecção de LH com o solvente (Tabela 3). A presença dessas interações são confirmadas pelas  $g_{AW}(r)$ . Os resíduos Tyr4, Arg6, Glu14, Tyr17, Gly18, Cys20, Trp27, Ala28, Cys30 e Cys31 são inacessíveis ao solvente e formam apenas ligações de hidrogênio intramoleculares. No caso da Arg15, os átomos H da cadeia principal participam tanto de LH intra quanto intermoleculares. Os átomos NH dos demais resíduos, Pro8, Ala9, Cys10, Ile11, Tyr22, Gln23, Arg25 e Phe29 não apresentaram quaisquer tipos de ligações de hidrogênio durante toda trajetória de simulação.

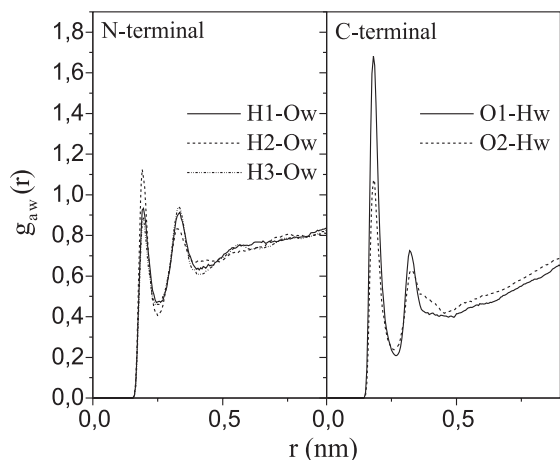
**Tabela 3.** Máximos ( $r_{max,1}$ , em Å) e intensidades ( $g_{max,1}$ ) dos primeiros picos das funções de distribuição radial dos NH da cadeia principal, que formam LH com a água. O número de LH ( $n_{HB}$ ), e suas energias médias ( $\langle E \rangle$ , em kcal/mol), estão indicados

Resíduo	$r_{max,1}$	$g_{max,1}$	$n_{HB}$	$\langle E \rangle$
Asp2 (H1)	1,95	0,95	0,92	-7,11
Asp2(H2)	1,90	0,89	0,87	-7,18
Asp3(H3)	1,95	0,76	0,76	-7,03
Cys3	1,90	0,81	0,74	-7,82
Cys5	1,95	0,71	0,56	-8,40
Ile7	1,95	0,34	0,35	-7,60
Ala9	2,04	0,28	0,33	-7,19
Ala12	1,95	0,54	0,58	-7,46
Gly13	1,95	0,66	0,66	-7,37
Arg15	1,95	0,35	0,31	-7,52
Arg16	1,89	0,69	0,64	-7,95
Thr19	2,02	0,20	0,57	-7,50
Ile21	2,03	0,39	0,45	-7,29
Gly24	1,95	0,54	0,53	-7,14
Leu26	1,95	0,40	0,43	-7,70

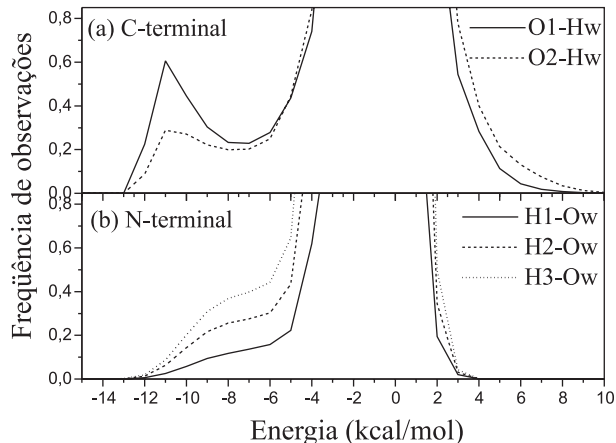
#### Solvatação de N- e C- terminais

As  $g_{AW}(r)$  dos pares átomos H do grupo amônio do N-terminal (Asp2) e átomos O da água (Figura 8) mostram máximos localizados na faixa de 1,91-1,95 Å, com intensidades variando de 0,76 (NH3) a 0,95 (NH1), resultando em 2,6 moléculas de água na camada de solvatação do grupo amônio. As distribuições de energia de pares, H-Ow, (Figura 9) embora não apresentem máximos, indicam a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, cujos números de ligações e suas respectivas  $\langle E \rangle$  estão indicadas na Tabela 3.

As funções de distribuição radial para os átomos de oxigênios carbonílicos do resíduo C-terminal e os átomos H das moléculas de água (Figura 8) mostram máximos por volta de 1,80 Å, com intensidade de 1,27 (Tabela 2). As distribuições de energia de pares, Figura 9, mostram a presença de um pico característico de LH, o que resulta em 1,7 ligações de hidrogênio por átomo de oxigênio, cujas energias encontram-se por volta de  $-10$  kcal/mol. Esses resultados demonstram a estabilidade da camada de solvatação desses átomos. Assim como as LH intramoleculares, essas LH com as moléculas de água também auxiliam na manutenção da proximidade entre os dois resíduos terminais.



**Figura 8.** Funções de distribuição radial,  $g_{AW}(r)$ , calculadas nas simulações de DM do monômero de HNP-3 entre N-terminal (Asp2) e C-terminal (Cys31) e os átomos O e H das moléculas de água



**Figura 9.** Distribuição de energia de pares entre (a) C-terminal e moléculas de água e (b) N-terminal e moléculas de água

#### Solvatação das cadeias laterais

O estudo da solvatação das cadeias laterais dos aminoácidos é considerado através da análise da interação dos grupos polares com as moléculas de água. O monômero de HNP-3 apresenta em sua estrutura primária 11 aminoácidos com cadeias laterais polares, das quais 4 são positivamente carregadas (Arg6, Arg15, Arg16 e Arg25), 2 negativamente (Glu14 e Asp2) e 5 não carregadas (Tyr4, Tyr17, Tyr22, Thr19 e Gln23).

Os perfis das  $g_{AW}(r)$  e das distribuições de energia, obtidas para os átomos das cadeias laterais do monômero, e as moléculas de água não serão representados.

#### Solvatação dos grupos laterais carregados positivamente

As  $g_{AW}(r)$  correspondentes aos pares átomos de hidrogênio dos grupos NHs da cadeia lateral das argininas, HH11, HH12, HH21, HH22 e HE, e átomos Ow da água, têm máximos localizados na faixa de 1,87 (HE(Arg16)) à 2,16 Å (HH22(Arg6)), com intensidades variando de 0,25 (HH12(Arg6)) a 0,81 (HE(Arg6)). As distribuições de energia de pares para esses átomos indicam que apenas HE(Arg6)-Ow e HE(Arg16)-Ow possuem picos característicos de LH, cujas áreas até  $E_{min}$  levam a 0,56 moléculas de água com energias favoráveis para essa interação. Para os demais pares, a presença

de ombros nas regiões de energia apropriada sugere que há formação de LH, cujos números estão na Tabela 4. A baixa acessibilidade dos átomos HH12(Arg25) e HH22(Arg16) às moléculas de água é explicada pela formação de LH intramoleculares com os grupos CO dos resíduos de Leu26 e Cys10, respectivamente (Tabela 1).

#### Solvatação dos grupos laterais carregados negativamente

As  $g_{AW}(r)$  para os átomos de oxigênio dos grupos carboxilatos de Asp2 (OD1 e OD2) e de Glu14 (OE1 e OE2) têm máximos localizados a 1,80 Å, com intensidades dos primeiros picos variando de 1,20 (OE2 e OE2) a 2,32 (OD1). Esses valores sugerem a existência de LH, que são confirmadas através das análises das distribuições de energia de pares. No caso de OE1 e OE2, foram encontradas 1,6 moléculas de água com energias consistentes com a existência de LH (Tabela 4). Nas vizinhanças de OD1 e OD2, foram encontradas 3,24 e 2,63 moléculas de água, respectivamente. Os valores de  $\langle E \rangle$  para essas ligações de hidrogênio encontram-se por volta de -10 kcal/mol, indicando que as energias são bem atrativas, ou seja, favoráveis à ocorrência desse tipo de interação. Em todos esses casos, as funções de distribuição radial e as distribuições de energia indicam a formação de uma camada de solvatação bastante estável.

**Tabela 4.** Máximos ( $r_{max,1}$ , em Å) e intensidades ( $g_{max,1}$ ) dos primeiros picos das funções de distribuição radial dos átomos das cadeias laterais carregadas positivamente e negativamente, que formam LH com a água. O número de LH ( $n_{HB}$ ), e suas energias médias ( $\langle E \rangle$ , em kcal/mol), estão indicados

Átomo (Resíduo)	$r_{max,1}$	$g_{max,1}$	$n_{HB}$	$\langle E \rangle$
OD1(Asp2)	1,76	2,32	3,24	-9,67
OD2(Asp2)	1,80	2,13	2,63	-10,05
HE (Arg6)	1,90	0,81	0,56	-8,03
HH11(Arg6)	2,05	0,61	0,58	-6,60
HH12(Arg6)	2,05	0,25	0,28	-6,55
HH21(Arg6)	2,05	0,63	0,64	-6,59
HH22(Arg6)	2,16	0,53	0,53	-6,36
HE (Arg15)	1,95	0,79	0,70	-7,08
HH11(Arg15)	2,05	0,52	0,50	-6,52
HH12(Arg15)	2,09	0,38	0,37	-6,46
HH21(Arg15)	2,13	0,49	0,48	-6,40
HH22(Arg15)	2,15	0,50	0,56	-6,36
HE (Arg16)	1,87	0,79	0,56	-8,07
HH11(Arg16)	2,06	0,46	0,43	-6,49
HH12(Arg16)	2,04	0,49	0,46	-6,55
HH21(Arg16)	2,05	0,45	0,43	-6,33
HH22(Arg16)	2,09	0,49	0,44	-6,30
HE (Arg25)	1,90	0,62	0,55	-7,16
HH11(Arg25)	2,00	0,48	0,49	-6,60
HH12(Arg25)	2,05	0,35	0,33	-6,46
HH21(Arg25)	2,06	0,45	0,42	-6,53
HH22(Arg25)	2,09	0,46	0,47	-6,43
OE1(Glu14)	1,80	1,20	1,63	-9,68
OE2(Glu14)	1,80	1,20	1,60	-9,79

#### Solvatação dos grupos laterais polares não carregados

As  $g_{AW}(r)$  para cada par OH-Hw dos resíduos Tyr4, Tyr17, Tyr22 e OG1-Hw de Thr19 têm máximos em 1,75 Å, com intensidades variando de 0,55 (OG1) a 0,96 (OH(Tyr22)). O número médio de moléculas de água na primeira camada de solvatação de cada um desses átomos é igual a 1. Os perfis de energias detectam que todos os pares OH-Hw e OG1-Hw formam LH. Os  $n_{HB}$  estão indicados na Tabela 4. No caso dos pares HH-Ow (Tyr) e HG1-Ow (Thr) as dis-

tribuições de energia indicam que as LH são altamente favorecidas, com  $\langle E \rangle$  bastante atrativas ( $\sim -15$  kcal/mol). Isso é confirmado pelas  $g_{AW}(r)$ , cujos máximos encontram-se localizados a 1,65 Å, com intensidades variando de 1,56 (Tyr4) a 2,11 (Tyr17). Estes picos são bastante estreitos e altos, resultando em uma média de 0,81 moléculas de água na primeira esfera de coordenação dos H.

No caso da solvatação da cadeia lateral da Gln23, o perfil das distribuições de energia indica que o átomo OE1 apresenta pico característico de LH, com  $n_{HB}$  igual a 1,08. Essa interação pode ser constatada através da análise da  $g_{AW}(r)$ , cujo máximo encontra-se a 1,8 Å, com intensidade de 0,74 (Tabela 5). As distribuições de energia para HE21-Ow e HE22-Ow não apresentam máximos; no entanto, a presença de um ombro nas regiões de energia atrativa indica que há ocorrência de LH intermoleculares. A análise das funções de distribuição radial envolvendo esses dois átomos e as moléculas de água indica máximos localizados a 1,95 Å, em ambos os casos, com intensidades de 0,55 e 0,68, respectivamente. A integração desses picos indica um número de hidratação igual a 1,1 para cada átomo em questão.

**Tabela 5.** Máximos ( $r_{max,1}$ , em Å) e intensidades ( $g_{max,1}$ ) dos primeiros picos das funções de distribuição radial dos átomos das cadeias laterais polares, não carregadas, que formam LH com a água. O número de LH ( $n_{HB}$ ), e suas energias médias ( $\langle E \rangle$ , em kcal/mol), estão indicados

Átomo (Resíduo)	$r_{max,1}$	$g_{max,1}$	$n_{HB}$	$\langle E \rangle$
OH(Tyr4)	1,75	0,79	1,00	-9,21
HH(Tyr4)	1,65	1,56	0,69	-15,45
OH(Tyr17)	1,75	0,85	1,12	-9,31
HH(Tyr17)	1,65	2,11	0,86	-16,10
OG1(Thr19)	1,75	0,55	0,77	-9,22
HG1(Thr19)	1,65	1,75	0,82	-15,10
OH(Tyr22)	1,75	0,96	1,26	-9,27
HH(Tyr22)	1,65	1,87	0,87	-14,97
OE1(Gln23)	1,80	0,74	1,08	-6,28
HE21(Gln23)	1,98	0,50	1,12	-7,59
HE22(Gln23)	1,92	0,65	1,13	-8,30

## DISCUSSÃO

O HNP-3, diferentemente de muitos peptídeos líticos, é ativo na forma dimerica quando a estrutura tridimensional de cada monômero é constituída por três folhas  $\beta$  antiparalelas, duas delas compondo um grampo  $\beta$ . Essa estrutura do monômero, estudada por simulação molecular, é estável em meio aquoso. Isso mostra que, dentro da escala de tempo simulada, tal estabilidade é mantida como comprovado pelos baixos valores dos dqms (ao redor de 0,2 nm), com relação à estrutura experimental obtida por raio-X<sup>9</sup>. A sobreposição dos átomos da cadeia principal de cada um dos monômeros A e B da estrutura do dímero, obtida por raio-X, com os mesmos átomos da última conformação, obtida nas simulações, indica um menor dqm quando se faz a comparação com o monômero B (dqm = 0,15 nm) ao invés do monômero A (estrutura inicial usada nas simulações de DM, dqm = 0,19 nm). Isso indica, de um lado, que o monômero B está numa conformação mais próxima à conformação que é estável em meio aquoso e, de outro lado, que a técnica usada foi capaz de gerar conformações perfeitamente representativas dos monômeros. Os resultados indicam que a existência de várias ligações de hidrogênio intramoleculares interligando as folhas  $\beta$  (Tabela 1) contribui para a manutenção de suas conformações antiparalelas. A presença de uma ponte salina entre os resíduos terminais mantém as extremidades do monômero espacialmente próximas estabilizando estas re-

giões. As alças, entre as folhas  $\beta$ , apresentam menor estabilidade devido à flexibilidade das mesmas, já que são pouco estabilizadas por LH intramoleculares (observa-se somente a formação de duas LH desse tipo nas voltas  $\beta$ , Tabela 1). Assim, através da Figura 4, pode-se notar que as regiões, envolvendo os resíduos localizados nas vizinhanças das Cys3, Pro8 e Arg25, são as que apresentam os maiores dqms. A presença de três pontes dissulfeto no monômero também tem papel importante na estabilização de sua estrutura tridimensional. Essas pontes dificultam grandes movimentos em toda cadeia peptídica e, conseqüentemente, evitam perda de estrutura assim como a manutenção das alças  $\beta$  em conformações relativamente estáveis sem que haja necessidade de outros fatores para estabilizá-las. Deve ser salientado, porém, que os valores dos dqms (até 0,75 nm) são consequência das movimentações laterais destas alças; tais movimentações fazem-se concomitantemente, uma vez que as Cys3 e Cys31 são ligadas por uma ponte dissulfeto. Estes movimentos afastam estas regiões das correspondentes da estrutura de referência. A definição básica da estrutura ternária é, portanto, devido às ligações químicas e às LH. Entretanto, a rigidez da molécula é explicada pelo fato de haver regiões estabilizadas diretamente por LH intermoleculares, ou seja, regiões que são de baixa energia por se integrarem à rede de LH do solvente, que é altamente estável. As regiões mais acessíveis ao solvente são aquelas ricas em resíduos polares, como Asp, Glu, Tyr e Thr, enquanto que as cadeias laterais das Arg são pouco acessíveis às moléculas de água. Em alguns casos (Arg16 e Arg25) detecta-se uma competição entre as interações intra e intermoleculares. No caso dos grupos hidrofóbicos, localizados no interior do monômero, 72% apresentam ligações de hidrogênio do tipo CO-Hw. Já os átomos NH de suas cadeias principais mostram-se menos acessíveis às moléculas do solvente e os valores de  $\langle E \rangle$  indicam que as LH formadas têm energias não muito atrativas. Algumas interações hidrofóbicas foram encontradas estabilizando a estrutura do HNP-3, por exemplo, observa-se a tendência de agregação entre as cadeias laterais dos resíduos Trp27 e Tyr22 estabilizando a volta do grampo  $\beta$ , fechando-a. A análise da estrutura cristalina de HNP-3<sup>9</sup> mostra que uma interação importante na conformação global da região que inclui os resíduos Arg6 à Glu14 é uma ponte salina entre Arg6 e Glu14. No entanto, os resultados das simulações não detectam a formação de tal ligação; isto está em concordância com as interpretações de experimentos de RMN-2D realizados em solução aquosa de HNP-1<sup>25,26</sup>, uma defensiva cuja estrutura é muito similar à do HNP-3. Uma explicação possível é que, em solução aquosa, esses resíduos voltam-se para o meio polar dando preferência à formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, rompendo assim a ponte salina. Outra similaridade encontrada entre os resultados da DM para o HNP-3 e dados de RMN para o HNP-1 é a presença da saliência  $\beta$  em Gly18<sup>25,26</sup>, uma pequena distorção que ocorre na estrutura secundária padrão de alguns peptídeos.

## CONCLUSÃO

Simulações de DM permitiram investigar como a estrutura do monômero de HNP-3 se comporta em meio aquoso. A boa correlação entre os resultados teóricos e experimentais comprova o sucesso da metodologia computacional utilizada e sua importância nos estudos sobre solvatação e estrutura de peptídeos. Em particular, a boa reprodução das estruturas dos monômeros é uma comprovação da consistência entre as estruturas monoméricas isoladas e a do dímero. Dessa forma, esse estudo poderá contribuir para o entendimento do efeito do solvente sobre a conformação do dímero de HNP-3, bem como para o entendimento das interações que ocorrem entre os monômeros em meio aquoso. Futuramente, os dados coletados servirão de base para a determinação das estruturas terciária e quaternária

de HNP-3, de modo a propor os mecanismos de ação desse peptídeo antimicrobiano no processo de destruição de membranas celulares.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por bolsas e suporte financeiro. Ao Prof. Dr. P. Ciancaglini (FFCLRP-USP) pela leitura crítica do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- Ganz, T.; Sested, M. E.; Szklarek D.; Harwig, S. S.; Daher, K.; Bainton, D. F.; Lehrer, R. I.; *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 1427; Lehrer, R. I.; *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, *11*, 105; Ganz, T.; Lehrer, R. I.; *Curr. Opin. Immunol.* **1994**, *6*, 584.
- Wiesenfeld, H. C.; Heine, R. P.; Krohn, M. A.; Hillier, S. L.; Amortegui, A. A.; Nicolazzo, M.; Sweet, R. L.; *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 792.
- Lupetti, A.; Danesi, R.; van't Wout, J. W.; van Dissell, J. T.; Senesi, S.; Nibbering, P. H.; *Expert Opin. Invest. Drugs* **2002**, *11*, 309.
- Zhang, L.; Yu, W.; He, T.; Yu, J.; Caffrey, R. E.; Dalmasso, E. A.; Fu, S.; Pham, T.; Mei, J.; Ho, J. J.; Zhang, W.; Lopez, P.; Ho, D. D.; *Science* **2002**, *298*, 995.
- Mizukawa, N.; Sawaki, K.; Nagatsuka, H.; Kamio, M.; Yamachika, E.; Fukunaga, J.; Ueno, T.; Takagi, S.; Sugahara, T.; *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2171.
- Wimley, W. C.; Selsted, M. E.; White, S. H.; *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1362.
- Lehrer, R. I.; Barton, A.; Daher, K. A.; Harwig, S. S. L.; Ganz, T.; Selsted, M. E.; *J. Clin. Invest.* **1989**, *84*, 553.
- Gregory, R. B.; *Protein-Solvent Interaction*, Marcel Dekker Inc.: New York, 1995.
- Hill, C. P.; Yee, J.; Selsted, M. E.; Eisenberg, D.; *Science* **1991**, *251*, 1481.
- White, S. H.; Wimley, W. C.; Selsted, M. E.; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 521.
- van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1990**, *29*, 992; Hansson, T.; Oostenbrink, C.; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 190.
- Cafilisch, A.; Karplus, M.; *J. Mol. Biol.* **1995**, *252*, 672.
- Biggin, P. C.; Sansom, M. S. P.; *Biophys. Chem.* **1999**, *76*, 161; Bachar, M.; Becker, O. M.; *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1359.
- Allen, M. P.; Tildesley, D. J.; *Computer Simulation of Liquids*, Clarendon Press Ed.: Oxford, 1987.
- Engelsen, S. B.; Pérez, S.; *Carbohydr. Res.* **1996**, *292*, 21; Bonvin, A. M. J. J.; Sunnerhagen, M.; Otting, G.; van Gunsteren, W. F.; *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 859; Cheng, Y.-K.; Sheu, W.-S.; Rossky, P. J.; *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1734; Canto, J.; Fernandez, Y.; Pons, M.; Giral, E.; Perez, J. J.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *24*, 1; Degrève, L.; Silva, L. B.; *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 3111; Walsh, S. T.; Cheng, R. P.; Wright, W. W.; Alonso, D. O.; Daggett, V.; Vanderkooi, J. M.; DeGrado, W. F.; *Protein Sci.* **2003**, *12*, 520; Wellenzohn, B.; Loferer, M. J.; Trieb, M.; Rauch, C.; Winger, R. H.; Mayer, E.; Liedl, K. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1088.
- van Sunnerhagen, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G.; *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, VdF: Hochschulverlag AG an der ETH Zürich and BIOMOS b.v: Zürich, Groningen, 1996.
- Tironi, I. G.; Sperb, R.; Smith, P. E.; van Gunsteren, W. F.; *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 5451.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessada em Outubro 2001.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P.; *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269.
- Cicotti, G.; Frenkel, D.; McDonald, I. R.; *Simulation of Liquids and Solids. Molecular Dynamics and Monte Carlo Methods in Statistical Mechanics*, North-Holland: Amsterdam, 1990.
- Ryckaert, J. P.; Ciccoti, G.; Berendsen, H. J. C.; *J. Comp. Phys.* **1977**, *23*, 327.
- Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L.; *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fundamentos de Bioquímica*, Artes Médicas Sul Ed.: Porto Alegre, 2000; Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V.; *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23*, 283.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature; *Biochemistry* **1970**, *9*, 3471.
- Zhang, X. L.; Selsted, M. E.; Pardi, A.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 11348.
- Pardi, A.; Zhang, X. L.; Selsted, M. E.; Skalicky J. J.; Yip, P. F.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 11357.
- <http://us.expasy.org/spdbv/>, acessada em Maio 2002.