

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

JOELMIR DOS SANTOS

**SIMULAÇÕES DA AGREGAÇÃO DA AMILINA
E CAUSAS DA DIABETES TIPO II**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2013

JOELMIR DOS SANTOS

**SIMULAÇÕES DA AGREGAÇÃO DA AMILINA
E CAUSAS DA DIABETES TIPO II**

Projeto de trabalho de conclusão de Curso apresentado a disciplina de TCC 2 do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof.ºDr. Rafael Bertolini Frigori

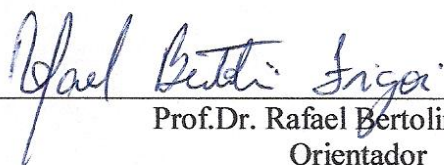
TOLEDO
2013

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO PROJETO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

JOELMIR DOS SANTOS

**SIMULAÇÕES DA AGREGAÇÃO DA AMILINA
E CAUSAS DA DIABETES TIPO II**

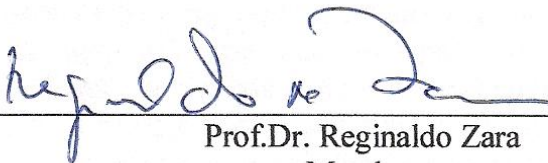
Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, Câmpus Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.



Prof.Dr. Rafael Bertolini Frigori
Orientador



Prof. Dr. Ricardo Schneider
Membro



Prof.Dr. Reginaldo Zara
Membro

Toledo, Agosto de 2013

“Quando um artista pinta um retrato de um homem, empenha-se mais por criar na tela a sua própria impressão do assunto do que uma reprodução fotográfica. Podemos imaginar os cientistas como artistas que criam tal retrato da natureza. Um artista estaria mais interessado no átomo; outro nos elétrons; um terceiro no núcleo. Cada um desenha sua própria parte do retrato com algumas incorreções. Então, após alguns poucos anos, outro artista olha o retrato, repara que algumas linhas necessitam de mudanças, e faz a alteração. É muito raro haver necessidade de apagar uma grande parte do retrato e começa-lo novamente do esboço. Por vezes, esses artistas, embora não possuam outro meio melhor de apresentar algum aspecto da natureza, sabem que algo está errado com certa parte do quadro. Então tem que esperar até que haja maior conhecimento sobre essa parte e, por enquanto reconhecer que este detalhe não está inteiramente correto. Esses modelos, portanto, estão em constante mudança; e as teorias atuais refletem no total ou em parte, o trabalho de muitos artistas. Um retrato da natureza de cinquenta anos atrás ainda lembra grosseiramente a mesma, porém o retrato atual é mais condizente com a natureza. Assim, o que aprendemos atualmente ainda será a base do retrato da natureza que os artistas terão daqui a meio século. Por isso devemos ter em mente que os modelos constituem um retrato da natureza, mas não constituem nem jamais poderão constituir reproduções perfeitas da natureza.”

(Baseado em NOVAIS, 1981).

RESUMO

SANTOS, Joelmir Dos. SIMULAÇÕES DA AGREGAÇÃO DA AMILINA E CAUSAS DA DIABETES TIPO II. 2013. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Químicos) – Diretoria de graduação e ensino profissional - Coordenação de processos químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2013.

A Amilina ou IAPP (Islet amyloid polypeptide) é potencialmente responsável pelo desenvolvimento de formas agregadas que atuam no desenvolvimento da diabetes. Com uma abordagem microcanônica, objetivou-se investigar as causas da diabetes *mellitus* tipo II através de simulações de Monte Carlo, técnica oriunda da Física-estatística. Tais simulações foram estruturadas tendo-se como base de dados a hidrofobicidade conforme escala ‘Roseman’ de cada aminoácido constituinte da cadeia peptídica, sendo realizadas análises termodinâmicas com enfoque na entropia (S) e avaliando as possíveis configurações favoráveis a tal agregação para as variantes mutantes rIAPP (rato comum), cIAPP (gato ‘domestico’) e hIAPP (homem). Foi usado o algoritmo multicanônico (MUCA) implementado em *Fortran* 90 e executado em Linux. Como ferramenta de visualização utilizou-se o *RasMol*, para comparação com o PDB e verificação dos estados agregados que induzem a doença, já para análises dos dados numéricos empregou-se o *QtiPlot* e *xMGrace*.

Palavras-chave: IAPP. Diabetes *mellitus* tipo II. Simulação de Monte Carlo. Termodinâmica.

ABSTRACT

SANTOS, Joelmir Dos. SIMULATION OF AGGREGATION OF AMYLIN AND CAUSES OF DIABETES TYPE II. 2013. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Químicos) – Diretoria de graduação e ensino profissional - Coordenação de processos químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2013.

The Amylin or IAPP (Islet amyloid polypeptide) is potentially responsible for the development of aggregated forms that operate in the development of the diabetes. With a microcanonical approach we aimed to investigate the causes of type II diabetes mellitus through Monte Carlo simulations, a technique derived from Statistical Physics. The simulations were structured taking as a database the hydrophobicity scale of 'Roseman' of each constituent aminoacid of the peptide chain. The analysis focused on the thermodynamic entropy (S) and evaluations of possible configurations favorable to aggregation of the mutant strains rIAPP (common rat), cIAPP ('domestic' cat) and hIAPP (man). We still used the well-known multicanonical algorithm (MUCA) implemented in *Fortran 90* and run on Linux. For visualization purposes *RasMol* was employed for comparison of structures to PDB, so allowing verification of aggregated states that induce the disease. For analysing the numerical data *QtiPlot* and *xmGrace* were used.

Keywords: IAPP. Type II diabetes *mellitus*. Monte Carlo simulation. Thermodynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de uma ligação peptídica, formação de um dipeptídeo.....	15
Figura 2 - Interação polar em proteínas	15
Figura 3 - Estrutura geral de um aminoácido	16
Figura 4 - Estrutura dos 20 aminoácidos naturais e as cadeias que os caracterizam quanto a interação com a água.....	18
Figura 5 - Estrutura das proteínas e classificações quanto a conformação espacial.....	19
Figura 6 - Estruturas secundárias de peptídeos: (a) alfa hélice e (b) folha beta.....	20
Figura 7 - Estrutura terciária de uma proteína	21
Figura 8 - Estrutura quaternária da hemoglobina	21
Figura 9 - Diagrama de rotas energéticas possíveis para o enovelamento proteico	22
Figura 10 - Ângulos de torção e variação da posição relativa de cada aminoácido em relação a outros aminoácidos na proteína	27
Figura 11 - Estrutura de esqueleto de peptídeo utilizada	28
Figura 12 - Estruturas hIAPP, cIAPP e rIAPP em <i>backbone</i>	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AAS	Aminoácidos
cIAPP	Cat Islet amyloid polypeptide
DM-II	Diabetes <i>mellitus</i> tipo II
DMJ	Diabetes <i>mellitus</i> do Jovem
FDA	Food and Drug Administration
Fortran	Formula translation
hIAPP	Human Islet amyloid polypeptide
HP	Hidrofóbico/Polar
IAPP	Islet amyloid polypeptide
MD	Dinâmica molecular
MUCA	Algoritmo Multicanônico
PDB	Protein data bank
rIAPP	Rat Islet amyloid polypeptide
SBD	Sociedade brasileira de diabetes
SMC	Simulações de Monte Carlo
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVO	12
1.1.1 Objetivo Geral	12
1.1.2 Objetivos Específicos	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 BIOMOLECULAS	14
2.1.1 Aminoácidos e Proteínas	16
2.1.2 A água em processos biológicos	17
2.1.3 Conformação e estrutura das proteínas	18
2.1.4 Enovelamentos e agregação proteica	22
2.2 DM-II	24
2.2.1 IAPP	25
2.3 METODO DE MONTE CARLO	25
3 METODOLOGIA	28
3.1 DESCRIÇÃO DO SOFTWARE EMPREGADO	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* é uma doença muitas vezes congênita e que acomete cerca de 12 milhões de pessoas apenas no Brasil (SBD, 2012). Caracteriza-se pelo mau funcionamento ou diminuição dos receptores das células beta-pancreáticas, que uma vez não funcionando de maneira satisfatória, fazem com que a glicose não adentre eficientemente nas células. Se não tratada em tempo pode levar ao infarto, derrames, cegueira e comprometimento da circulação periférica que se relaciona com o fato de alguns hormônios alterarem o funcionamento corporal de modo geral. Por sua vez, a diabetes *mellitus* do tipo II (DM-II) não é congênita e tem suas causas tradicionalmente associadas a um estilo de vida propício, incluindo fatores como a obesidade, o sedentarismo ou a idade avançada, dentre outros.

Fisiologicamente é ainda observado que as mesmas células beta-pancreáticas responsáveis pela produção de insulina, e que são afetadas pela DM-II, também produzem um hormônio conhecido por Amilina ou IAPP (do inglês: *Islet Amyloid Polypeptide*). A IAPP é reconhecida por seus efeitos metabólicos sinérgicos quando em associação com a insulina. Por outro lado, em biopsias de pâncreas de humanos diabéticos esta proteína foi encontrada na forma de agregados amiloides (de onde deriva seu nome), que se assemelham aos encontrados em pessoas acometidas por outros males degenerativos.

Deste modo, a associação da IAPP com as causas da DM-II em humanos é uma hipótese de trabalho que fornece dados importantes quanto ao funcionamento em nível hormonal do organismo. Já sabe-se, por exemplo, que em diabéticos crônicos a fase protofibrilar dos agregados formados por esta proteína tem toxicidade suficientemente letal às células pancreáticas (HAYDEN, 2002, p. 38-126). Na busca por um tratamento eficiente falta, contudo, melhor compreender os mecanismos moleculares que levam à formação destes agregados. Uma das abordagens teóricas nesta direção vem do estudo da formação de agregados deste peptídeo via modelagem química simplificada da interação de seus aminoácidos (resíduos) descritos por modelos mínimos. Dentre estes modelos, por exemplo, existem aqueles como o AB (IRBÄCK, 1997), que mantém o caráter hidrofóbico/polar reconhecidamente importante ao enovelamento proteico, Hipótese abordada.

Sabe-se ainda que os resíduos de 20 a 29 na estrutura primária da IAPP estão relacionados ao comportamento molecular agregacional patológico que se apresenta na DM-II (JAIKARAM, 2001, p. 179-203). Como resultados descritos na literatura médica (YOUNG, 2005) ratificam que estes agregados proteicos de IAPP estão associados a apoptose

em células beta pancreáticas, este foi um tema interessante de estudo uma vez que constitui um esboço para o desenvolvimento da área farmacêutica. Desse modo foi utilizado neste estudo a abordagem *in silico*, isto é, simulações computacionais de modelos químicos teóricos que descreveram o comportamento termodinâmico da molécula em questão. Em particular, este estudo enfocou em melhor entender a região molecular correspondente aos aminoácidos 20-29 da estrutura (sequência) proteica primária, (CABALEIRO-LAGO, 2009, p. 3453–3461) por causa de sua importância na agregação e também a fim de simplificar o modelo a ser analisado.

O desenvolvimento de novas tecnologias tem levado paulatinamente a um considerável incremento no número de experimentos computacionais realizados, por exemplo, nas áreas da química como o desenho racional de fármacos, que empregam simulações numéricas. A maior vantagem desta metodologia advém da diminuição de custos e aumento do controle experimental se comparado aos estudos tradicionais *in vitro* (ANDREWS; WINTER, 2011, p. 43–50).

Desse modo, o comportamento termodinâmico do sistema químico da IAPP pôde ser estudado, passo inicial para desenhos teóricos, visando atender às necessidades específicas de novas terapias moleculares. As simulações de Monte Carlo (SMC), oriundas da mecânica estatística, forneceram uma conexão termodinâmica a partir de cálculos envolvendo modelos microscópicos (GROSS, 2001).

Os métodos de SMC ainda são pouco utilizados em bioquímica no Brasil, assim, esta abordagem é considerada incipiente em tal área de pesquisa. Esta é uma área de múltiplas utilidades em ciência e de importância social, econômica e principalmente tecnológica. Por isto, este estudo visou analisar as causas da DM-II por meio de simulações computacionais *ab initio* de modelos proteicos mínimos (IRBÄCK, 2003), ou seja, aqueles em que apenas os graus de liberdade quimicamente mais relevantes para um dado sistema são representados (BERG, 2008, p. 54-55).

Os estudos que utilizam a metodologia *in silico*, tem função importante na indústria farmacêutica. Dessa forma, descobrir as causas do diabetes de maneira mais aprofundada pode ajudar no desenvolvimento racional de novos fármacos. O laboratório americano *Amylin Pharmaceuticals* conseguiu, por exemplo, desenvolver um importante medicamento nessa linha: a “*Pranlintide*”. Este produto, que é uma versão mutante da rIAPP biocompatível com seres humanos, tem como forma molecular $C_{171}H_{267}N_{51}O_{53}S_2$, e um peso molecular igual a 3951,4421g/mol (PRAMLINTIDE, 2012).

A “*Pramlintide*” foi aprovada para uso em março de 2005 pelo FDA, devido às numerosas experiências (inclusive de simulações computacionais) desenvolvidas em sua formulação (AMYLIN, 2012). Sua ação envolve desde a perda de peso até a redução dos níveis de glicose no sangue. Isso porque ela também induz à redução da produção da enzima glucosil, realizada pelo fígado e que inibe a ação do glucagon, hormônio produzido no pâncreas e que regula a produção da glicose pelo fígado (JONES, 2007, P. 1832-1834). Outro importante efeito desta droga é a diminuição, ou até mesmo a reversão, da formação de agregados de hIAPP no pâncreas diabético. A *Pramlintide* pode ser utilizada por diabéticos dos tipos I ou II, geralmente em conjunto com a insulina, diminuindo a necessidade dos níveis necessários desta última.

Estudos mais detalhados das causas da agregação da IAPP, e a utilização de novas metodologias computacionais, podem levar futuramente à descoberta da formulação de fármacos ainda mais específicos e baratos para o tratamento deste mal, como é o caso da *Exenatide* (JONES, 2007). Visou-se portanto, dar os primeiros passos nesta direção, empregando de forma introdutória e pedagógica métodos numéricos e modelos teóricos simplificados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Simulação computacional da agregação da proteína IAPP via modelos mínimos de interação entre aminoácidos (do tipo AB: hidrofóbico/hidrofílico) no estudo da causa da DM-II. Emprego da análise termodinâmica no formalismo microcanônico para a caracterização das transições de fase (de agregação e enovelamento) e estabilidade estrutural em sistemas biológicos.

1.1.2 Objetivos específicos

- I. Revisão de linguagens de programação de relevância científica, como o *Fortran 90* estruturado em Linux, aprendizado de modernas ferramentas para análise e tratamento de dados como o *Qtplot*, *XmGrace*, *Origin 8.0* e de visualização molecular: *RasMol*.
- II. Revisão na literatura de simulações utilizando modelos de Monte Carlo dinâmico, com algoritmos multicanônicos (MUCA);
- III. Simulação das versões mutantes de IAPP provindas de humanos (hIAPP), felinos (cIAPP) e de roedores (rIAPP), enfocando as simulações nos resíduos da sequência primária IAPP₂₀₋₂₉, reconhecidamente responsáveis por abrigar as mutações moleculares patogênicas.
- IV. Análise de estabilidade termodinâmica nas diferentes variantes moleculares de IAPP visando detectar propensões específicas para a formação de agregados tóxicos. Realização de análise microcanônica dos processos termodinâmicos relacionados à IAPP e estudo dos agregados proteicos formados na agregação daquela, quantificação dos resultados obtidos em termos de calores específicos e energias livres;
- V. Investigação da dependência dos resultados termodinâmicos quanto às escalas de hidrofobicidade empregadas durante o mapeamento da sequência primária do PDB (*Protein Data Bank*) no modelo mínimo AB.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMOLÉCULAS

A Bioquímica ocupa-se com o estudo das biomoléculas responsáveis, em nível atômico, pelos inúmeros processos fisiológicos dos seres vivos. Tais moléculas estão associadas a processos químicos complexos, induzidos e guiados pela dinâmica do meio intracelular que as circunda e que pode desencadear reações paralelas. Nesta classe molecular são frequentes as mudanças de conformação espacial e conseqüentemente a alteração de funcionalidades biológicas com o passar do tempo (BRANDEN; TOOZE, 1999).

Os conceitos bioquímicos vão desde os tipos de ligação química, reações ácido-básicas, primeira e segunda lei da termodinâmica e a interação de macromoléculas biológicas com a água. Quanto às ligações, elas podem ser classificadas em ligações covalentes e não covalentes. Essencialmente, essas moléculas são definidas a partir de ligações covalentes. No entanto, há em diversos casos ligações não covalentes envolvidas apesar da natureza covalente da maioria das ligações em bioquímica.

As ligações covalentes são mais fortes, por serem formadas através de compartilhamento de elétrons, no caso do carbono, que é um elemento comum em tais moléculas, e tem um comprimento de ligação simples estimado na ordem de 0,154 nm (BERG, 2008). Isto torna a energia de quebra das ligações C-C consideravelmente altas, conferindo estabilidade aos compostos orgânicos que são a base das moléculas biológicas. No caso das proteínas, que são heteropolímeros não-ramificados formados pela condensação de AAS, as ligações covalentes entre estes monômeros é chamada de peptídica (Figura 1).

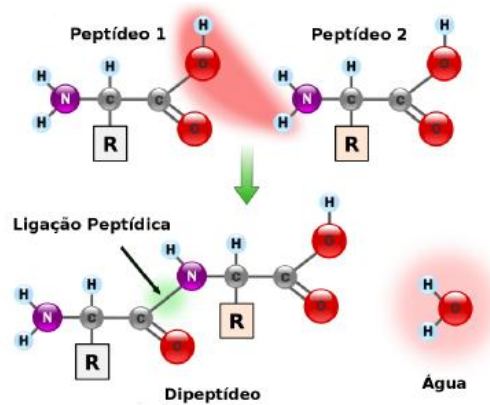


Figura 1 - Esquema de uma ligação peptídica
Fonte: FRIGORI, 2010.

Ligações não-covalentes são fracas e se baseiam em quatro tipos essenciais: (BERG, 2008 p.7-9; ATKINS, 2011) ligações de Hidrogênio, interações eletrostáticas, interações de *Van Der Waals* e seu efeito residual: as interações hidrofóbicas (BEIG, 2006). Cada uma dessas é afetada de maneira específica na presença de água, embora nos processos reais dos sistemas biológicos todas essas interações façam-se presentes, as interações hidrofóbicas desempenham papel central no enovelamento e agregação proteicos (Figura 2). Como este é o foco de interesse deste trabalho, este último tipo de interações será priorizado nos modelos teóricos simplificados que serão empregados (FRIGORI, 2010).

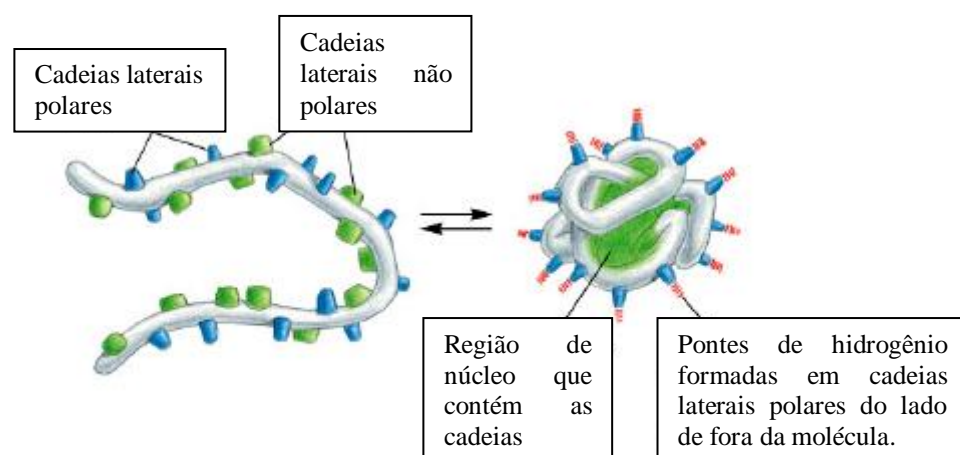


Figura 2 - Interação polar em proteínas
Fonte: Adaptada de MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 1994.

2.1.1 Aminoácidos e Proteínas

A parte da bioquímica que estuda as proteínas procura por características específicas dos AAS, que são os monômeros constituintes de tais heteropolímeros. Esta especificidade é central ao enovelamento proteico pois deformações na estrutura nativa de uma proteína, induzidos por exemplo pela substituição de alguns AAS, são suficientes para que se formem agregados (BEIG, 2006), e desses agregados surjam doenças degenerativas, como *Huntington*, *Alzheimer*, *Parkinson* e a DM-II.

Os AAS por sua vez possuem em geral duas funções orgânicas, a parte que contém uma amina (NH_2) à esquerda, e um grupo carboxílico à direita (COOH) (vide Figura 3). Além do Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, e Nitrogênio presentes, ainda, em menor quantidade podem existir átomos de Enxofre nessas estruturas. Tanto amina quanto o ácido carboxílico estão ligados a um carbono alfa ($\text{C}\alpha$), os AAS ainda possuem como característica a quiralidade.

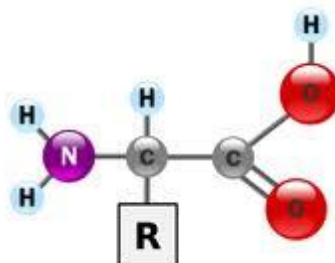


Figura 3 - Estrutura geral de um aminoácido (exceções: prolina e glicina)
Fonte: LEHNINGER, 2005.

Um fato interessante é que na formação de proteínas nos organismos vivos participam apenas 20 tipos de AAS, ditos naturais, enquanto são conhecidos centenas de AAS artificiais, ou “não padrão” (LU, 2006, p. 102). Há várias classificações possíveis para os AAS naturais, no entanto, a mais importante para os estudos que foram realizados aqui é a que se baseia na hidrofobicidade. Pode-se assim classificá-los da seguinte forma (LEHNINGER, 2005):

Polares: tem radicais formadores de ligações de hidrogênio, portanto se dissolvem em água, solvente polar. Estes são chamados de hidrofílicos. Exemplos: glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina.

Apolares: possuem radicais hidrofóbicos e normalmente não são solúveis em água. São exemplos: alanina, leucina, valina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina e triptofano.

Carregados: são aqueles que possuem carga, podendo ser básicos ou ácidos, e portanto também tem caráter hidrofílico, devido essas cargas associadas a molécula.

2.1.2 A água em processos biológicos

As reações bioquímicas em sua maioria utilizam a água como solvente. Isso se deve ao fato da água ser polar, ou seja, a molécula da água possui momento de dipolo permanente (SOLOMONS, 2005; RICHTER, 2009, p. 65 – 66). As moléculas de água também interagem fortemente entre si, formando ligações de hidrogênio. Devido a isso, a constante dielétrica da água é alta, cerca de 80 (BERG, 2008). É isso que faz com que a água seja um solvente versátil, capaz de dissolver instantaneamente substâncias polares.

Um efeito particularmente importante é o chamado efeito hidrofóbico. Este efeito tem grande importância no estudo da agregação de proteínas, na formação de complexos macromoleculares, e na ocorrência de doenças degenerativas, o que explica também, dessa forma a desnaturação proteica. Como a água interage com moléculas polares, (HUMMER, 1998) no caso das proteínas a reação seria de repulsão da parte apolar da molécula e atração da parte polar (Figura 4). Este efeito ocasiona os dobramentos na molécula estudada (enovelamento) e sua possível agregação (BERG, 2008).

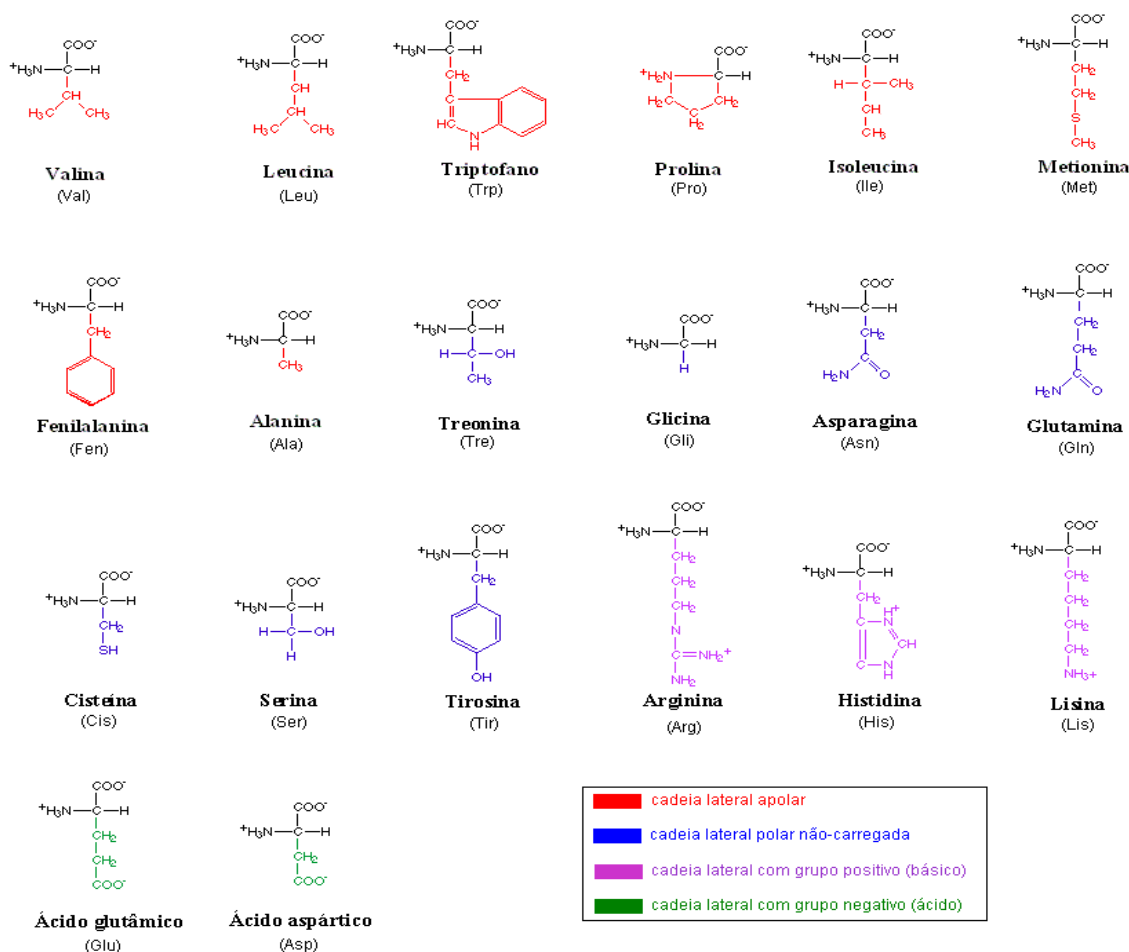


Figura 4 - Estrutura dos 20 AAS naturais e as cadeias que os caracteriza quanto a interação com a água.

Fonte: Adaptado de FRIGORI, 2010.

2.1.3 Conformação e estrutura das proteínas

Como já visto, as ligações peptídicas conectam um AAS a outro, surgindo então, um polipeptídeo quando várias dessas reações de condensação ocorrem. Define-se dessa forma que proteína são polipeptídeos com função biológica bem definida e que contém até milhares de AAS, ou em raros casos, poucos como na IAPP com 37 resíduos. Outro conceito particularmente importante quanto às proteínas é que os AAS que as constituem existem apenas em sua forma levógira, sendo encontrados também em sua forma estereoisômera (S). Ainda quanto a estrutura proteica tridimensional é importante ressaltar que ela pode interagir com outras proteínas, ou com as mais variadas substâncias, alterando assim algumas funcionalidades biológicas típicas dessas proteínas em questão (BERG, 2008).

Quanto a sua natureza, convencionou-se classificar proteínas em *globulares*, que são aquelas que possuem maior solubilidade e quantidade de funções biológicas, sendo sensíveis a desnaturação; *fibrilares*, são insolúveis, possuem função definidas apenas em animais, e resistem bem a desnaturação; *membranosas*, são constituintes da membrana plasmática das células, possuem variadas funções biológicas associadas a elas, são sensíveis a desnaturação (LEHNINGER, 2005).

Quanto a estrutura, as proteínas são divididas em quatro níveis hierárquicos conforme Figura 5 (BRANDEN; TOOZE, 1999; BERG, 2008):

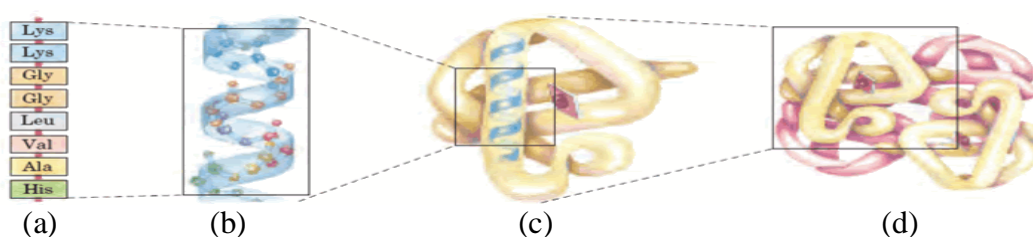


Figura 5 - Estrutura das proteínas. (a) estrutura primária; (b) estrutura secundária; (c) estrutura terciária e (d) estrutura quaternária.

Fonte: LEHNINGER, 2005.

Estrutura primária: Refere-se a sequência de AAS ao longo da cadeia peptídica, unidos, como o nome acima sugere, por ligações peptídicas ao longo da estrutura, não faz referência quanto à disposição espacial dos átomos.

Estrutura secundária: Os peptídeos podem dobrar-se sobre si mesmos em quatro formas: hélice alfa, folha beta, alças e voltas, sendo aqui descritos os dois tipos principais a serem estudados: a hélice alfa e folha beta. As estruturas secundárias se formam através de arranjos próximos entre si das estruturas primárias, o que só ocorre devido a rotações nas ligações entre carbonos alfa dos AAS e seus grupamentos (Figura 6).

- *Hélice alfa:* ocorre em escala espiral. Essa é a mais típica dos grupamentos de estrutura secundária. O que define tanto as estruturas em hélice alfa quanto em folha beta são as ligações de hidrogênio que existem entre os grupamentos N-H e C=O, uma vez que os AAS estão próximos em uma sequência linear (primária) o que gera dobramentos, culminando em estruturas secundárias (BERG, 2008, p. 41). Possuem ainda como o próprio nome sugere, hélices sendo que há 3,6 AAS por volta. Dessa forma, em resumo, hélice alfa é estrutura que é estabilizada por pontes de hidrogênio dentro da cadeia. Essas estruturas podem girar em dois sentidos: para direita

(dextrorsa) e para a esquerda (sinistrorsa), sendo que na natureza são conhecidas apenas em sua forma dextrorsa.

- *Folha beta*: O que diferencia a hélice alfa da folha beta é basicamente o fato de que aquelas são estabilizadas por pontes de hidrogênio dentro da cadeia, as últimas são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os filamentos dos peptídeos (BERG, 2008, p. 42), isso faz com que a folha beta possua geometria achatada e rígida. Nos dois tipos comuns de estruturas secundárias, normalmente há momento DE dipolo permanente nas terminações carboxílicas e das aminas. Existem ainda associações complexas de folhas-beta capazes de formar agregados proteicos e estruturas fibrilares (hélices beta) que estão diretamente envolvidas no aparecimento das ditas doenças amiloides (FRIGORI, 2010, p. 42).

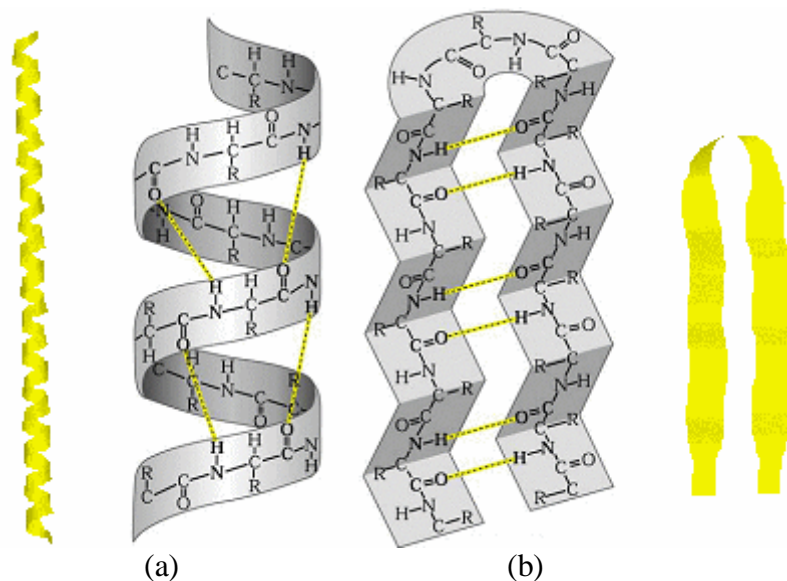


Figura 6 - Estruturas secundárias de peptídeos: (a) alfa hélice e (b) folha beta. Importante: as ligações de hidrogênio estabilizam as estruturas secundárias.

Fonte: Adaptado de KERIAN, 2011.

Estrutura terciária: É resultante de enovelamentos ou dobramentos da estrutura secundária, como visto na Figura 7, a seguir. Estas estruturas são estabilizadas por pontes de hidrogênio e de dissulfetos. Sua estrutura geométrica é intrinsecamente tridimensional e é determinada, ao contrário das secundárias, por interações de longo-alcance entre os AAS constituintes, as quais são chamadas de hidrofóbicas e eletrostáticas (LEHNINGER, 2005).

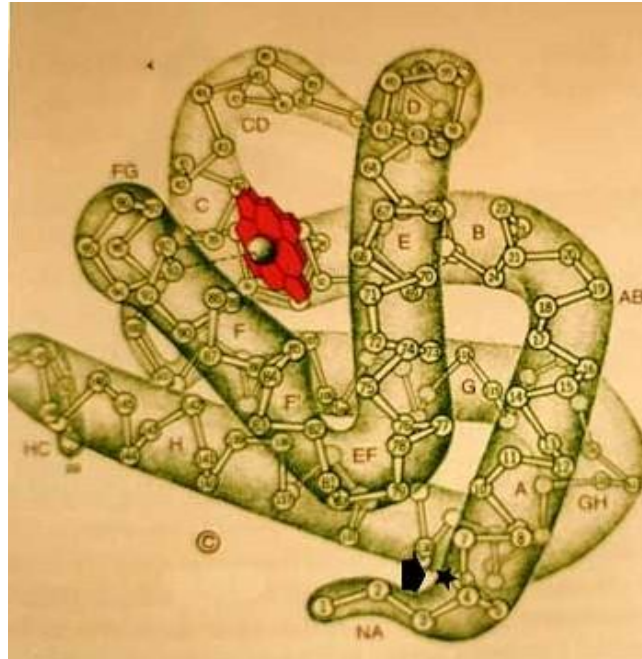


Figura 7 - Estrutura terciária de uma proteína.
Fonte: ACADEMIA DE CIENCIAS E TECNOLOGIA, 2012.

Estrutura quaternária: São compostas pelo mais alto grau de complexidade possível na conformação proteica. Nesses tipos de estruturas, as cadeias peptídicas podem se unir, o que implica na existência de mais de uma proteína na constituição dessa estrutura (Figura 8). Ela é estabilizada do mesmo modo que as estruturas terciárias, e o representante mais popular a apresentar estruturas quaternárias é a hemoglobina, cujo mal agregacional relacionado é a conhecida anemia falciforme (BRANDEN; TOOZE, 1999).



Figura 8 - Estrutura quaternária da hemoglobina,
Fonte: Adaptada de Proteins, 2004.

2.1.4 Enovelamento e agregação proteica

O enovelamento proteico deve-se a vários fatores bioquímicos e conduz a proteína a um mínimo de sua energia livre. Normalmente falhas neste processo desencadeiam-se quando uma proteína não consegue assumir sua conformação nativa, ou biologicamente funcional.

Como é ilustrado na Figura 9 (abaixo), há diversas conformações possíveis para a proteína dependendo do seu estado termodinâmico, o que se representa graficamente por rugosidades no chamado “funil” de energia livre. O estado de equilíbrio, denominado por “F”, é o de menor energia e por isso é dito o estado nativo da proteína.

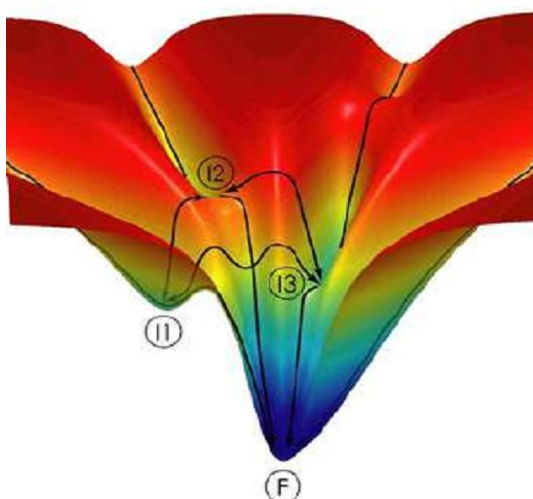


Figura 9 - Os pontos 11, 12, 13 são rotas alternativas para a estabilização da estrutura proteica, enquanto F é a estrutura nativa da proteína.
Fonte: Frigori, 2010.

Contudo, em certas condições, as proteínas podem se metaestabilizar em outros mínimos (locais) da energia livre, e assim, alterar drasticamente seu papel biológico. É possível nestas situações que ela assuma conformações como as designadas por 11, 12, ou 13, e somente a partir daí seguir “rotas preferenciais” (as setas na Figura 9) até o estado nativo. No entanto, certas “rotas errôneas” podem induzir a produção de conformações patológicas que favorecem a agregação proteica.

Vale recordar que o enovelamento proteico é um processo espontâneo e guiado pela informação bioquímica contida na estrutura primária. A passagem para um estado enovelado é

controlado por interações de *Van Der Waals* e conseqüentemente ocorre um aumento da entropia no sistema, além da diminuição da sua energia livre de Gibbs (BENÍTEZ, 2010, p. 38-39). Há ainda vários fatores externos que influenciam o enovelamento, tais como a temperatura, o pH e o caráter hidrofóbico exercido pelo meio circundante.

Referente a este último fator, destaca-se os resíduos hidrofílicos (polares) das proteínas, exibidas no quadro 1 (abaixo), que tendem a interagir atrativamente com o meio aquoso circundante, enquanto os hidrofóbicos procuram afastar-se da água. Originam-se assim conformações tridimensionais e especificidades biológicas.

Letra	Sigla	Nome	Tipo
A	Ala	Alanina	H
C	Cys	Cisteína	H
D	Asp	Ácido Aspártico	P
E	Glu	Ácido Glutâmico	P
F	Phe	Fenilalanina	H
G	Gly	Glicina	H ou P
H	His	Histidina	P
I	Ile	Isoleucina	H
K	Lys	Lisina	P
L	Leu	Leucina	H
M	Met	Metionina	H
N	Asn	Asparagina	P
P	Pro	Prolina	H
Q	Gln	Glutamina	P
R	Arg	Arginina	P
S	Ser	Serina	P
T	Thr	Treonina	P
V	Val	Valina	H
W	Trp	Triptofano	H
Y	Tyr	Tirosina	H

Quadro 1 - Representação dos AAS em três, e uma letra, e classificação de hidrofobicidade/polaridade de cada aminoácido “natural”.

Fonte: BEIG, 2006.

Por fim, observou-se na literatura vigente que falhas no enovelamento das proteínas favorecem a formação de agregados fibrilares amiloides, como é o caso da DM-II (WESTERMARK, *et al.* 1989). Esses agregados são estáveis e causam danos graves aos tecidos vivos. Uma compreensão detalhada dos mecanismos que produzem esses agregados é ainda incipiente, sendo portanto, motivadora de recentes pesquisas abordagem como essa aqui presente.

2.2 DM-II

A diabetes é uma doença que possui como principal característica a elevação dos níveis de glicose no sangue, a hiperglicemia. A glicose é fundamental para o organismo, pois é a forma que os tecidos utilizam a energia dos alimentos. Se os níveis de insulina no sangue não são consideráveis o organismo simplesmente não consegue retirar a energia de que necessita dessa glicose, que por sua vez vai se acumulando no sangue.

Há quatro tipos principais de diabetes: a gestacional, que ocorre somente durante a gravidez; a diabetes tipo I que é a mais comum em pessoas relativamente jovens; DMJ que é quando a doença acontece em jovens e a DM II que é comum em idosos e obesos. Esta última é também conhecida como a diabetes do adulto, e corresponde a cerca de 90% de todos os casos de diabetes. Esse tipo de diabetes ocorre principalmente por causa dos maus hábitos alimentares e em vários casos, se não é diagnosticada no início, possibilita o surgimento de complicações no cérebro e no coração (SBD, 2012; DE MARIA, 2011).

Ainda sobre a DM-II, sabe-se que as células beta-pancreáticas responsáveis pela produção de insulina (e que são afetadas durante a doença) também produzem outro hormônio, a chamada Amilina ou IAPP (GALEAZZA, 1991, p. 585-591). A IAPP é reconhecida por seus efeitos metabólicos benéficos e sinérgicos quando em associação com a insulina, e problemas com seu metabolismo podem induzir a DM-II (YOUNG, 2005).

2.2.1 IAPP

A IAPP é um heteropolímero (proteína) potencialmente responsável por induzir a proteinopatia DM-II quando na sua fase agregada. Na natureza, há diversos tipos de proteínas que formam agregados, sendo responsáveis por doenças degenerativas como *Alzheimer*, *Parkinson*, *Huntington* e *Creutzfeldt-Jakob*. Tais males são também induzidos outros fatores, como a relação do alumínio com o desenvolvimento do Mal de *Alzheimer* (YIN, 2010, p. 1438).

Um fato curioso é que há variações da IAPP presentes em outros animais e que tem comportamentos bioquimicamente bastante distintos. Nesse estudo será enfatizado além da versão humana (hIAPP) a proteína presente nos roedores (rIAPP) e o caso intermediário no qual se encontram os gatos (CAO, 2013), que tornam-se diabéticos, mas há possibilidade de reversão (cIAPP). Uma motivação vem do fato de que ratos não se tornam espontaneamente diabéticos, apesar de rIAPP possuir apenas seis mutações em relação a hIAPP (RHOADES; AGARWAL; GAFNI, 2000, p. 230-238). Vale lembrar que estas referidas mutações (substituições) estão concentradas apenas entre os resíduos de 20 a 29, sendo por isso o fragmento IAPP₂₀₋₂₉ o foco de estudos computacionais.

2.3 MÉTODO DE MONTE CARLO

Nos estudos aqui descritos, o objetivo foi investigar as propriedades termodinâmicas de segmentos proteicos das IAPPs, em suas versões humana (hIAPP), felina (cIAPP) e dos roedores (rIAPP), partindo de uma descrição molecular (microscópica) do sistema. Para essa finalidade empregou-se as chamadas simulações de Monte Carlo, uma técnica emprestada da física-estatística, que permite computar a entropia termodinâmica (S) a partir dos microestados (W) de um sistema molecular (GROSS, 2001; MCQUARRIE, 2000).

Este formalismo físico foi originalmente proposto por Boltzmann, em seu tratado de física-estatística microcanônica, e poderia ser resumido na Equação (CERCIGNANI, 1998):

$$S(E) = k \cdot \ln[W(E)] \quad (1)$$

Ou seja, um macroestado termodinâmico (com energia total E) que é descrito pela função de estado “entropia” denotada por S é associado a uma série de microestados possíveis “ W ” (i.e. configurações microscópicas que sejam macroscopicamente equivalentes), todos tendo a mesma energia E , e sendo k uma constante de proporcionalidade.

Esta definição de entropia satisfaz, portanto, os quesitos termodinâmicos usualmente necessários de aditividade, extensividade e concavidade, sendo matematicamente equivalente (e fisicamente igual) à entropia termodinâmica definida por $S = \Delta Q/T$. Lembrando que a entropia termodinâmica mensura a variação de calor cedido a um corpo (ΔQ) a uma temperatura constante (T) e caracteriza, dessa forma, importantes processos físicos, como as transições de fase. A partir de (S), outras grandezas termodinâmicas como a temperatura (T) e o calor específico (C) podem ser computadas, por exemplo, usando as seguintes relações (GROSS, 2001):

- Temperatura (T)

$$\frac{1}{T(e)} = \beta(e) = \frac{d}{de} s(e, m) \quad (2)$$

- Calor específico (C_v)

$$C_v(e) = \frac{de}{dT} \quad (3)$$

O algoritmo utilizado para implementar o método de Monte Carlo dinâmico é denominado multicanônico (MUCA). Nesta abordagem em particular, uma prescrição iterativa é utilizada para o cálculo aproximado (por meios numéricos) da entropia do sistema para quaisquer energias (LANDAU, 2005; BERG, 2003). Uma vez computada esta entropia S , que é a mais fundamental das funções de estado termodinâmicas (pois dela deduzem-se as demais), as energias livres mais usuais como a de Gibbs (G), Helmholtz (A) ou mesmo a Entalpia (H) do sistema podem ser diretamente estimadas (BALL, 2005).

Para efetuar estas simulações, evoluções temporais foram executadas sobre o modelo molecular que foi estudado Figura 10, as quais consistiram em uma série de mudanças aleatórias nas posições atômicas relativas das proteínas em questão. Tais mudanças microscópicas induzem variações nas energias de interação interatômica, que são armazenadas e contabilizadas na forma de Histogramas (ou seja, numa contagem de ocorrências de cada microconfiguração para uma dada energia, conforme Figura 10).

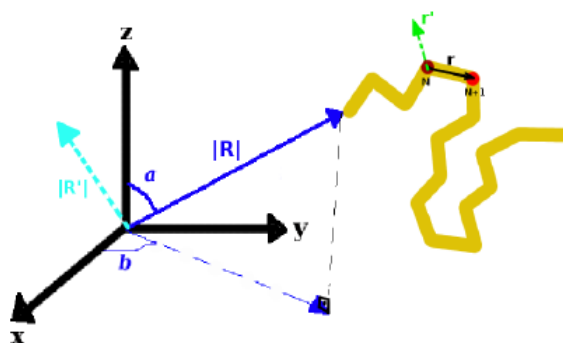


Figura 10 - Esquema da atualização de Monte Carlo empregada neste estudo. Ângulos de torção e variação dos módulos relativos a posição dos AAS em relação a outros AAS na proteína.

Fonte: FRIGORI, 2010.

Deste modo, em “n+1” sucessivas aplicações iterativas deste processo, que é repetido ao longo do tempo de simulação computacional em n-passos, é construída uma boa aproximação para a entropia microcanônica S^{n+1} a partir do seu valor prévio obtido no “n-ésimo passo” (i.e. S^n) e dos valores acumulados (e atualizados) do Histograma das energias (H) computadas ao longo da evolução computacional no “n-ésimo” passo. Para tal utiliza-se a seguinte relação fundamental de recorrência que caracteriza o algoritmo multicanônico (BERG, 2003).

$$S^{n+1}(E) = S^n(E) + \ln[H^n(E)] \quad (4)$$

De onde a termodinâmica do sistema é extraída e transições de fase moleculares, por exemplo, como os processos de envelhecimento ou agregação proteicos são caracterizados.

3 METODOLOGIA

3.1 DESCRIÇÃO DO SOFTWARE EMPREGADO

O modelo AB constitui-se em um aprimoramento do simplificado modelo HP (BEIG, 2006, P. 72-81) para a descrição dos aspectos (H)idrofóbico e (P)olar de peptídeos. Nas simulações realizadas foi utilizado um código computacional já implementado e validado anteriormente (FRIGORI, 2010). Para a simulação de heteropolímeros cujos “pseudoátomos” (ou seja, representações simplificadas dos resíduos proteicos, vide Figura 11) interagem segundo um potencial hidrofóbico-hidrofílico (chamado modelo AB) que pode ser ilustrado na Figura 10, como proposto em (IRBÄCK, 2003).

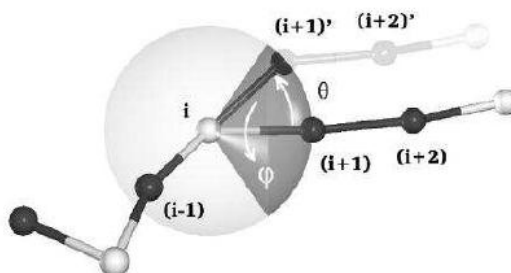


Figura 11 - Estrutura de esqueleto de peptídeo utilizada.
Fonte: FRIGORI, 2010.

A Figura 11, é uma representação gráfica das simplificações estruturais teóricas empregadas nos cálculos realizados. Teve-se a necessidade de empregar modelos de “grão-grosso” (como o AB) para que haja redução dos graus de liberdade físicos reais do sistema, a fim de que se reduza o custo computacional. Os resíduos são então substituídos por “pseudoátomos”. Dessa forma, para a descrição do modelo são necessárias apenas as equações descritas a seguir:

$$H_{single-prot.} = \frac{1}{4} \sum_{k=1}^{N-2} (1 - \cos \theta_k) + 4 \sum_{i=1}^{N-2} \sum_{j=i+2}^N \left(\frac{1}{r_{ij}^{12}} - \frac{C(\sigma_i, \sigma_j)}{r_{ij}^6} \right) \quad (5)$$

A Equação (5) é válida para caracterizar apenas uma cadeia peptídica de N AAS, sendo que o primeiro termo da Equação tende a distender a molécula, enquanto o segundo termo tende a equilibrar essa distensão pela ação das forças hidrofóbicas/hidrofílicas (de Van der Waals). A Equação (5) mostrada ainda depende do coeficiente C, que se relaciona com o fator de hidrofobicidade, como esse estudo descreve interações considerando um sistema no modelo AB, tem-se para C:

$$C(\sigma_i, \sigma_j) = \begin{cases} +1.0 & \sigma_i, \sigma_j = A \\ +0.5 & \sigma_i, \sigma_j = B \\ -0.5 & \sigma_i \neq \sigma_j. \end{cases} \quad (6)$$

Há ainda no modelo AB a possibilidade de introdução de problemas mais complexos, como a interação entre proteínas, responsável pela formação de agregados. Nesse sentido, a Equação (7) pode descrever a formação de agregados pela interação proteína-proteína, contidas em conjuntos de M polipeptídeos, representados por uma hamiltoniana (energia do sistema). Para tal, considere a energia de interação de M proteínas, indexadas por “ μ ” e “ ν ”, sendo os resíduos i_μ e j_ν nas respectivas proteínas descritas no modelo AB, que se implementa como segue abaixo a Equação 7:

$$H_{M-prots.} = \sum_{\mu=1}^{\mu=M} H_{1-prot.}^\mu + 4 \sum_{j_\nu > i_\nu + 1, i \neq j} \left(\frac{1}{r_{i_\mu j_\nu}^{12}} - \frac{C(\sigma_i, \sigma_j)}{r_{i_\mu j_\nu}^6} \right) \quad (7)$$

Nota-se que as Equações de (5) a (7) levam em consideração apenas as características hidrofóbicas (A) e hidrofílicas (B) dos AAS de cada proteína em estudo. Apesar desta radical simplificação nos potenciais de interações moleculares, esta abordagem

resulta também em uma drástica redução das necessidades computacionais e por isso é ideal a estudos preliminares no tema.

As análises numéricas e/ou estatísticas dos resultados computacionais obtidos foram efetuadas com o auxílio de pacotes de *softwares* amplamente empregados na área de física experimental e química, e que já contam com excelentes versões *freeware* de código-fonte aberto, como é o caso do *Fortran 90*, *QtiPlot*, *XmGrace* e do *RasMol*.

Com o desenvolvimento da biologia estrutural após a década de 1950, a tecnologia computacional teve de ser aprimorada gradativamente para conseguir acompanhar o ritmo das descobertas. Atualmente é possível fazer diversos estudos complexos nessa área com os avanços alcançados, mesmo em computadores pessoais. Isso também levou a criação de bancos de dados com estruturas de proteínas para download (PDB, 2012) Dentre as diversas ferramentas para visualização de dados disponíveis, foram utilizados nesse trabalho:

Fortran 90 - Compilador, usado na execução do programa de análise.

QtiPlot - É uma plataforma de análise de dados complexos usado para o ensino, bem como para a análise e visualização de dados em empresas, escolas, universidades e institutos de pesquisa em todo o mundo, sendo de uso prático (*freeware*) em relação a outros *softwares* com as mesmas funcionalidades.

XmGrace - é uma ferramenta de plotagem gráfica em 2D que permite modificar interativamente dados, onde é possível definir todos os tipos de parâmetros de plotagem, mudar aparência de figuras, bem como salvar a figura em vários formatos possíveis.

RasMol - Foi o mais utilizado para visualização das estruturas proteicas. implementado em Linux, e de uso livre, portanto de uso gratuito. O que torna prático o uso desse software é a capacidade de gerar gráficos moleculares de proteínas complexas com formato PDB dentre outros, usando capacidade relativamente baixa de CPU.

Assim, pela natureza teórico-computacional deste projeto de TCC, não foi necessário o uso de triplicata nas análises. O custo se reduz a apenas dois computadores quadricore com preço individual de R\$ 2500,00 e a energia elétrica gasta com a máquina, uma vez que esta não poderá ser desligada ao longo das simulações. Não houve a necessidade de aquisição de novos equipamentos para a execução deste projeto, que contou apenas com a infraestrutura computacional (duas máquinas quadricore, sendo os pacotes de *softwares* utilizados, gratuitos) já disponíveis no câmpus Toledo da UTFPR.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A abordagem microcanônica aqui realizada se deve ao fato de que esse formalismo mecânico-estatístico permite uma descrição simples e direta em relação a caracterização transições de fase em sistemas pequenos, cujo o alcance das interações pode ser maior que os próprios sistemas em si o que não necessariamente ocorre quando usado a abordagem usual, canônica. Além do mais, devido a desorganização estatística de sistemas físicos isolados, conforme é descrito na Equação de Boltzmann (1), o equilíbrio termodinâmico é realizado pela maximização da entropia do sistema diretamente mensurável pelo formalismo microcanônico (BERG, 2006).

A abordagem microcanônica, através do algoritmo MUCA permitiu nos estudos descritos nesse presente projeto a descrição das características termodinâmicas das três versões mutantes da IAPP usando-se para isso as curvas calóricas, e suas funções-resposta das análises. As Equações (4) e (5) mostram que a energia computada é física (cinética e dinâmica) e conforme a Figura 9 há pontos que indicam estados intermediários enovelados para a hIAPP. Dessa forma, os agregados que se formam são os mesmos encontrados no pâncreas de diabéticos em biópsias, fato já comentado anteriormente.

Foram realizadas análises das séries temporais das simulações em MUCA e produção de diagramas de fase termodinâmicos a partir destes dados de saída. Com isso, possibilitou-se a caracterização de transições de fase biológicas, como o enovelamento e agregação proteicos, com foco na hIAPP. Como foi discutido em vários trabalhos semelhantes (ABEDINI, 2013), e aqui confirmado em nessas simulações, a rIAPP apresenta a forma mais estável de IAPP, seguida pela cIAPP, e por fim pela hIAPP. Esta afirmação encontra respaldo no calor latente de agregação calculado para cada uma destas formas moleculares. Convém ainda resaltar que existem várias escalas de hidrofobicidade, sendo aqui nesse estudo utilizado a escala ‘Roseman’.

A formação de agregados proteicos ocorreram no fragmento 20-29 dos AAS da amilina humana conforme descrito na literatura (CABALEIRO-LAGO, 2009) Comparando-se os fragmentos da IAPP do homem, do gato, e do rato, nesse último caso, há a formação de agregado, mas esta forma é a mais estável, pois $Cv_{rIAPP} > Cv_{cIAPP} > Cv_{hIAPP}$. Devido essa estabilidade o rato não desenvolve naturalmente ‘*in vivo*’ a DM-II enquanto o gato está em uma condição intermediária, ou seja ele fica diabético mas seu estado de doença é “reversível” em comparação com humano. Encontram-se abaixo, a hIAPP, cIAPP e a rIAPP,

respectivamente e os resíduos divergentes, na estrutura representada em letras conforme literatura (RHOADES, *et al* 2000, p. 230-238; CAO, 2013):

KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY

KCNTATCATQRLANFLIRSSNLLGAILSPTNVGSNTY

KCNTATCATQRLANFLVRSSNLLGPVLPPTNVGSNTY

As curvas descritas nos Gráficos 1 e 2 evidenciam um comportamento molecular distinto em relação agregação, e plotando-se (C_V) vs (E/N), obtiveram-se as regiões onde há transição de fase. Como resultado deste estudo, através de SMC dinâmico foi possível analisar as características termodinâmicas das estruturas proteicas em três níveis: considerando a estrutura inteira, contendo os 37 AAS; dos fragmentos patogênicos, de 20-29 e uma possível interação dos fragmentos, sendo computadas a energia do sistema (E), β ($1/T$), e consequentemente a entropia (S) com o objetivo de avaliar a estabilidade termodinâmica dos sistemas em estudo.

Apesar da utilização de modelos bem simplificados, a partir de uma evolução da estrutura primária de IAPP, utilização de “pseudoátomos” e simular apenas as interações hidrofóbico/polar (do modelo AB), o modelo entra em concordância com resultados obtidos através de extensos estudos de MD, considerando a interação simples AAS vs água no envelhecimento proteico, sendo que alguns estudos propõe algo ainda mais radical: a substituição da Prolina nas versões de hIAPP para a rIAPP como causa do desencadeamento da doença (JIANG, 2009).

Os resultados evidenciam calor específico do sistema (microcanônico) negativo e ainda uma transição de fase de primeira ordem (hIAPP) que implica em agregação e que envolve um calor latente canônico (aquele em que não se detectam mudanças de temperatura embora haja fornecimento de calor ao sistema). Sabendo-se que o envelhecimento proteico conduz a proteína a um mínimo de energia livre, os dados de saída das simulações evidenciam o fato de que as falhas no processo desencadeiam, quando uma proteína não consegue assumir sua conformação nativa ou biologicamente funcional, um estado metaestável. Esse é o princípio demonstrado não apenas com a estrutura inteira da proteína estudada, mas é algo que ocorre para os fragmentos isolados permitindo que a abordagem ‘*in silico*’ do modelo AB, simplificada, usando pseudoátomos em modelo “Grão-grosso” é satisfatório na explicação teórica das causas da DM-II. Segue abaixo os Gráficos 1 e 2 de saída das análises para hIAPP (Humano), cIAPP (felino) e rIAPP (roedor).

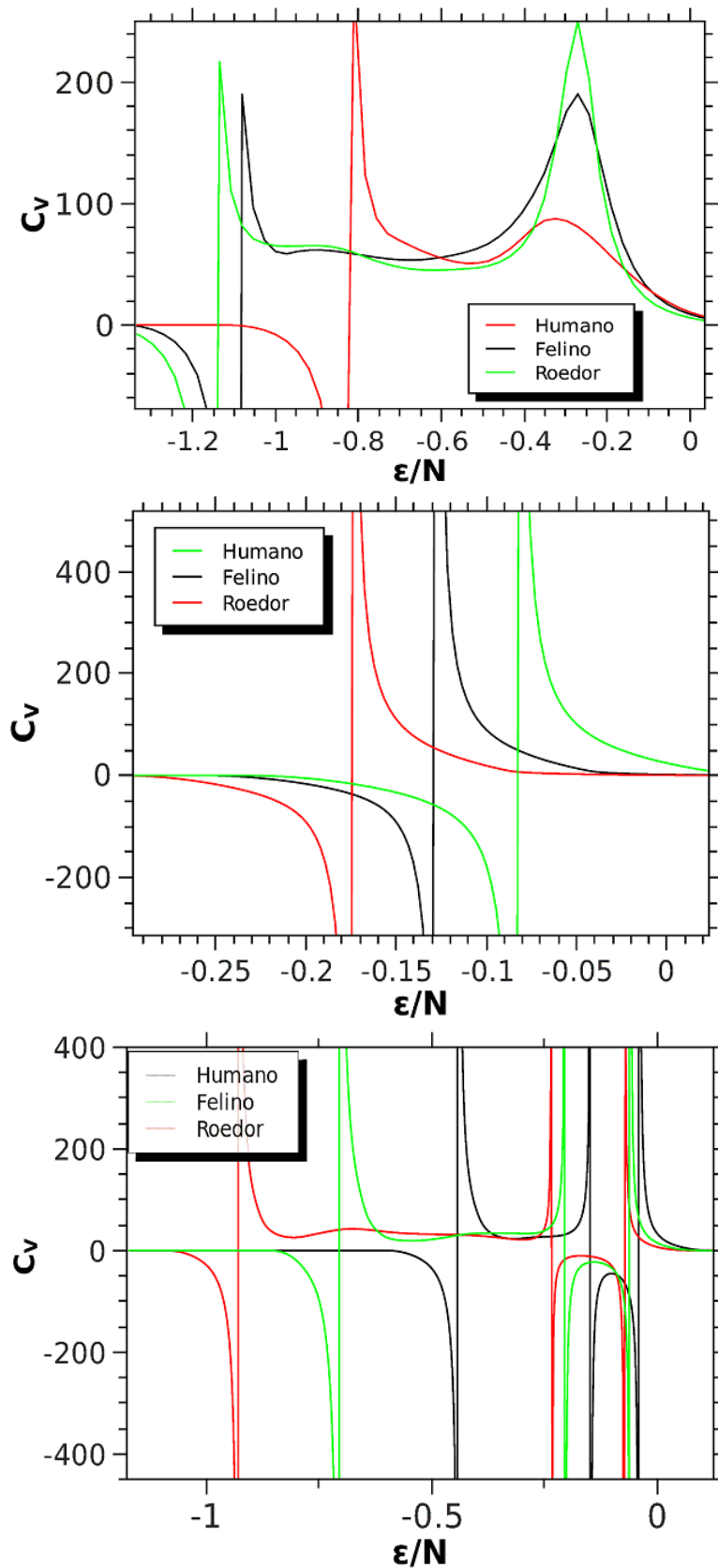


Gráfico 1 - Figura no Topo: resultados referentes ao calor específico extraída da análise do envelhecimento de uma cópia da molécula de IAPP para: roedores (rIAPP), felinos (cIAPP) e humanos (hIAPP). Figura Intermediária; análise do C_v dos fragmentos de 20 a 29 para o processo de envelhecimento; Figura Inferior: análise do C_v dos mesmos segmentos de 20 a 29 das supracitadas versões de IAPP durante a transição de fase de agregação.

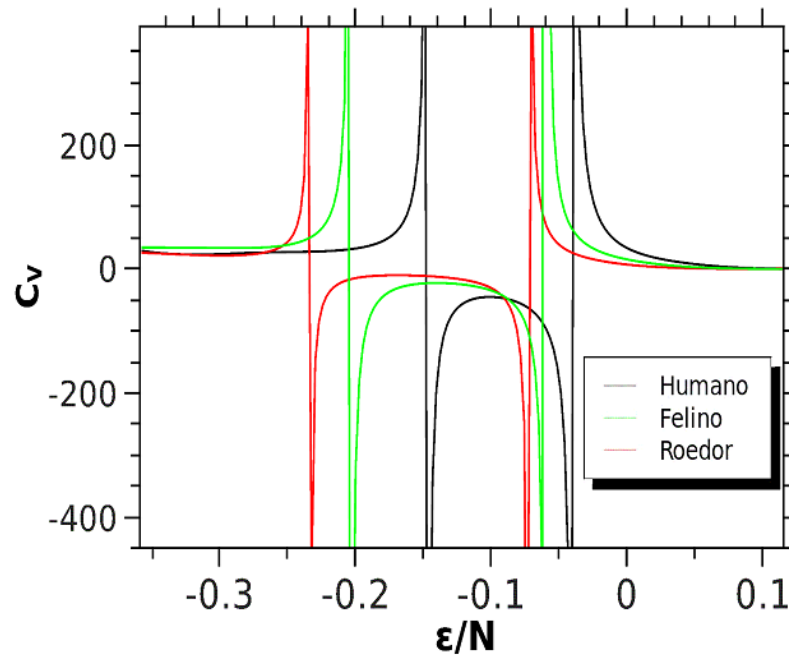


Gráfico 2 – Ampliação da região de transição de fase de primeira ordem (agregação) dos fragmentos. Note que o calor latente de transição (intervalo em que $C_v < 0$ em ϵ/N) é maior para rIAPP, seguido por cIAPP e hIAPP: isso denota a estabilidade das fases.

Na prática, é necessário maior quantidade de energia para que ocorra a agregação no sistema da IAPP dos roedores e felinos. Esse fato é suficiente para explicar, por exemplo a reversibilidade da diabetes no gato, uma vez que o agregado gerado a partir do envelhecimento da cIAPP é instável, ou seja cai em um “poço entálpico” com rotas intermediárias conforme a Figura 9, em uma situação em que sua estrutura não se estabiliza em um estado desnaturado. Para a rIAPP a quantidade de energia necessária é ainda maior, e dessa forma a formação de agregados é muito instável termodinamicamente, o que culmina na não formação de agregados a partir do envelhecimento da estrutura proteica rIAPP, motivo pelo qual o rato não fica espontaneamente diabético na natureza. O estudo aqui dirigido indica que os AAS de 20 a 29 são responsáveis pela da DM-II em humanos. Obtendo-se os valores numéricos para caracterização dos sistemas como, transição de 1ª ordem microcanônica tem-se que:

$$Q = m * L \quad (8)$$

Sendo $L = \Delta L = (E/N_2 - E/N_1)$:

$E/N = \text{Energia/número de AAS}$

hIAPP = $L = 0,1084$ (Humano);

cIAPP = $L = 0,1417$ (Felino);

rIAPP = $L = 0,1644$ (Roedor).

Nota-se que há formação de um núcleo hidrofóbico na estrutura da hIAPP, uma vez que esta encontra-se em um estado de maior energia (que rIAPP e cIAPP) e por isso o seu enovelamento processa-se com maior entropia do sistema para uma mesma energia-livre termodinâmica “F”, pois $F = E - TS$ (SANTOS, 2012). Como existe uma tendência de aumento de entropia em sistemas complexos como o descrito, ocorre agregação proteica. Na Figura 12 abaixo encontram-se as estruturas hIAPP, cIAPP e rIAPP em suas formas nativas (de mínima energia).

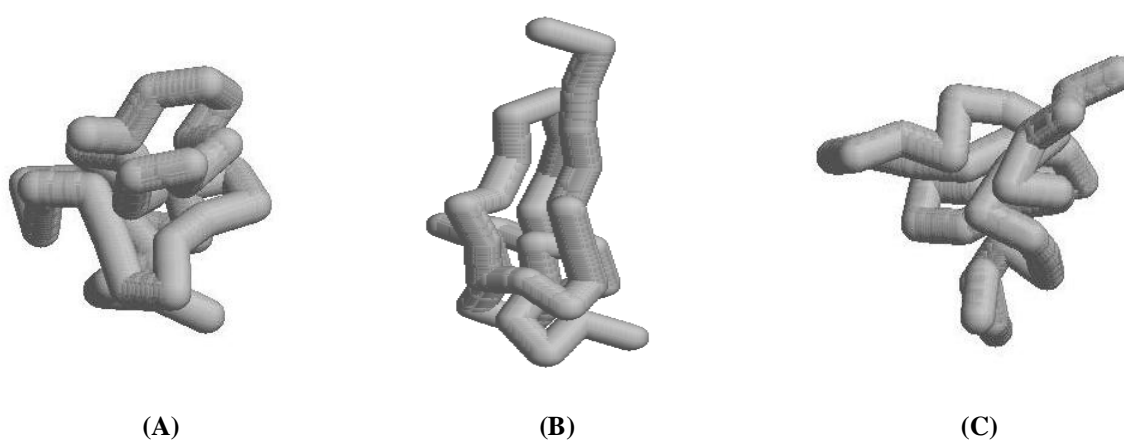


Figura 12 – Estruturas proteicas em *backbone*. (A) hIAPP; (B) cIAPP; (C) rIAPP.

Sendo N o número de AAS nas estruturas em SMC, sabe-se que a estimativa de atualizações MUCA por repetição dentro do conjunto simulacional foi de $2 \cdot N \cdot 10^6$. Foram feitas 1000 repetições MUCA, o que gerou um total de $2 \cdot N \cdot 10^9$ configurações testadas ao longo das análises, sendo que o presente método de análise foi validado anteriormente no estudo de estruturas de Fibonacci e Prions (FRIGORI, 2010).

Com o objetivo de entender os potenciais energéticos nas estruturas estudadas e correlacioná-los com valores da tabela de hidrofobicidade ‘Roseman’, foi possível a plotagem das curvas calóricas de β ($=1/T$) versus energia (E) nos três sistemas (Gráfico 3). Comparando-se os dados termodinâmicos obtidos nas simulações para as versões da IAPP, tem-se o gráfico abaixo, mostrando a curva calórica para o enovelamento, sendo nítida a diferença entre as estruturas. No caso, a hIAPP permanece em um estado de maior energia do que na rIAPP e é possível notar pontos discrepantes nas curvas, conforme abaixo:

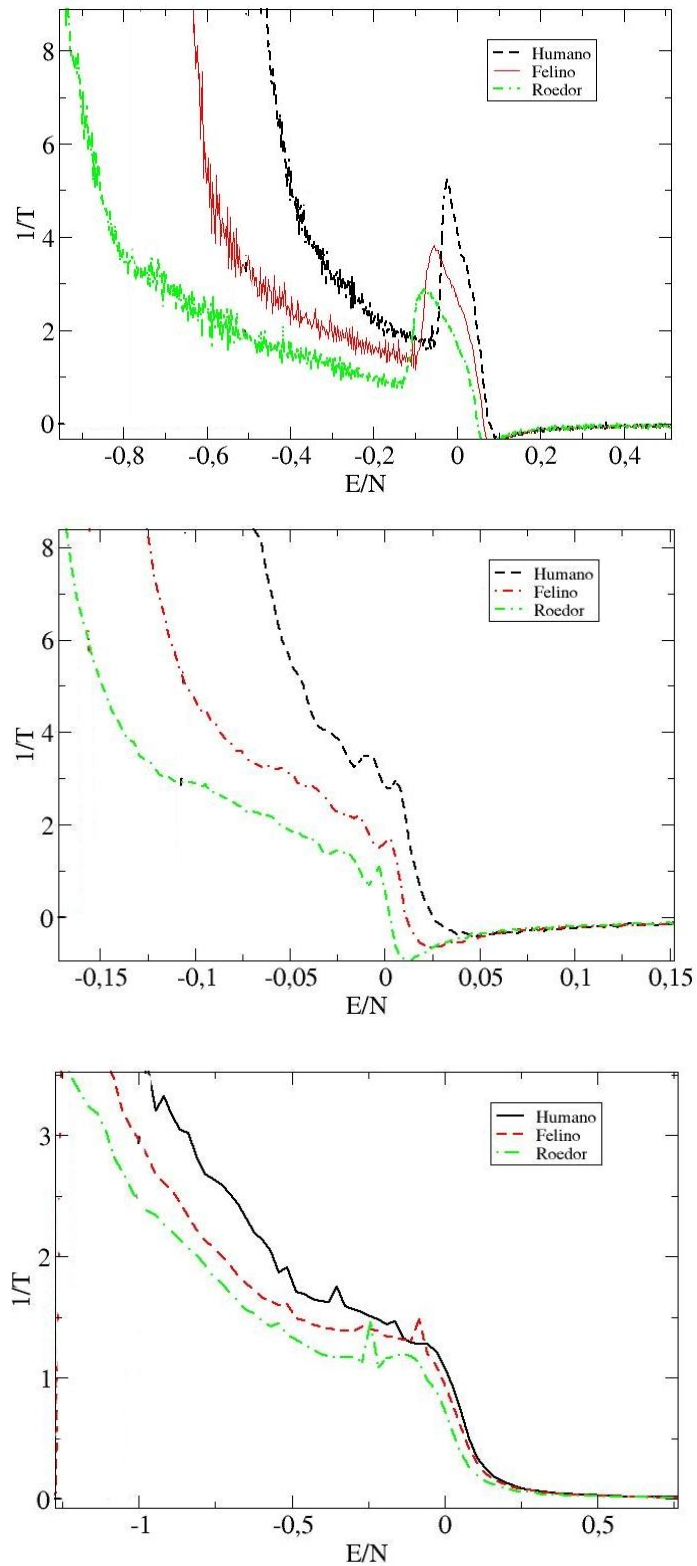


Gráfico 3 - Figura superior: curva calórica do comportamento agregacional dos fragmentos de 20 a 29 de hIAPP (curva superior), cIAPP (curva intermediária) e rIAPP (curva inferior). Figura intermediária: curva calórica referente ao envelhecimento dos fragmentos de 20 a 29 de hIAPP, cIAPP e rIAPP. Figura inferior: curva calórica referente ao envelhecimento de hIAPP, cIAPP e rIAPP.

6 CONCLUSÃO

No estudo aqui detalhado, foi possível enfatizar a importância das análises termodinâmicas de estabilidade usando mecanismos de estatística microcanônica, usando uma descrição computacional de modelo simplificado AB, hidrofóbico/polar (BACHMANN, 2005).

Foram realizadas análises de estabilidade termodinâmica nas diferentes variantes moleculares de IAPP visando detectar propensões específicas para a formação de agregados tóxicos. Utilizando-se a abordagem microcanônica dos processos termodinâmicos relacionados a proteína em questão, fez-se o estudo dos agregados proteicos formados na agregação daquela proteína, quantificação dos resultados obtidos em termos de calores específicos e energias livres; bem como uma investigação da dependência dos resultados termodinâmicos quanto a escala de hidrofobicidade ‘Roseman’ empregada durante o mapeamento da sequência primária do PDB (*Protein Data Bank*) no modelo mínimo AB

A partir de uma estrutura primária simples, evoluiu-se a mesma por meio de simulações até encontrar os estados enovelados. Também foram analisadas, por meios termodinâmicos, formações de agregados e discutidos as causas, propondo explicações do porquê da não agregação da rIAPP. Estudos como esse constitui o primeiro passo em relação ao desenho racional de fármacos pois como é descrito em (BERG, 2008) “as leis da termodinâmica comandam o comportamento bioquímico”.

REFERÊNCIAS

ABEDINI A.; SCHMIDT A. M. **Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes** Diabetes Research Program, V. 587, P. 1119–1127, 2013.

ACADEMIA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA, **Estruturas terciárias**. 2012. Disponível em: <<http://www.ciencianews.com.br>> acesso em 10/06/2012, 03:10.

AMYLIN, **Amylin Pharmaceuticals**, 2012. Disponível em < <http://www.amylin.com/> > acesso em 20/03/2012, 06:45.

ANDREWS, M. N., WINTER, R. **Comparing the structural properties of human and rat islet amyloid polypeptide by MD computer simulations**. Biophysical Chemistry v.156 p.43–50, 2011.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente** Trad. Ignez Caracelli *et al.* 5^a ed., Bookman, Porto Alegre, 2011.

BACHMANN, M. et al. **Multicanonical study of coarse-grained off-lattice models for folding heteropolymers**. Physical Review v.71, 031906, 2005;

BALL, D. W. **Físico-química**. v. 1, Trad. Ana Maron Vichi, 1^a ed., Editora Pioneira Thomsom Learning, São Paulo, 2005.

BEIG, F. B. **Termodinâmica do enovelamento de cadeias heteropoliméricas através do algoritmo de Wang-Landau** Dissertação de mestrado, Universidade estadual paulista, Rio Claro-SP, 2006. Disponível em: < http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/brc/33004137063P6/2006/beig_fb_me_rcla.pdf > acesso em 10/04/2012.

BENÍTEZ, C. M. V. **Um algoritmo genético paralelo para o problema de dobramento de proteínas utilizando o modelo 3 DHP com cadeia lateral**. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em <http://files.dirppg.ct.utfpr.edu.br/cpgei/Ano_2010/dissertacoes/CPGEI_Dissertacao_532_2010.pdf> Acesso em 15 Março de 2012, 19:30.

BERG, B. A., **Multicanonical simulations step by step**. Comp. Phys. Commun. v.153, p. 397-406, 2003.

BERG, J. M.; TYMOCZKO J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Trad. Moreira, A. J. M. da Silva *et al.* Guanabara Koogan, 6^a Edição, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

BRANDEN, C; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. Garland publishing, New York, 2^a ed.1999.

CABALEIRO-LAGO, C.; LYNCH I.; DAWSON, K. A.; LINSE S. **Inhibition of IAPP and IAPP₍₂₀₋₂₉₎ Fibrillation by Polymeric Nanoparticles**. American Chemical Society, 26 (5), p. 3453–3461, 2009.

CAO, P.; ABEDINI, A.; RALEIGH, D. P. **Aggregation of islet amyloid polypeptide: from physical chemistry to cell biology**. Structural Biology, V. 23, Pages 82–89 2013.

CERCIGNANI, C. **Ludwig Boltzmann: the man who trusted the atoms**. Oxford University, 1^a edição, 1998.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; MARCÍLIO, R. **Bioquímica do diabetes melito** Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2011.

FRIGORI, R. B. **Simulações microcanônicas de proteínas**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76131/tde-12112007-090407/en.php>> acesso em 23/09/2011, 13:00.

GALEAZZA, M. T.; O'BRIEN, T. D.; JOHNSON, K. H.; SEYBOLD, V. S. **Islet amyloid polypeptide (IAPP) competes for two binding sites of CGRP**. Peptides, v. 12 p. 585-591, 1991.

GROSS, D. H. E. **Microcanonical Thermodynamics: Phase Transitions in Small Systems, Lecture Notes in Physics 66**. World Scientific, Singapore, 2001.

HAYDEN, M. R. **Islet amyloid, metabolic syndrome, and the natural progressive history of type 2 diabetes mellitus**. JOP, v. 5, p. 38-126, 2002.

IRBÄCK, A.; SAMUELSSON B.; SJUNNESSON F.; WALLIN S. **Thermodynamics of and Structure Formation in Proteins**. Biophysical Journal v.85, September, 1466-1473, 2003.

JAIKARAM, E.T.; CLARK, A. **Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology**. biochim. biophys acta nov 29 1537(3): p. 179-203, 2001.

JIANG, P.; XU, W.; MU, Y. **Amyloidogenesis Abolished by Proline Substitutions but Enhanced by Lipid Binding.** PLoS Comput Biol 5(4): e1000357. doi:10.1371/journal.pcbi.1000357, 2009.

JONES, M. C. **Therapies for Diabetes: Pramlintide and Exenatide.** American Academy of Family Physicians, 2007. Disponível em <<http://www.aafp.org/afp/2007/0615/p1831.html>> acesso em 22 de Maio de 2012.

KERIAN, K. **Medicine Newbie**, School of Medical Sciences, Kelantan, MALAYSIA. 2011. Disponível em: < <http://medicinewbie.blogspot.com.br/2011/05/professional-i-exam-2-may-2011-part-4.html>> Acesso em 01/06/2012, 12:55.

LANDAU, D. P.; BINDER, K; **A guide to Monte Carlo simulation in statistical physics.** Cambridge university press, 2^a ed., New York, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry.** W. H., Freeman, 4^a ed., New York, 2005.

LU, Yi; FREELAND, **On the evolution of the standard amino-acid alphabet** Gen. Biol. v. 7, 102, 2006.

MCQUARRIE, D. A. **Statistical Mechanics.** University science books, 2^a Edição, 2000.

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, **Protein Structure. 1994**, Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28438/>> acesso em 23/05/2012, 11:30.

PDB, **RCSB.** Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>> acesso em 31/08/2012, 15:25.

PRAMLINTIDE, **Chemnet: 151126-32-8, Chemical Name: Pramlintide.** 2012, Disponível em: < <http://www.chemnet.com/cas/pt/151126-32-8/Pramlintide.html>> Acesso em 15/05/2012, 12:35.

PRAMLINTIDE, **Informaton from answers.com,** 2012, Disponível em: < <http://www.answers.com/topic/pramlintide>> acesso em 12/04/2012, 11:00.

PROTEINS, **Estrutura quaternária da hemoglobina.** Disponível em: <<http://chswab.lr.k12.nj.us/mstanley/outlines/organicAP/aporgchem.html>> acesso em 15/04/2012, 16:30.

RHOADES, E.; AGARWAL, J.; GAFNI, A. **Aggregation of an amyloidogenic fragment of human islet amyloid polypeptide.** Biochimica et Biophysica Acta, 1476 p. 230-238, 2000.

RICHTER, C. A. **Água: Métodos e tecnologia de tratamento.** São Paulo: Blucher, p. 65-66, 2009.

SANTOS, J.; FRIGORI, R. B. **Simulação computacional da IAPP e ferramentas para visualização de estruturas proteicas.** Disponível em: <<http://conferencias.utfpr.edu.br/ocs/index.php/sicite/2012/paper/viewFile/212/227>> acesso em 17/08/2013, 2:10.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD), 2012, **São 12 milhões de diabéticos no Brasil.** Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br>> acesso em 12/05/2012, 17:35.

SOLOMONS, e FRYLE, T. W. G. **Química Orgânica.** 8ª edição, Rio de Janeiro, LTC editora, v. 1, 2005.

WESTERMARK, P.; BETSHOLTZ, C.; CHRISTMANSSON, L.; ENGSTRIM, U.; RORSMAN, F.; SVENSSON, V.; JOHNSON, K. **Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between Species.** FEBS Letter, v. 251, p. 261-264, July 1989.

YOUNG, A. **Amylin: Physiology and Pharmacology.** Elsevier academic press; 1ª ed., 2005, San Diego, USA.

YIN, Chun-Yang. **Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment.** ProcessBiochemistry, v. 45, p. 1437–1444, 2010.