

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM QUÍMICA DE MINAS GERAIS**

**ESTUDO TEÓRICO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA ATP7A COM A
CISPLATINA**

CHRISTINA TELLES BORGES

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM QUÍMICA DE MINAS GERAIS**

CHRISTINA TELLES BORGES

**ESTUDO TEÓRICO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA
ATP7A COM A CISPLATINA**

Dissertação aprovada por banca examinadora em vinte e sete de junho de 2016, conferindo ao autor o título de Mestre em Química – Mestrado Multicêntrico em Química de Minas Gerais.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Juliana Fedoce Lopes (Orientadora)- UNIFEI
Prof. Dr. Guilherme Ferreira de Lima (Coorientador) –UFMG
Prof.^a Dr.^a Daniela Sach – UNIFEI
Prof. Dr Luiz Antônio Sodré Costa - UFJF

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

À Deus, à minha mãe, à
minha filha e aos amigos
pelo apoio, força e
paciência. Sem eles nada
disso seria possível.

Agradecimentos

- À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e não desistir, me mostrando sempre o caminho certo nas horas incertas.
- À minha orientadora Juliana Fedoce Lopes, por acreditar em mim e me ajudar a superar minhas próprias limitações.
- Ao meu co-orientador, Guilherme Ferreira de Lima, que sempre esteve pronto para me ajudar nas dificuldades.
- À colega de laboratório, Selma Fabiana Bazan, que incansavelmente me ajudou, com carinho e amizade.
- À minha mãe que esteve ao meu lado em todos os momentos, não me deixando nunca desanimar.
- À minha filha que soube suportar os momentos de ausência, me apoiando e sendo a força principal para que eu finalizasse esta etapa da minha vida.
- À todos colegas e professores pelo convívio e aprendizado.
- À todos os colegas do LaQC pela ajuda e amizade
- À FAPEMIG, pelos recursos financiados , sem os quais seria impossível a realização deste projeto.

Lista de abreviaturas

ATP	Adenosina Trifosfato
CD	Dicroísmo circular
Cys	Cisteína
DFT	Density functional theory
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECP	Effective Core Potential
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
GSH	Glutathiona
HF	Hartree-Fock
IMOMM	Integrated molecular orbital + molecular mechanics
IMOMO	Integrated molecular orbital + molecular orbital
IRC	Intrinsic Reaction Coordinate
MM	Mecânica Molecular
ONIOM	Our own n-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics
PBE0	Perdew–Burke–Ernzerhof exchange-correlation functional
PES	Potential Energy Surface
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico
QM	Mecânica quântica
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
STO	Slater Type Orbital
UFF	Universal Force Field

Lista de figuras

Figura 1.1: Representação da fórmula estrutural da cisplatina	2
Figura 1.2: Representação da fórmula estrutural da satraplatina e picoplatina	3
Figura 1.3: Representação da entrada da cisplatina na célula	4
Figura 1.4: Interações da cisplatina no interior da célula	7
Figura 1.5: Proteína ATP7A	8
Figura 1.6: Estrutura do 5° domínio de coordenação metálica da proteína ATP7A	9
Figura 2.1: Esquema de fragmentação de três camadas para o ONIOM	21
Figura 2.2: Esquema de extrapolação do ONIOM para sistemas moleculares de duas camadas	23
Figura 3.1: Sequência de aminoácidos da camada alta do quinto domínio da proteína ATP7A	28
Figura 3.2: Estruturas da reação global entre a proteína ATP7A protonada e a cisplatina	30
Figura 3.3: Estruturas da reação global entre a proteína ATP7A desprotonada e a cisplatina	31
Figura 3.4: Representação esquemática da equação 3.1 evidenciando as estruturas intermediárias e os produtos isolados	32
Figura 3.5: Representação esquemática da equação 3.2 evidenciando as estruturas intermediárias e os produtos isolados	33
Figura 3.6: Estrutura otimizada da cisplatina (CDDP)	35
Figura 3.7 : Cargas de alguns átomos da: (a) cisplatina e (b) da cisteína	36
Figura 3.8: Estrutura do quinto domínio da proteína ATP7A coordenada ao cobre	38
Figura 3.9 : Estrutura otimizada da camada alta do quinto domínio da proteína ATP7A: (a) Interações intramoleculares e (b) cargas dos átomos envolvidos	40
Figura 3.10 : Estrutura otimizada da camada alta do quinto domínio da proteína ATP7A desprotonada	41
Figura 3.11: Estrutura otimizada do produto final da coordenação da platina com o enxofres coordenados	42

Figura 3.12 : Estrutura otimizada do produto final da coordenação da platina com o enxofres desprotonados	44
Figura 3.13 : Estrutura otimizada do produto final da coordenação do cobre com o enxofres protonados	45
Figura 3.14: Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres desprotonados ao cobre	46
Figura 3.15: Estrutura otimizada do reagente intermediário: (a) protonado e (b) desprotonado	47
Figura 3.16: Estrutura otimizada dos produtos intermediários: (a) PIA e (b) PIB	48
Figura 3.17: Estrutura otimizada dos produtos intermediários:(a) PIA' e (b) PIB'	49
Figura 3.18: Estrutura otimizada dos produtos isolados: (a) PA1 e (b) PB1	50
Figura 3.19: Estrutura otimizada dos produtos isolados: (a) PA1' e (b) PB1'	50
Figura 3.20: Átomos usados como parâmetros	51
Figura 3.21: Ângulos diedros do sítio ativo	52
Figura 3.22: Estrutura otimizada do complexo tetraédrico com cobre coordenado a quatro moléculas de água	59
Figura 3.23: Estrutura otimizada dos produtos finais das reações envolvendo o complexo tetraédrico	60

Lista de tabelas

Tabela 3.1: Dados estruturais para a molécula da cisplatina	35
Tabela 3.2: Valores de energia e distância entre enxofres para as 20 estruturas do quinto domínio depositadas no PDB	37
Tabela 3.3: Medidas dos ângulos diedros	53
Tabela 3.4: Medidas das distâncias entre os enxofre e os átomos usados como parâmetros	53
Tabela 3.5: Dados termodinâmicos das reações globais em kcal/mol	55
Tabela 3.6: Dados termodinâmicos para as reações envolvendo espécies intermediárias em kcal.mol	57

RESUMO

Um quimioterápico muito utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer é o cis-diaminodicloroplatina (II), conhecido por cisplatina. Apesar do amplo espectro de atividades apresentado por esse fármaco, fazendo com que ele seja usado para tratar diversos tipos de tumores, a resistência limita drasticamente seu uso. Essa resistência está associada, entre outros fatores, à redução da acumulação intracelular da droga o que pode estar relacionada à interações com várias biomoléculas tioladas, como por exemplo a proteína ATP7A. A proteína ATP7A tem 40280 átomos e alguns domínios de ligação à metais, sendo responsável pelo controle de íons metálicos no organismo. Cálculos computacionais utilizando o programa Gaussian 09 e a metodologia híbrida QM/MM com o método ONIOM, foram feitos para a reação entre o sítio ativo do quinto domínio de ligação à metais da proteína ATP7A e a cisplatina, com o objetivo de analisar parâmetros termodinâmicos que possam ser um indicativo da possível participação da proteína ATP7A no mecanismo de resistência à cisplatina.

Palavras chave: Cisplatina. Proteína ATP7A. Química Computacional. ONIOM.

ABSTRACT

An often used chemotherapeutic for treating numberless types of cancer is *cis*-diaminodichloroplatin (II), known as cisplatin. Although the broad spectrum of activities presented by this drug, which contributes for it to be used for treating many kinds of tumors, resistance limits drastically it's use. This resistance is associated, among other factors, with the reduction in intracellular drug accumulation, which can be related with interactions between various biomolecules with sulfur, for example, the ATP7A protein. This protein has 40280 atoms and some metal binding domains, being responsible for the control of the metallic ions in the organism. Computational calculus using the program Gaussian 09 and hybrid methods QM / MM with the ONIOM method were done for the reaction between the active site of the fifth binding domain metals ATP7A protein and cisplatin, for the purpose of analyzing thermodynamic parameters that may be indicative of the possible participation of ATP7A protein in cisplatin resistance mechanism.

Keywords: Cisplatin. ATP7A Protein. Computational Chemistry. ONIOM.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer e tratamento quimioterápico	1
1.2. Cisplatina: um breve histórico	2
1.3. Mecanismos de ação da cisplatina	3
1.4. Obstáculos ao uso da cisplatina	4
1.5. Mecanismos de resistência à cisplatina	5
1.6. A proteína ATP7A	7
CAPÍTULO 2	11
2.0. INTRODUÇÃO	11
2.1. Metodologia teórica	11
2.1.1. Introdução à química quântica	12
2.1.2. O método de Hartree - Fock	14
2.1.3. Teoria do funcional da densidade	17
2.1.4. Métodos híbridos	19
2.1.5. Funções de base	24
2.1.6. Pseudopotencial	25
CAPÍTULO 3	27
3.0. RESULTADOS E DISCUSSÕES.	27
3.1. Metodologia de execução	27
3.2. Análise estrutural	34
3.2.1. Cisplatina	35

3.2.2. Modelo experimental do quinto domínio da Proteína ATP7A coordenada ao cobre	36
3.2.3. Estrutura otimizada do quinto domínio da Proteína ATP7A	39
3.2.4. Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres protonados à platina	41
3.2.5. Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres desprotonados à platina	43
3.2.6. Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres protonados ao cobre	45
3.2.7. Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres desprotonados ao cobre	45
3.2.8. Estrutura otimizada dos reagentes intermediários protonados e desprotonados da primeira etapa da reação de substituição	47
3.2.9. Estrutura otimizada dos produtos intermediários da primeira etapa da coordenação da platina com Proteína ATP7A	48
3.2.10. Estrutura otimizada dos produtos isolados da primeira etapa da coordenação da platina com Proteína ATP7A	49
3.2.11. Medidas de mudanças conformacionais da Proteína ATP7A	51
3.3. Análise termodinâmica das reações	54
CAPÍTULO 4	62
4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS	71

CAPÍTULO 1

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e tratamento quimioterápico

Câncer é um termo usado para um conjunto de mais de uma centena de doenças nas quais as células crescem e se dividem de maneira desordenada, invadindo outras células, tecidos e órgãos. Esse processo desordenado ocorre de maneira rápida, o que torna o câncer uma doença agressiva e, muitas vezes, incontrolável (www2.inca.gov.br, 2015).

As causas do câncer são diversas, podendo ser atribuídas a fatores externos, como alimentação, estilo de vida, etc. ou a fatores internos, que são geneticamente pré-determinados e estão relacionados à maneira como o organismo se defende das agressões externas (www.cancer.org.br, 2015). A biomolécula, ácido desoxirribonucleico, DNA, controla as atividades relacionadas à divisão celular (Bray, 1983). Células normais se dividem e multiplicam para que haja desenvolvimento do corpo e reposição de células velhas ou danificadas. Erros nesse processo de divisão provocam alterações no DNA. Em células normais, quando o DNA é danificado, há uma reparação ou morte celular, o que não acontece em células cancerígenas. Nelas, quando o DNA danificado não é reparado, a célula não morre como deveria, mas há um processo de formação de novas células que tem formatos irregulares e que não funcionam corretamente (www.cancer.org.br, 2015).

A quimioterapia do câncer é uma modalidade de tratamento que proporciona maior incidência de cura e também maior sobrevida aos pacientes (Andrade e Silva, 2007). Ela é realizada com medicamentos chamados quimioterápicos, que perturbam ou inibem a divisão das células cancerígenas, provocando então uma interferência na replicação e/ou transcrição do DNA (Jung e Lippard, 2007). Uma desvantagem dos quimioterápicos no tratamento do câncer é a não seletividade dos mesmos. Eles se espalham através da corrente sanguínea pelo corpo todo atacando também as células saudáveis, que acabam sofrendo dos mesmos processos de interferência nas propriedades físico-químicas do DNA e então se programam para morrer, em um processo chamado apoptose (Mapara e Sykes, 2004).

Um das consequências disso é o aparecimento de diversos efeitos colaterais, o que torna a quimioterapia um processo muito incômodo aos pacientes. Um composto inorgânico muito usado há quase 30 anos no tratamento da quimioterapia do câncer é a *cis*-diaminodicloroplatina(II), conhecida por cisplatina.

1.2 Cisplatina: um breve histórico

A molécula de cisplatina foi sintetizada em 1845 por Peyrone, mas somente em 1965 sua ação anticancerígena foi descoberta acidentalmente pelo professor Barnett Rosenberg (Rosenberg, Vancamp *et al.*, 1969). Ele realizava uma experiência de laboratório com a bactéria *Escherichia Coli*, em que se aplicava um campo elétrico à cultura dessa bactéria utilizando eletrodos de platina. O meio de cultura onde essa bactéria se multiplicava era uma solução aquosa que continha, entre outras substâncias, cloreto de amônio (Rosenberg, Vancamp *et al.*, 1965).

Rosenberg percebeu que o processo normal de divisão celular era inibido, sem afetar o crescimento normal das células, chegando então à conclusão que uma nova substância de platina havia se formado durante a aplicação do campo elétrico, pois ao utilizar outros eletrodos, esse fenômeno não ocorria. Rosenberg e seus colaboradores, concluíram, depois de muitos trabalhos no laboratório, que o principal composto que impedia a divisão celular da bactéria *E. coli*, porém permitia o crescimento da células, era o composto $Pt(NH_3)_2Cl_2$. A cisplatina é um composto inorgânico neutro com geometria quadrática plana e sua estrutura está mostrada na Figura 1.1.

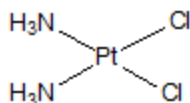


Figura 1.1 – Representação da fórmula estrutural da cisplatina

Compostos à base de platina são um dos pilares da quimioterapia do câncer (Johnstone, Suntharalingam *et al.*, 2015), sendo usados para tratar diversos tipos de cancro, o que comprova a importância dos mesmos e faz com que a busca por novos compostos mais eficientes seja incessante. Entretanto, os que foram aprovados para o tratamento clínico, possuem semelhanças estruturais com a cisplatina. Alguns medicamentos à base de platina da nova geração são: Satraplatina, Picoplatina, Lipoplatina e ProLindac, sendo que os dois primeiros, cujas estruturas estão mostradas

nas figura 1.2, já demonstram causar lesões mais extensas ao DNA (Wheate, Walker *et al.*, 2010).

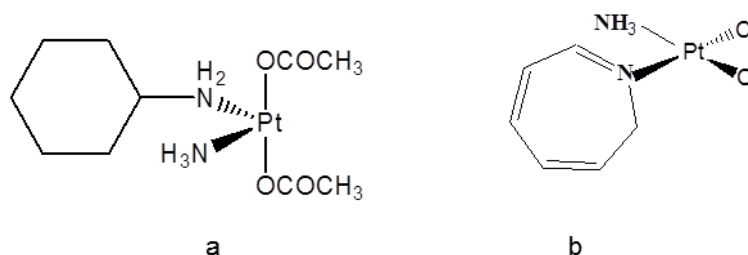


Figura 1.2 – Representação da fórmula estrutural: (a) Satraplatina (b) Picoplatina

1.3 Mecanismo de ação da cisplatina

Devido a sua baixa solubilidade em água, (2,53g/l à 25° C), a cisplatina é aplicada via intravenosa através de uma solução aquosa contendo também cloreto de sódio. A maneira como a cisplatina entra na célula ainda não está muito bem esclarecida (Dubos, 1945). Alguns estudos apontam que ela entra por difusão passiva (Gately e Howell, 1993), devido ao fato da concentração de íons cloreto dentro da célula ser bem inferior à quantidade do mesmo no exterior da célula. Em contrapartida, outros estudos apontam que o transporte ativo seria a maneira com que a cisplatina entra na célula, visto que o CTR1 (principal canal de transporte de cobre) desempenha papel importante na entrada de drogas à base de platina nas célula (Galliani, Losacco et al., 2014).

O efeito citotóxico da cisplatina está associado a sua coordenação à molécula do DNA inibindo a transcrição e replicação e provocando a morte celular (Marques, Gianolio et al.; Bancroft, Lepre et al., 1990). Para que ocorra essa coordenação com o DNA a cisplatina, inicialmente neutra, tem que ser ativada através de reações que envolvem a substituição dos ligantes cloretos, chamados grupos abandonadores, por água, originando duas espécies ionizadas, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^{1+}$ e $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ denominadas monoaquo e diaquo respectivamente, como representado na Figura 1.3.

perda parcial do funcionamento dos rins, entre outros graves fatores, inviabilizando o uso desse fármaco (Gately e Howell, 1993). A resistência pode ser adquirida, através de exposição crônica à droga, onde pode haver adaptação das células tumorais ou mutação genética ou pode apresentar-se como fenômeno intrínseco, inerente ao organismo, quando o fármaco é administrado pela primeira vez. Alguns estudos sugerem que os tumores possam reconhecer e reorganizar seu microambiente para maximizar sua sobrevivência na presença de fármacos anticâncer. Essa capacidade de reconhecimento tem um impacto importante sobre o sucesso da quimioterapia do câncer, porque pode ser a base de um mecanismo de resistência extracelular que modifica as toxinas antes que elas entrem nas células (Centerwall, Kerwood et al., 2008)

Tais limitações no uso da cisplatina (Olszewski e Hamilton, 2010) levaram à pesquisas na tentativa de superar essas desvantagens. Desta forma, muita atenção da comunidade científica tem sido dada ao desenvolvimento e à descoberta de novos complexos à base de platina, com propriedades farmacológicas melhoradas e um espectro mais amplo de atividades antitumorais (Wong e Giandomenico, 1999). Embora métodos sistêmicos para o desenvolvimento de análogos têm produzido agentes com menor toxicidade e com novos mecanismos de ação, nenhum deles apresentou até o momento o nível de cura alcançado pela cisplatina (Guminski, Harnett et al., 2002). A investigação das possíveis causas da resistência à cisplatina tem sido deixada em segundo plano pela comunidade científica em relação à busca de novos análogos ativos. No entanto desvendar os mecanismos de resistência à essa droga seria de grande utilidade no tratamento quimioterápico, visto que esse fármaco apresenta vasto efeito, sendo eficaz para o tratamento de diversos tipos de tumores malignos, inclusive para o desenho racional de novas moléculas biologicamente ativas que não apresentem os mesmos mecanismos de resistência.

1.5 Mecanismos de resistência à cisplatina

A resistência é a maior limitação ao uso continuado da cisplatina (Horibe, Matsuda et al.; Andrews e Howell, 1990; Siddik, 2003; Harrach e Ciarimboli, 2015). O efeito citotóxico da cisplatina é um processo complexo que se estende a partir da entrada da droga na célula até a sua chegada ao alvo final que é o DNA, sendo que em qualquer etapa deste processo, podem ocorrer eventos intracelulares que comprometam a eficácia da droga, por causar, por exemplo, uma redução da extensão de danos ao

DNA (Chu, 1994; Samimi, Safaei et al., 2004). Esta redução está associada, entre outros fatores, a inibição da citotoxicidade induzida da droga (Lai, Ozols et al., 1988) não sendo porém uma característica presente em todas as células resistentes à cisplatina (Schmidt e Chaney, 1993).

Em geral, a resistência é multifatorial (Perez, 1998), para a qual vários mecanismos contribuem simultaneamente, fazendo com que o elevado nível de resistência seja um efeito líquido de múltiplos mecanismos independentes, o que aumenta a dificuldade para contornar esse problema. (Siddik, 2003; Brabec e Kasarkova, 2005; Centerwall, Kerwood et al., 2008).

Uma característica comum às células resistentes é a redução da acumulação intracelular do fármaco (Boulikas e Vougiouka, 2003), sendo responsável por 70 a 90% da resistência total (Shen, Pouliot et al.). Essa redução pode ser provocada por uma falha na absorção de cisplatina, fato este que geralmente acompanha o processo de resistência (Katano, Kondo et al., 2002). A absorção da cisplatina pode ser influenciada por diversos fatores, como por exemplo, o pH (Kelland, 2007; Stewart, 2007) ou ainda ser prejudicada pelo aumento do efluxo da droga, que pode estar associado à interações intracelulares.

As espécies ativadas, monoquo e diaquo, por terem carga positiva, possuem alta afinidade química com diversos nucleófilos endógenos (El-Khateeb, Appleton et al., 1999), como, por exemplo, a glutationa (GSH) (Godwin, Meister et al., 1992), que é um tripeptídeo encontrado em altas concentrações no interior da célula e também a metalotiona (Siegsmund, Marx et al., 1999), que também possui grupos tiol, como a glutationa, só que em maior quantidade. Alguns estudos apontam que a glutationa reage com a cisplatina formando quelatos e uma vez coordenada ao GSH, grande parte da mesma é interceptada e sofre efluxo ao entrar na célula (Galliani, Losacco et al., 2014).

Outros estudos apontam que proteínas responsáveis pelo controle da concentração (homeostase) de cobre no organismo como por exemplo, a proteína ATP7A, possam estar envolvidas também no efluxo de drogas à base de platina (Safaei, Holzer et al., 2004; Kuo, Chen et al., 2007; Harrach e Ciarimboli, 2015).

A característica central do sistema de homeostase de cobre é a presença de proteínas ricas em aminoácidos do tipo: cisteína, metionina e histidina, que permitem a entrega de cobre via interação proteína-proteína, de tal maneira que a concentração de cobre livre na célula é muito pequena ($< 10^{-18}$ M). (Banci, Bertini, Ciofi-Baffoni et al., 2005)

A figura 1.4 representa algumas das interações da cisplatina no interior da célula, como por exemplo, com a glutatona e a metalotionina, provocando seu efluxo da célula e consequentemente a diminuição intracelular da droga.

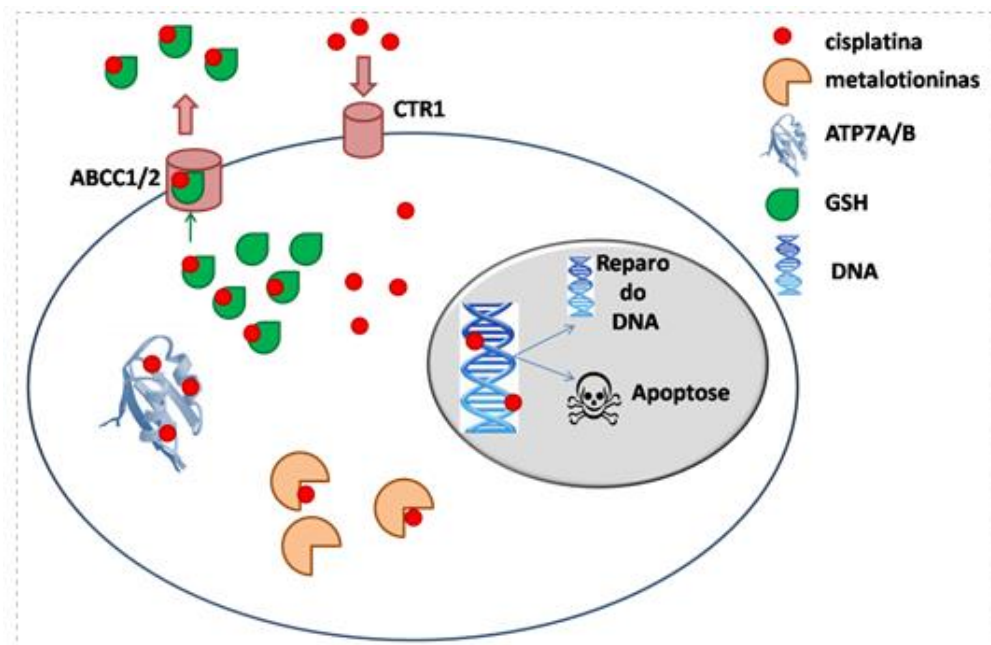


Figura 1.4 – Interações da cisplatina no interior da célula

1.6 A proteína ATP7A

A proteína ATP7A é uma proteína do grupo das ATPases, e é chamada assim por utilizar a energia química da hidrólise do nucleotídeo adenosina trifosfato, ATP, para facilitar o transporte ativo de cátions, através de diversas membranas celulares (Lutsenko, Barnes et al., 2007). Ela é expressa na maioria dos tecidos e sua atividade de transporte e controle da concentração de cobre é fundamental para o desenvolvimento do sistema nervoso central e para muitos processos fisiológicos. Falhas nesse processo de distribuição de cobre por meio da ATP7A provocam uma doença infantil fatal denominada síndrome de Menkes (Kim, Smith et al., 2002).

A proteína ATP7A possui alguns domínios de ligação à metais e por meio deles, atua na regulação celular das concentrações de íons cobre no organismo de mamíferos, transportando cobre para o complexo de Golgi ou eliminando o excesso deste metal quando há acumulação excessiva do mesmo em uma célula, o que pode ocasionar danos celulares (Banci, Bertini, Ciofi-Baffoni et al., 2005)

Quando as concentrações extracelulares de cobre são baixas, a proteína ATP7A se localiza no complexo de Golgi. A proteína se move para a membrana plasmática

quando os níveis de cobre são aumentados, sendo esse processo de realocização reversível e também associado ao processo de resistência à cisplatina (Kalayda, Wagner et al., 2008). Células transfectadas (processo onde há uma introdução intencional) por essa proteína apresentaram alterações na sensibilidade citotóxica e no acúmulo de drogas à base de platina (Safaei, Holzer et al., 2004).

Um método para a definição de um possível papel da proteína ATP7A no mecanismo de resistência às drogas a base de platina foi feito a partir de uma análise entre a reação de antígeno e anticorpo, por meio da qual é possível identificar a presença de moléculas e proteínas em células e tecidos visualizados ao microscópico. Essa análise é chamada de Imuno-histoquímica (Capelozzi, 2009), e por meio dela, foi feita a medida da expressão de ATP7A em órgãos humanos normais e em várias amostras de tumores ovarianos obtidos a partir de diferentes pacientes antes e depois de pelo menos dois ciclos de terapia a base de platina e observou-se que a ATP7A não é detectável na maioria dos tecidos normais, tendo uma expressão considerável em várias células doentes (Samimi, Varki et al., 2003).

A proteína ATP7A representada na figura 1.5, tem 40280 átomos e possui uma longa cauda N-terminal com 6 domínios de ligação com íons cobre (Goodyer, Jones et al., 1999).



Figura 1.5 – Imagem da proteína ATP7A.

Fonte: Banco de imagens PDB - “protein data bank”

Alguns desses domínios já foram determinados experimentalmente através de ressonância magnética nuclear e cristalografia de raios X (Banci, Bertini, Ciofi-Baffoni et al., 2005). De acordo com o trabalho de Goodyer e colaboradores, todos estes seis domínios de ligação são efetivamente capazes de se ligarem ao Cobre (Goodyer, Jones et al., 1999) por apresentarem ambiente de ligação CXXC, ou seja, cisteína, dois aminoácidos e outra cisteína. O quinto domínio foi o escolhido para ser analisado neste

trabalho pois apresenta os dois aminoácidos cisteína (Cys₁₄ e Cys₁₇) em uma conformação passível de coordenação bidentada, onde o metal poderia se ligar por duas ligações coordenadas, uma em cada enxofre (Lutsenko, Barnes et al., 2007), formando um quelato, que seria termodinamicamente mais estável e por esta razão difícil de ser rompido. Na Figura 1.6 representa-se a coordenação do Cu(II) com o 5º domínio metálico. A sequência de aminoácidos envolvida diretamente na coordenação é Cys₁₄-Ala₁₅-Ser₁₆-Cys₁₇.

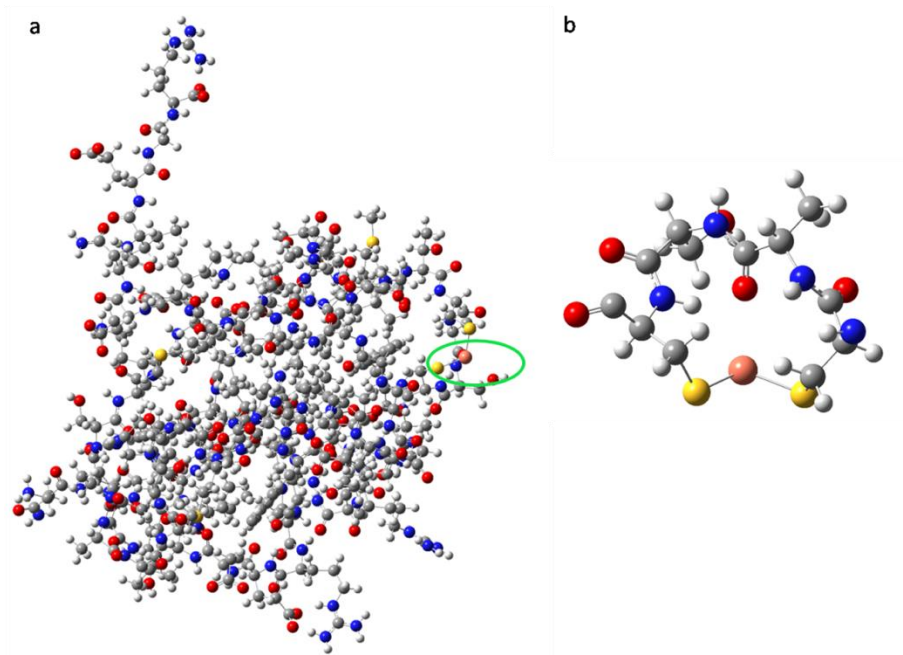


Figura 1.6 – Estrutura do 5º domínio de coordenação metálica da proteína ATP7A:

(a) Estrutura completa com a sequência de 77 resíduos de aminoácidos e (b) Sítio de coordenação envolvendo diretamente a sequência: Cys-Ala-Ser-Cys na ligação do átomo de cobre com os átomos de enxofre presentes em ambas cisteína.

Fonte: Obtida no “protein data bank”- PDB pelo código: 1Y3J

Alguns trabalhos (Komatsu, Sumizawa et al., 2000; Safaei, 2006; Jung e Lippard, 2007; Kuo, Chen et al., 2007) reconhecem que a proteína ATP7A possa atuar no mecanismo de resistência às drogas contendo platina, por provocar o efluxo celular diminuindo sua concentração no interior da célula e consequentemente reduzindo o números de adutos Pt-DNA (Samimi, Safaei et al., 2004). Um estudo feito utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) (Piraud, Vianey-Saban et al., 2003) investigou a ligação entre a cisplatina e o primeiro domínio de ligação à metais da proteína ATP7A

e os resultados indicaram que a platina exibe uma preferência semelhante ao cobre na escolha do sítio de coordenação da proteína ATP7A, que é o ambiente CXXC (C= cisteína, x= aminoácido), presente em todos os domínios de ligação à metais que a proteína possui (Lutsenko, Barnes et al., 2007). A platina se coordena por meio dos enxofres presentes nas cisteínas, conservando os grupos amino, sendo formados primeiramente adutos monofuncionais que em seguida evoluem para adutos bifuncionais (Galliani, Losacco et al., 2014). Outro estudo envolvendo a ligação da cisplatina com o primeiro domínio de ligação da proteína ATP7A foi realizado combinando métodos experimentais, como espectroscopia CD, RMN e ESI-MS, com cálculos computacionais utilizando a metodologia híbrida QM/MM onde houve combinação da dinâmica molecular com métodos DFT. Alguns modelos foram propostos e submetidos a simulações computacionais e mais uma vez foi indicado que a platina se liga aos enxofres das cisteínas, conservando os ligantes amino na posição cis (Calandrini, Arnesano et al., 2014).

De acordo com o exposto, o objetivo geral desse projeto é estudar as interações da cisplatina com a proteína ATP7A, por meio do quinto domínio de ligação à metais desta proteína. Através de cálculos computacionais de termodinâmica e cinética da reação de substituição dos ligantes cloreto da cisplatina pelo sítio ativo deste domínio, especificamente àquele que se coordena ao cobre (observar Figura 1.6) e que mantém o ambiente CXXC, a finalidade foi obter indicações se existiria possibilidade de que esta proteína estivesse envolvida no mecanismo de resistência à cisplatina. No universo da Química Computacional existem diferentes maneiras de se estudar um determinado problema químico e a escolha da melhor metodologia depende de vários fatores, como o tamanho do sistema e a necessidade ou não de se tratar a parte eletrônica. As duas aproximações mais usadas para o estudo de modelagem molecular são a mecânica quântica (MQ) e a mecânica molecular (MM), sendo que a primeira é necessária sempre que houver interesse no estudo da parte eletrônica, por exemplo, um problema envolvendo uma reação química. No entanto, uma limitação ao uso da mecânica quântica é o tamanho do sistema. Para sistemas macromoleculares, onde não há interesse na parte eletrônica, o ideal é se trabalhar com a mecânica molecular (MM), pois ela possui baixo custo computacional e alta velocidade. Como este estudo engloba uma reação química envolvendo uma macromolécula, foi feito o uso da metodologia híbrida QM/MM, onde se trabalha com a mecânica quântica e com a mecânica molecular, de tal maneira que todo o sistema seja contemplado.

CAPÍTULO 2

2.0 METODOLOGIA

2.1 Metodologia teórica

Devido ao grande avanço computacional obtido nas últimas décadas, a química teórica se tornou um pouco mais popular. Fatores como o crescimento da comunidade científica, variedades de pacotes computacionais e melhoria no desempenho dos métodos teóricos possibilitaram a previsão de diversas propriedades químicas dos mais diferentes compostos e também a análise e interpretação de dados experimentais (Morgon, 2001).

A implementação computacional de métodos teóricos permite o tratamento de sistemas moleculares grandes e complexos, fazendo com que os mesmos sejam descritos com precisão através de métodos computacionais que podem descrever, por exemplo, apenas a parte mais importante quimicamente. O desenvolvimento de programas capazes de calcular a estrutura com um compromisso adequado entre velocidade e qualidade, permitem obter resultados semelhantes aos obtidos no estudo de um sistema onde todas as interações são consideradas. (Barreiro, Rodrigues et al., 1997)

Os métodos computacionais se dividem basicamente em dois grupos: clássicos, normalmente baseados na mecânica clássica, e quânticos, fundamentados na mecânica quântica. Esses métodos são utilizados de acordo com a complexidade do sistema a ser tratado e do tipo de problema que se pretende estudar. Alguns fatores que devem ser levados em consideração na escolha do melhor método computacional são: (i) o tamanho do sistema, (ii) a importância do solvente, (iii) a precisão desejada e (iv) estudo de ligações químicas que serão quebradas ou formadas.

Na mecânica molecular, as moléculas são descritas como um conjunto de átomos conectados, incorporando de modo indireto as informações eletrônicas dos sistemas químicos. A energia potencial do sistema é calculada através do uso dos chamados campos de força, que consistem em um conjunto de parâmetros descritores de características estruturais e contribuições energéticas dos átomos ligados e não ligados. Os conjuntos de parâmetros são geralmente determinados de forma empírica, utilizando dados experimentais disponíveis para os sistemas de interesse ou podem também ser obtidos através de cálculos quânticos em pequenas moléculas.

A mecânica quântica leva em consideração os núcleos e os elétrons, por meio de equações mais elaboradas do que as que descrevem a mecânica clássica, descrevendo, também, características estruturais e contribuições energéticas entre tais entidades atômicas. Sempre que se deseja uma descrição detalhada da estrutura eletrônica e de ligações químicas é necessária a utilização de métodos quânticos (Leal, Moita Neto et al., 2011).

A química teórica pode ser entendida como uma descrição matemática formalmente definida e pode ser considerada como a base de modelos, que aplicados ao estudo de fenômenos químicos, obtêm resultados quantitativos ou semi quantitativos. Já a química computacional abrange os métodos matemáticos bem desenvolvidos, que são automatizados para a implementação numérica em um computador (G. H. Grant, 1995).

No contexto da química teórica, a descrição de fenômenos físicos e químicos pode ser feita qualitativamente por meio de diversas aproximações e, em muitos casos, bons resultados quantitativos podem ser obtidos. Estas aproximações podem ser decorrentes da dificuldade matemática em resolver equações algebricamente, ou para simular o ambiente químico que se deseja estudar. Tais aproximações, no entanto, não podem comprometer o resultado de um cálculo teórico. Assim, apesar da mecânica quântica fornecer uma descrição correta do comportamento eletrônico de um sistema, a resolução das equações matemáticas é extremamente dependente de técnicas e aproximações matemáticas (Carvalho, Pupo et al., 2003).

2.1.1 Introdução à química quântica

A base da maioria dos métodos de química quântica é a equação de Schrödinger independente do tempo.

$$\hat{H}(\Psi) = E(\Psi) \quad (2.1)$$

Obter soluções dessa equação para a determinação de propriedades de sistemas moleculares é o objetivo principal da química quântica. Se essas soluções são encontradas sem referências experimentais, os métodos computacionais são definidos como *ab initio* (“do início”). Em contrapartida, os modelos semi-empíricos utilizam parâmetros ajustados para reproduzir propriedades do sistema determinados experimentalmente (Levine, 1991).

A função de onda, Ψ , Equação 1, depende das coordenadas espaciais das partículas que constituem o sistema, ou seja, coordenadas eletrônicas (r) e coordenadas nucleares (R). Uma vez obtida a solução dessa equação, pode-se estudar teoricamente diversas propriedades de um sistema molecular. Nas Equações 2.1 e 2.2, o operador \hat{H} é denominado Hamiltoniano Molecular e é aplicado à função de onda do sistema, obtendo-se assim a energia E , relacionada àquele sistema.

$$\hat{H}\Psi(r, R) = E\Psi(r, R) \quad (2.2)$$

O Hamiltoniano descreve todos os termos de interação existentes entre as partículas. Ele pode ser descrito para uma molécula poliatômica composta por N elétrons e M núcleos como:

$$\hat{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.3)$$

Na equação 2.3, os somatórios são realizados sobre todos os N elétrons e os M núcleos do sistema. $R_{A,B}$ determina a distância entre os núcleos A e B , $r_{i,A}$ é a distância entre o núcleo A e o elétron i , $r_{i,j}$ é a distância entre os elétrons i e j , Z_A é o número atômico do átomo A , M_A é a massa do núcleo A .

Pode-se reescrever a Equação 2.3 como:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_n + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_n + \hat{V}_e \quad (2.4)$$

Onde:

\hat{T}_e é o operador da energia cinética eletrônica

\hat{T}_n é o operador da energia cinética nuclear

\hat{V}_{ne} é o operador referente a atração núcleo-elétron

\hat{V}_n é o operador de energia repulsiva núcleo-núcleo

\hat{V}_e é o operador da energia repulsiva elétron- elétron

Entretanto, esse Hamiltoniano despreza as correções relativísticas para a massa e não diferencia os elétrons em relação aos seus spins. Através dessa descrição é possível

apenas resolver analiticamente a equação de Schrödinger para o átomo de hidrogênio ou para sistemas de apenas um elétron. (Morgon, 2001)

Vários modelos e aproximações foram desenvolvidos para tornar possível a resolução da equação de Schrödinger para sistemas polieletrônicos. A primeira aproximação realizada com esse intuito foi a aproximação de Born-Oppenheimer (Koppel, 1984). Essa aproximação consiste basicamente na separação da equação de Schrödinger em duas partes: eletrônica e nuclear. Tendo em vista que os núcleos são mais pesados que os elétrons, seus movimentos são muito mais lentos que o movimento eletrônico, podendo considerar os mesmo fixos em relação aos elétrons. Assim a equação de Schrödinger é resolvida apenas para os elétrons, na presença do potencial produzido por núcleos congelados. Com essa aproximação, o segundo termo da Equação 2.4, a energia cinética do núcleo, pode ser desprezada e o quarto termo, a repulsão entre os núcleos, pode ser considerada constante. Usando essa aproximação, tem-se que:

$$\hat{H}_T = \hat{T}_e + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_e \quad (2.5)$$

Ou seja, o Hamiltoniano total \hat{H}_T é

$$\hat{H}_T = \hat{H}_{ele} + \hat{V}_{ne} \quad (2.6)$$

Onde \hat{H}_{ele} é denominado hamiltoniano eletrônico.

Porém, mesmo com as simplificações feitas por essa aproximação, não é possível calcular, analiticamente, o efeito do operador hamiltoniano em um sistema polieletrônico.

2.1.2 O método de Hartree-Fock

O método de Hartree-Fock (HF) (Morgon, 2007) é o método ab initio mais simples e é aproximado para a determinação de funções de onda e energia no estado fundamental de sistemas quânticos de muitos corpos (Valatin, 1961). Hartree definiu o potencial de repulsão intereletrônica sentido por um elétron que se move em um campo médio produzido pelos outros (N-1) elétrons, ao invés de todos os elétrons produzirem uma interação instantânea uns com os outros. Ou seja, Hartree aproximou o termo de

interação intereletrônica para um termo de campo médio e com isso ele pôde separar as funções de onda de cada elétron para um sistema de N elétrons.

A função de onda eletrônica (Ψ_e) pode ser definida por um conjunto de funções de onda espacial (φ_i) e de spin (alfa para momento angular de spin igual a +1/2 ou beta para momento angular de spin igual a -1/2). As funções de onda espacial e de spin originam funções denominadas spin-orbital do tipo $\varphi_i\alpha$ ou $\varphi_i\beta$.

A função deve obedecer alguns critérios matemáticos como o princípio de exclusão de Pauli, que determina que em um átomo multieletrônico não há mais de um elétron ocupando o mesmo estado quântico e com o mesmo spin. Para garantir a validade desse princípio, um sistema constituído de vários elétrons deve ser descrito por uma função de onda antissimétrica que tem sinal alterado quando ocorre troca de coordenadas entre quaisquer dois elétrons, como representado na Equação 2.7:

$$\Psi = (1,2, \dots, i, j, \dots, n) = -\Psi(1,2, \dots, j, i, \dots, n) \quad (2.7)$$

Para garantir a indistinguibilidade dos elétrons e a antissimetria da função de onda, Hartree sugeriu que a função de onda fosse definida por uma combinação linear de determinantes de Slater que garantiriam essas duas propriedades. O determinante de Slater é a mais simples função de onda antissimétrica usada para descrever o estado fundamental de sistemas com N elétrons. Nesses determinantes, a troca das coordenadas de dois elétrons acarreta na troca de duas linhas matriciais o que resulta na troca automática de sinal da função de onda eletrônica, garantindo a assimetria.

Para dois elétrons, o determinante é definido pela Equação 2.8:

$$\Psi_0 = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{vmatrix} \Psi_\alpha^{(1)} & \Psi_\beta^{(1)} \\ \Psi_\alpha^{(2)} & \Psi_\beta^{(2)} \end{vmatrix} \quad (2.8)$$

Obtida a função de onda através dos determinantes de Slater, a seguinte expressão para a energia eletrônica do estado fundamental pode ser definida, pelo princípio variacional, por:

$$16 \quad E_0 = \int \Psi_0^* \hat{H}_e \Psi_0 d\tau \therefore E_0 = \langle \Psi_0 | \hat{H}_e | \Psi_0 \rangle \quad (2.9)$$

O princípio variacional é baseado em um teorema que, dado um sistema com operador Hamiltoniano \hat{H} , então se Ψ é uma função qualquer, que seja normalizada e

que satisfaça as condições de contorno do problema, pode-se mostrar que essa função admite que o valor esperado do operador Hamiltoniano para uma função de onda aproximada é sempre maior ou igual a energia exata, E_0 , correspondente a esse hamiltoniano. Ou seja, a flexibilidade variacional nesse caso determina a escolha do melhor conjunto de spins-orbitais para descrever a função de onda através da minimização da energia. Assim a energia eletrônica pode ser descrita como dependente desses orbitais e esses originam para cada elétron, uma solução da seguinte equação:

$$f(1)\phi_{a(1)} = \varepsilon_a \phi_{a(1)} \quad (2.10)$$

Essa expressão é a Equação de Fock, na qual ε_a é a energia do orbital ϕ_a e $f(1)$ é um operador de um elétron, definido como operador de Fock e descrito por:

$$f(1) = -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{1,A}} + V^{\text{HF}} \quad (2.11)$$

O potencial V^{HF} representa o potencial médio experimentado por um elétron devido a presença dos demais elétrons. O potencial percebido pelo enésimo elétron é resultante da distribuição média das cargas de todos os outros elétrons, combinada a carga nuclear e o termo de repulsão elétron-elétron não envolve mais um somatório sobre todos os outros elétrons individualmente, mas sim um único termo, V^{HF} , que pode ser chamado de potencial de campo médio.

A utilização do método de Hartree-Fock implica no uso do chamado método do campo autoconsistente (SCF), que é capaz de obter soluções para as funções de onda do sistema a partir de uma função tentativa. Essa função tentativa é obtida a partir de uma estimativa inicial da função de onda, a qual é aperfeiçoada até convergir. Como um campo atuando sobre um determinado elétron depende da distribuição de carga média dos outros elétrons, postula-se uma determinada distribuição eletrônica que permita calcular o potencial aproximado. A partir daí, um Hamiltoniano aproximado é construído e suas soluções são achadas. A nova função de onda é supostamente melhor que a primeira e o campo construído a partir dela dá origem a um novo hamiltoniano que por sua vez, fornecerá um novo campo, através das suas soluções. Esse processo se repete até que o campo seja autoconsistente, ou seja, até que o potencial calculado em dois passos consecutivos seja constante.

A suposição de que a função de onda que descreve o sistema molecular pode ser representada por um único determinante de Slater é uma das limitações do método HF, porque na verdade, uma função de onda antissimétrica geral pode ser escrita em termos de um conjunto completo de determinantes.

Em resumo, no método de Hartree-Fock, cada elétron é representado por uma função de onda dependente apenas das coordenadas daquele elétron. A probabilidade de se encontrar um elétron em um dado ponto nas vizinhanças de um núcleo é determinada apenas pela posição em relação ao núcleo e não em relação aos outros elétrons. Certo elétron interage apenas com o campo médio dos outros elétrons. Então, esse método faz cinco simplificações para tratar sistemas multieletrônicos:

- 1) Considera a aproximação de Born-Oppenheimer;
- 2) Despreza efeitos relativísticos;
- 3) Usa uma combinação linear de um número finito de funções ortonormais, que se supõe formar uma base completa;
- 4) Cada autofunção do operador Hamiltoniano retorna a energia e é descrito por um determinante de Slater; e
- 5) A aproximação SCF está implícita e somente parte da correlação eletrônica é considerada.

Com o aumento do conjunto de funções-base, a energia e a função de onda tendem a um limite conhecido como limite de Hartree-Fock. Muitos métodos de cálculo, conhecidos como métodos pós-Hartree-Fock, iniciam com um cálculo Hartree-Fock e, posteriormente corrigem a energia por meio de termos que incluem as contribuições das repulsões intereletrônicas

2.1.3. Teoria do funcional de densidade

Essa teoria surgiu de forma paralela aos métodos baseados na função de onda e sua grande vantagem está no ganho em velocidade computacional e espaço em memória. Enquanto que para métodos Hartree-Fock e pós-Hartree-Fock, o esforço e, conseqüentemente, o custo computacional de um sistema com n funções de base aumenta por um termo de n^4 ou n^5 , na DFT aumenta por um fator de n^3 , o que possibilita o estudo de sistemas de tamanho moderado a grande (Coutinho, 2007), com uma precisão considerável que possibilita a complementação de informações já

obtidas experimentalmente ou até mesmo a obtenção de informações que não foram ainda obtidas através de experimentos (Orio, Pantazis et al., 2009).

A variável básica na DFT é a densidade eletrônica, que descreve a distribuição dos elétrons em uma molécula. Enquanto que o número de funções de onda é proporcional ao número de elétrons envolvidos, a densidade eletrônica não é, sendo dependente apenas das três coordenadas, x, y, z e apresenta a grande vantagem de incluir efeitos de correlação eletrônica, o que não é computacionalmente vantajoso se fazer em métodos baseados em funções de onda. A descrição de um sistema de muitos elétrons pode ser determinada usando-se funcionais. O nome “funcional” vem do fato que a energia depende de uma função, ou seja, $E[\rho, (r)]$ sendo essa dependente da densidade eletrônica. Não se pode esquecer que nos métodos baseados em função de onda, a energia também é um funcional, porque depende da função de onda, $E[\Psi(r)]$. O que nos garante que a densidade eletrônica pode exercer um papel de variável fundamental são dois teoremas propostos por Hohenberg e Kohn (Kryachko, 1980). Eles formam a base teórica do DFT e são enunciados a seguir:

- Teorema 1: O potencial externo $v_{\text{ext}}(r)$ sentido pelos elétrons é um funcional único da densidade eletrônica do estado fundamental $\rho_0(r)$.
- Teorema 2: A energia do estado fundamental $E_0[\rho]$ é mínima para a densidade $\rho_0(r)$ exata.

Assim, o primeiro teorema garante que podemos escrever a energia como um funcional único da densidade eletrônica do estado fundamental. $E = E[\rho_0]$

E o segundo garante que a energia do estado fundamental tem a propriedade do princípio variacional, ou seja, $E[\rho_0] < E[\rho]$.

Então, de acordo com os teoremas de Hohenberg e Kohn, pode-se dizer que a densidade eletrônica determina um potencial eletrônico externo, que é produzido pelos núcleos atômicos e pelo número de elétrons do sistema. Com a determinação do potencial externo e do número de elétrons pode-se encontrar também o Hamiltoniano molecular do sistema. Além disto, sendo a energia total do sistema sempre maior ou igual a energia exata do mesmo, a densidade eletrônica que descreve esse sistema é aquela que minimiza a energia eletrônica no estado fundamental.

Podemos escrever a energia como um funcional da densidade eletrônica: 19

$$E[\rho] = T[\rho] + V[\rho] + V_{\text{ext}}[\rho] \quad (2.12)$$

Onde $T[\rho]$ é a energia cinética do sistema, $V[\rho]$ representa a interação entre elétrons e $V_{\text{ext}}[\rho]$ é a energia devido ao potencial externo gerado pelos núcleos. O método DFT está entre os mais populares e versáteis métodos disponíveis para estudos de química computacional. Em resumo, pode-se dizer que os métodos DFT são atraentes porque incluem, de forma aproximada, os efeitos de correlação eletrônica, através do uso de funcionais (PBE0, B3LYP, etc). Neste trabalho foi usado o funcional PBE0, que é um funcional GGA (Generalized Gradient Approximation). A aproximação GGA introduz no funcional de troca e correlação além da dependência funcional da densidade eletrônica (LDA), uma dependência explícita com o gradiente da densidade (GGA). Os cálculos Hartree-Fock não consideram o efeito de troca e correlação pois consideram a interação de um elétron com um campo médio gerado pelos outros elétrons, enquanto os métodos que incluem correlação eletrônica levam em conta as interações instantâneas de pares de elétrons com spin oposto. Os métodos DFT fornecem também os benefícios dos métodos ab initio (que são computacionalmente mais caros) a um custo de tempo essencialmente igual ao método Hartree Fock (Vessecchi, Galembeck et al., 2008).

2.1.4 Métodos híbridos

O tratamento teórico de sistemas moleculares com grande número de elétrons tem feito um grande progresso nas últimas décadas, porém modelar sistemas químicos dessa dimensão com a precisão de métodos ab initio é ainda uma tarefa desafiadora. A evolução das técnicas computacionais e um maior poder de armazenamento estão permitindo, cada vez mais, o estudo de sistemas maiores e mais complexos, porém uma ponderação entre custo computacional e precisão de resultados é sempre necessária.

Os chamados métodos híbridos foram introduzidos, em 1976, por Arieh Warshel e Michael Levitt, para elucidar o problema de interesse que envolvia uma reação química em um sistema macromolecular. Em geral, os métodos híbridos permitem a combinação de diferentes técnicas computacionais em um cálculo, o que torna possível a investigação de grandes sistemas químicos com elevada precisão. A classe mais comum dos métodos híbridos é formada pelos métodos QM/MM, que é a combinação da mecânica quântica (QM) com a mecânica molecular (MM), de modo que a precisão da técnica QM e a velocidade da técnica MM se complementem (Field, Bash et al. 1990).

Os métodos híbridos podem ser convencionais, para os quais os diferentes métodos se dão ao mesmo tempo ou sequenciais, onde primeiramente, se dá o tratamento puramente clássico a todo o sistema e depois o tratamento quântico na região de interesse (Coutinho, 2007). Essa metodologia híbrida é comumente utilizada quando o sistema em estudo é muito grande e se deseja estudar mais profundamente um sítio ativo ou ainda pode ser usada para modelar uma molécula envolvida por outras moléculas de solvente.

A característica chave da metodologia híbrida é que se utilize o cálculo quântico de maneira truncada, ou seja, limitando-o apenas à região do modelo que está sendo estudada em melhor nível de cálculo. Logo o cálculo MM se resume ao restante do sistema e os efeitos da vizinhança são incorporados para formar a superfície de energia potencial como um todo, onde as regiões QM/MM interagem uma com a outra via potenciais eletrostáticos e espaciais. Existe uma grande variedade de métodos híbridos relatados na literatura. Embora os conceitos dos mesmos sejam semelhantes, eles diferem em uma série de pormenores. A diferença básica entre os métodos híbridos consiste na forma de tratamento dado às regiões limite da molécula.

Embora o conceito de subdivisão em camadas seja relativamente simples, há duas questões que devem ser consideradas: (i) como o sistema deve ser particionado e (ii) qual nível de teoria deve ser usado em cada partição (Zhang, Lee et al., 1999).

A energia calculada a partir dos métodos híbridos QM/MM podem ser generalizada pela fórmula:

$$E = E_{MM} + E_{MQ} + E_{MQ/MM} \quad (2.13)$$

Os dois primeiros termos são simples de conceituar e entender, já que consistem na energia de cada camada, cada qual calculada utilizando um método diferente. Entretanto o terceiro termo depende de como a implementação QM/MM foi feita, visto que ele representa a energia de interação entre a região clássica e a região quântica, dependentes entre si, porém tratadas com métodos potencialmente muito diferentes. Se essa interação é tratada classicamente, ou seja, cargas parciais são atribuídas aos átomos da região quântica de modo a interagir com as cargas parciais da região clássica, temos o acoplamento mecânico. Se, por outro lado, essa interação é levada em conta introduzindo o potencial gerado pelas cargas parciais da região clássica do hamiltoniano quântico tem-se o chamado acoplamento eletrostático, que inclui a polarização eletrônica automaticamente e dispensa o uso de parâmetros MM para a interação

eletrostática entre as partes QM e MM, porém encarece ligeiramente o custo computacional (Vreven, Byun et al., 2006).

Algumas metodologias foram desenvolvidas com os métodos híbridos QM/MM. Entre elas está o IMOMM (integrated molecular orbital + molecular mechanics), que, por reduzir o tempo computacional, foi reconhecido como um método prático. Com esse método, a parte “ativa” do sistema é tratada com métodos quânticos, ou seja, tratando os orbitais moleculares e a parte “não ativa” é tratada com mecânica molecular. Um outro método é o IMOMO (integrated molecular orbital + molecular orbital), que consiste em um pequeno sistema modelo, contido em um grande sistema real, em que se aplicam respectivamente, altos níveis de cálculo (em geral ab initio) e níveis de cálculos mais baixos. Os bons resultados obtidos pelos métodos IMOMM e IMOMO levaram à criação de um terceiro método que basicamente consiste em uma unificação de ambos: método ONIOM (our own n-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics). O ONIOM (Svensson, Humbel et al., 1996) é o esquema mais geral no sentido que permite a divisão de qualquer sistema molecular, onde se pode fazer uma superposição de cálculos, mesclando diferentes níveis de teoria (Heerdt e Morgon, 2011).

O método ONIOM (Chung, Sameera et al., 2015) é aplicável a grandes moléculas, ou grandes sistemas em muitas áreas de pesquisa, incluindo reações enzimáticas, mecanismos de reações para sistemas orgânicos, modelos de cluster de superfícies. A camada alta é geralmente a menor e é denominada sistema modelo. Se ocorrem quebra e formação de ligações ela deve ser tratada com mecânica quântica, ou seja, com métodos mais precisos e um nível mais elevado de cálculo. A camada baixa consiste no restante da molécula e é normalmente tratada com métodos menos custosos computacionalmente, que pode ser um método semi-empírico, mecânica molecular ou um método com menor custo computacional ab initio tal como Hartree-Fock. A molécula toda é definida como sistema real.

22 Um exemplo de fragmentação de um sistema em três camadas, com base no método ONIOM, pode ser ilustrada na figura abaixo:



Figura 2.1 – Esquema de fragmentação de três camadas para o ONIOM

Fonte: (Figura adaptada da referência (Dapprich, et al., 1999))

Quando há divisão de um sistema em três camadas, tem-se duas possibilidades. A primeira é utilizar métodos de mecânica quântica para o sistema modelo e para o sistema intermediário, sendo que para o primeiro, se usa um nível de cálculo mais alto e para o segundo um nível de cálculo mais baixo e o sistema real é tratado pela mecânica molecular. A outra possibilidade é tratar apenas o sistema modelo através da mecânica quântica e usar a mecânica molecular para tratar os modelos intermediário e real, utilizando campos de força diferentes.

Na separação entre a camada alta e a baixa pode não haver presença de ligações covalentes, como por exemplo em um sistema em solução, onde a camada alta é o soluto e a camada baixa é representada pelas moléculas do solvente. No entanto, quando se quer fazer o estudo de uma região específica de uma macromolécula na qual ligações covalentes serão "cortadas" para gerar o sistema modelo, como por exemplo, no estudo de uma reação que ocorre no sítio ativo de uma enzima, existem dificuldades extras como: onde é melhor particionar o sistema, ou seja, quais ligações que se deve ou se pode cortar; e como interagir a parte quântica da molécula com a parte clássica.

Esse processo de corte de ligações implica em completar as valências de alguns átomos para garantir ao sistema o realismo químico antes existente. Os átomos inseridos são chamados link atoms e estão presentes apenas no sistema modelo. O objetivo dessa aproximação é fazer com que interação entre as partes QM e MM se assemelhe ao máximo à interação quântica da molécula inteira.

O ONIOM obtém a energia do sistema simulado através da combinação das energias computadas pelos diferentes métodos teóricos. De modo mais específico, a energia fornecida é referente a todo o sistema em estudo, entretanto, essa energia consiste numa aproximação como se todo o sistema fosse calculado com o método 23 maior precisão escolhido. Portanto, o valor de energia fornecido é resultado de uma extrapolação do cálculo QM para todos os átomos. Correções para o tamanho total do sistema bem como para as diferenças de precisão entre os métodos das diferentes camadas calculadas são aplicados.

Em outras palavras, a energia é calculada como a energia do modelo pequeno com correções para a diferença de tamanho entre as camadas alta e baixa e para a diferença de precisão entre os diferentes tipos de métodos aplicados a cada camada.

Essa ideia básica da aproximação ONIOM pode ser explicada considerando a Figura 2.2, que mostra um esquema de extrapolação para sistemas de duas camadas.

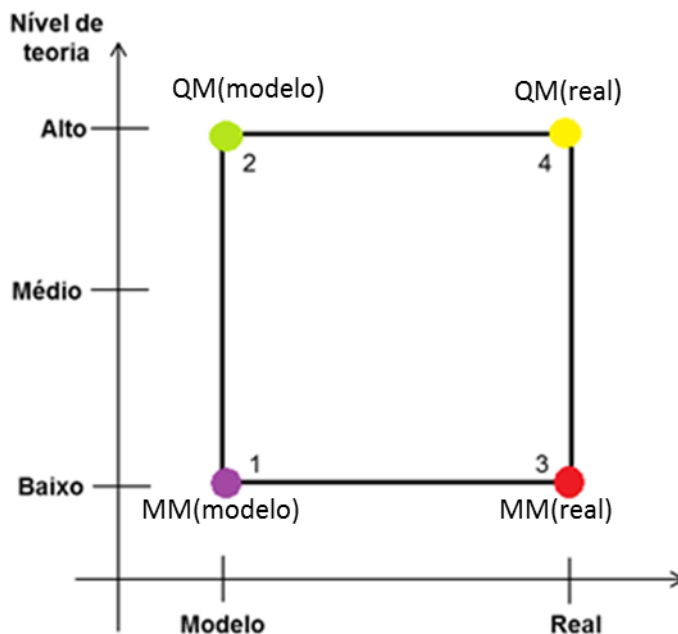


Figura 2.2 – Esquema de extrapolação do ONIOM para sistemas moleculares de duas camadas.

A melhor energia do sistema, E_4 , é uma energia extrapolada usada para descrever o sistema real no nível mais alto de teoria. Pode-se então escrever a energia obtida como:

$$E^4 = E_3 + (E_2 - E_1) \quad (2.14)$$

Em resumo, o método ONIOM é um esquema de extrapolação, uma vez que, ao integrar-se os resultados obtidos sobre os diferentes níveis que são tratados por diferentes métodos, produz-se uma extrapolação atingindo valores de energia mais precisos sobre todo o sistema. Há uma aproximação da energia do sistema real através da combinação das energias computadas através de meios menos dispendiosos. A energia é calculada como a energia do modelo pequeno com correções para a diferença de tamanho entre as camadas alta e baixa e para a diferença de precisão entre os diferentes tipos de métodos aplicados a cada camada.

A diferença entre a energia E_4 e a energia E^{ONIOM} é dada por um erro que pode ser desprezado, uma vez que ele é similar nas estruturas participantes das reações, como por exemplo, reagentes e estado de transição.

O método ONIOM tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para se avaliar energeticamente um sistema macromolecular com razoável precisão. Os valores de

energia e de outros parâmetros calculados pelo ONIOM são dependentes dos níveis de teoria aplicados, da escolha correta de um determinado campo de força, do conjunto de base, entre outros

O método ONIOM, quando comparado com métodos puramente quânticos, possui algumas desvantagens como, por exemplo, o método de subtração de energias, que implica que a região limite deve ser tratada exclusivamente pelo menor nível de teoria, o que exige um ajustamento para o tamanho da região modelo, se os átomos de fronteira não forem tratados com um alto nível de precisão suficiente para responder às perguntas de interesse. Mas, de uma maneira geral, estudos comprovam que os resultados obtidos usando esse método foram bem sucedidas na reprodução de cálculos feitos experimentalmente ou com alguma referência (Svensson, Humbel et al., 1996).

No ano de 2013, Martin Karplus, Michael Levitt e Arieh Warshel ganharam o prêmio Nobel com o tema “Desenvolvimento de modelos multiescalas para sistemas químicos complexos”, onde a maioria dos experimentos realizados foram envolvendo estruturas de proteínas e mecanismos de reações biológicas. (Field, Bash et al.; Garcia-Viloca, Gao et al.)

De uma maneira geral, quando se quer estudar um sistema macromolecular através da química computacional, a escolha da metodologia a escolha da metodologia engloba vários aspectos, porém sempre que houver interesse na parte eletrônica do problema, o uso de métodos híbridos, seja o ONIOM ou qualquer outro que utilize a mecânica quântica como possibilidade, se faz necessário.

2 1.5 Funções de base

Orbitais atômicos são soluções da equação Hartree-Fock para o átomo e o termo orbital atômico pode ser substituído pelo termo função de base. Pode-se então dizer que as funções de base são as funções que descrevem os elétrons nos átomos e os dois tipos mais usados em química computacional são orbitais atômicos do tipo Slater (STO – “Slater Type Orbital”) e funções atômicas do tipo Gaussiana (GTO - “GaussianType Orbitals”), sendo essa segunda mais utilizada em cálculos ab initio, pela facilidade em calcular integrais na equação de Schrödinger eletrônica.

Um conjunto de base mínimo contém apenas o número de funções necessário para acomodar todos os elétrons de um átomo, podendo-se conseguir uma maior flexibilidade na acomodação dos elétrons usando os chamados conjunto de bases de

valência dividida, onde as funções que descrevem os elétrons de valência são divididas em componentes. Essa divisão, na sua maneira mais simples, é formada por uma função Gaussiana mais interna e compacta e outra mais externa e difusa. A nomenclatura dos vários métodos define o modo da subdivisão das funções de base. Por exemplo, no caso da função de base 6-31G, os orbitais de camada interna são representados por 6 Gaussianas e os orbitais de valência são divididos em dois conjuntos, representados por respectivamente, 3 e 1 Gaussianas.

A introdução de funções de número quântico secundário maior (funções do tipo p para átomos de hidrogênio e funções tipo d para os demais átomos) é feita no chamado conjunto de bases de polarização e a adição delas permite a deformação dos orbitais para fora do eixo internuclear, bem como uma descrição mais correta das ligações químicas, particularmente aquelas que envolvem ligações de hidrogênio, melhorando a modelagem (Barreiro, 2015).

2.1.6 Pseudopotencial (ECP – Effective Core Potential)

Ao se trabalhar com sistemas multieletrônicos, principalmente os que contém metais de transição, uma dificuldade encontrada é a dependência entre o número de integrais calculadas e o número de orbitais moleculares envolvidos. Normalmente, átomos de metais de transição apresentam um número muito grande de elétrons e, conseqüentemente, há a exigência do uso de muitas funções de base. Como a maioria desses elétrons pertencem a camadas internas e não estão diretamente envolvidos em quebra ou formação de ligações, uma aproximação bastante utilizada para simplificar o uso de funções de base é substituir esses orbitais internos por pseudopotenciais de caroço e tratar explicitamente apenas os elétrons da camada de valência. Nesse caso são utilizados os potenciais efetivos de caroço, ou effective Core Potential, ECP (Hay e Wadt, 1985), que são utilizados para substituir os operadores de core que atuam nas camadas eletrônicas internas por um potencial efetivo que atua apenas sobre os elétrons internos, incluindo as interações entre os elétrons internos e os de valência de forma implícita. Esse potencial também deve reproduzir os orbitais atômicos de valência gerando um pseudo-orbital de valência que deve ser equivalente ao orbital original dentro da região de valência. Neste trabalho os metais de transição são a platina e o cobre. A platina tem 78 elétrons ($1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} 4p^6 5s^2 4d^{10} 5p^6 4f^{14} 5d^9$

$6s^1$), e os orbitais de valência são representados por $5s^2 5p^6 5d^9 6s^1$ e são tratados de forma explícita. Os outros orbitais de core são tratados pelo pseudopotencial.

Nesse capítulo não se teve intenção de apresentar todos os métodos usados em química computacional e sim mostrar de uma maneira resumida os principais conceitos de química teórica usados nesse trabalho.

CAPÍTULO 3

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Metodologia de execução

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos em cada etapa realizada. Serão mostradas cada estrutura otimizada e sua respectiva análise vibracional, valores de comprimentos de ligação, algumas distâncias entre átomos não ligados e medidas de ângulos importantes na análise estrutural dos sistemas estudados. A metodologia híbrida implementada no ONIOM, permite o estudo de sistemas muito grandes, através da divisão do mesmo em camadas, que são tratadas por diferentes níveis de teoria. A parte onde efetivamente ocorrem as quebras e as formações de novas ligações, foi tratada por meio da mecânica quântica e o restante do sistema pode ser tratado com mecânica molecular, ou com outro método de cálculo de menor custo computacional, de tal maneira que a eficiência da mecânica quântica em tratar sistemas reativos se complemente com a velocidade da mecânica molecular.

A proteína ATP7A possui 40280 átomos o que impossibilita o estudo computacional de todo sistema molecular em um nível de mecânica quântica e em outro método baseado em mecânica molecular em um intervalo de tempo factível à um mestrado. Dentre os vários domínios de ligação à metais que essa proteína possui, (Banci, Bertini, Cantini et al., 2005) o quinto domínio (MNK5) (Banci, Bertini, Ciofi-Baffoni et al., 2005) foi escolhido para a realização dos cálculos dos parâmetros termodinâmicos da reação entre a proteína e a cisplatina. A escolha deste domínio, em detrimento dos outros deveu-se aos seguintes fatores: (i) Indícios de que os domínios de 1 a 4 não atuam no transporte de cobre em todas as frentes, como na interação conjunta com o Atx (receptor de cobre no citoplasma) (Banci, Bertini, Ciofi-Baffoni et al., 2005); e (ii) A presença de dois aminoácidos cisteína, cys₁₄ e cys₁₇, em uma conformação que possibilitaria a coordenação de forma bidentada entre os dois enxofres dos aminoácidos cisteína e o metal, o que caracteriza uma ligação termodinamicamente mais estável. Neste capítulo, as referências à proteína ATP7A, referem-se, na verdade, ao modelo desta proteína, representado pelo quinto domínio da referida estrutura, MNK5.

Neste quinto domínio existem 1194 átomos que foram tratados com metodologia híbrida QM/MM, através do método ONIOM (Vreven, Byun et al., 2006). Desta forma, a estrutura foi dividida em duas camadas, a camada alta, é a camada tratada por meio de mecânica quântica e onde se localiza o sítio ativo da proteína. A sequência de aminoácidos da camada alta do quinto domínio se caracteriza pela presença de: treonina 13, cisteína 14, alanina 15, serina 16, cisteína 17 e valina 18, sendo que esta numeração segue a determinada pela caracterização experimental da estrutura (Banci, Bertini, Ciofi-Baffoni et al., 2005) por meio do arquivo (1Y3J) de coordenadas cartesianas

obtidos pela plataforma Protein Data Base (PDB). Um hidrogênio da treonina e um grupo hidroxila da valina foram deixados na camada baixa e, como parâmetro de delimitação dos níveis esse corte foi feito onde ocorre a formação de uma nova ligação peptídica. A Figura 3.1 representa a sequência de aminoácidos da proteína escolhida como camada alta:

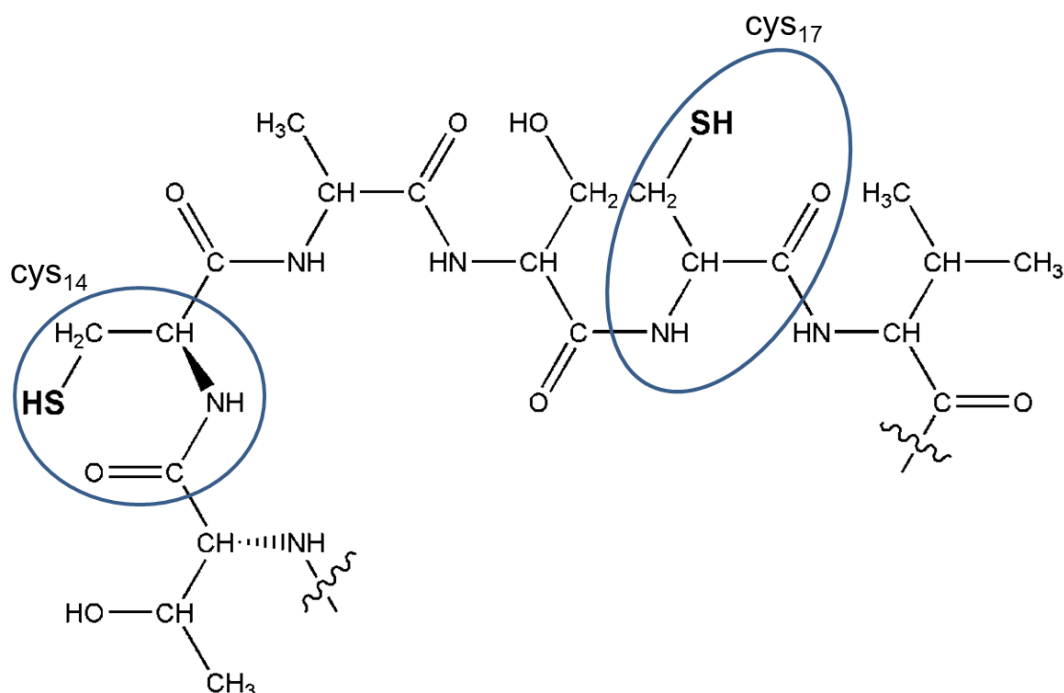


Figura 3.1 – Sequência de aminoácidos da camada alta do quinto domínio da proteína ATP7A. As regiões circuladas apresentam os possíveis sítios de coordenação com o metal

Os 79 átomos da camada alta, para o domínio MNK5 livre de coordenação, foram tratados por meio de cálculos com nível de teoria DFT utilizando o funcional PBE0 (Wu, Shi et al. 2004) e funções de base 6-31g(d,p), com exceção da platina e do cobre, que foram tratados com pseudopotencial, ECP, citado anteriormente. Os átomos deixados na camada baixa foram tratados por mecânica molecular, com o campo de força UFF (Rappe, Casewit et al., 1992). O campo de força UFF foi escolhido pela amplitude de utilização. Apesar de existirem outros campos de força implementados no Gaussian e inclusive mais específicos para proteínas, como o Amber, estes conjuntos de parâmetros não incluem os dados para platina e uma parametrização específica foge do escopo deste trabalho. A escolha do funcional PBE0 foi determinada por testes com

alguns funcionais (B3LYP, PBE e M06-2x) testados anteriormente em um trabalho de iniciação científica do laboratório. (Bazan e Fedoce Lopes, 2014)

Os cálculos teóricos foram realizados utilizando o pacote computacional Gaussian 09, que consiste em um programa de códigos fechado que inclui diversos métodos baseados em mecânica molecular em suas rotinas de cálculos. Para a modelagem, ou desenho das moléculas e visualização dos resultados utilizou-se o software GaussView. Ambos são programas complementares. Ao se plotar a molécula ou o átomo no GaussView, deve-se ajustar a geometria inicial e especificar os cálculos a serem utilizados. As simulações consistiram, inicialmente na otimização de geometria e no cálculo das frequências vibracionais das moléculas. Uma otimização é considerada completa quando ela converge, ou seja, quando o próximo passo é muito pequeno, gera uma estrutura muito parecida com a anterior e produz uma variação de energia abaixo de um valor especificado. Essa estrutura de energia mínima é chamada de estrutura otimizada.

O modo como a energia de um sistema varia, devido às pequenas mudanças em sua estrutura, pode ser evidenciada pela sua superfície de energia potencial (PES-Potential Energy Surface). A otimização de geometria começa com uma estrutura molecular inicial especificada no arquivo de entrada e percorre ao longo da superfície de energia potencial, computando a energia e o gradiente em cada ponto, indicando assim, em qual direção deve ser dado o próximo passo ao longo da superfície na qual a energia diminui mais rapidamente a partir do ponto em que está. A partir das estruturas otimizadas e do cálculo de análise vibracional é possível obter as energias das moléculas e obter funções termodinâmicas, como por exemplo, energia interna, U , entalpia, H , entropia, S , e energia livre de Gibbs, G . Assim, por meio de equações termodinâmicas, pode-se utilizar os resultados dos cálculos para chegar às contribuições termodinâmicas relativas desejadas (Sousa, Silva et al., 2013).

O tempo de cálculo irá depender da quantidade de elétrons, de quais átomos presentes na molécula, do método de cálculo, das funções de base escolhidas, da potência da máquina utilizada, entre outros fatores.

Alguns modelos de equações químicas diferentes foram determinados para descrever a reação problema e para essas equações foram avaliados os parâmetros termodinâmicos. Alguns cálculos foram feitos primeiramente para as reações entre a cisplatina e a proteína ATP7A, simulando a possível reação de substituição dos ligantes

cloretos pelos grupos tiol presentes no modelo, e posteriormente para a reação entre a proteína ATP7A e o cobre, para comparação da metodologia e dos resultados obtidos.

A desprotonação ou não dos grupos tiol, presentes nos aminoácidos cisteína, quando há a coordenação dos mesmos com metais depende do pH do meio onde essa coordenação ocorre (Rohr, Hammerstad et al.; Zimmermann e Burda), por isso os cálculos foram realizados com a presença dos hidrogênios nos enxofres das cisteínas Cys₁₄ e Cys₁₇ e sem a presença dos mesmos.

A reação global entre o quinto domínio de ligação à metais da proteína ATP7A protonada e a cisplatina pode ser representada pela equação 3.1, mostrada abaixo:



A Figura 3.2 mostra a representação simplificada das estruturas químicas previstas para a equação 3.1. Podemos ressaltar que para esta equação química os reagentes são neutros e os dois produtos apresentam-se com carga diferente de zero.

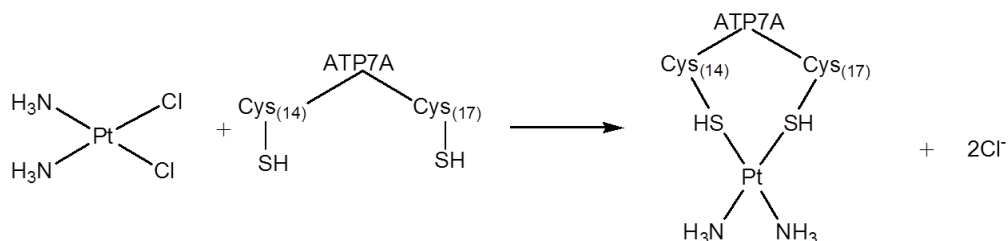


Figura 3.2 – Representação simplificada das estruturas da reação global entre a proteína ATP7A protonada e a cisplatina

A reação global entre o quinto domínio de ligação à metais da proteína ATP7A desprotonada e a cisplatina, pode ser representada pela equação 3.2, mostrada abaixo:

31



A Figura 3.3 mostra a representação das estruturas químicas para a equação 3.2, na qual podemos perceber que temos um reagente e um produto neutros, cisplatina e

$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{---ATP7A}$, espécie com carga sendo o reagente do modelo da proteína com os grupos tióis desprotonados e os cloretos liberados da esfera de coordenação do metal.

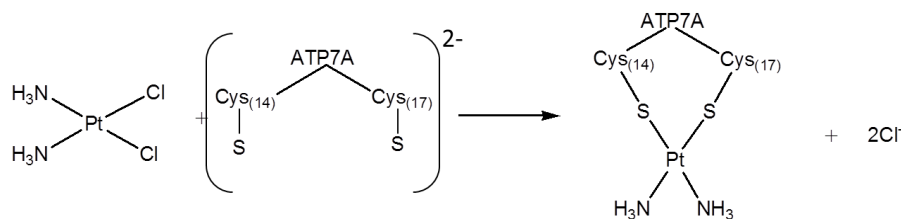


Figura 3.3 – Representação simplificada das estruturas da reação global entre a proteína ATP7A desprotonada e a cisplatina

As reações anteriores representadas pelas equações 3.1 e 3.2 ocorrem em duas etapas cada, onde primeiramente é substituído apenas um dos ligantes cloro e em seguida ocorre a substituição do segundo ligante cloro. De acordo com a simetria do ambiente CXXC da estrutura da proteína, a previsão é que após a substituição dos dois ligantes da segunda etapa a coordenação final será bidentada, sendo essa estrutura já foi prevista por alguns trabalhos experimentais que abordaram estas interações (Calandrini, Arnesano et al., 2014).

A identificação do estado de transição.(Da Silva, Costa et al., 2008; Banerjee e Mukherjee, 2012) de uma reação química é importante porque é o primeiro passo para se determinar dados cinéticos da mesma. Além disso, por meio dos cálculos de coordenada intrínseca de reação ou IRC (Intrinsic Reaction Coordinate) (Maeda, Harabuchi et al.), é possível indicar quais são os reagentes e produtos intermediários que realmente são conectados pelo estado de transição. Esses intermediários são estruturas formadas nas várias etapas da reação, chamadas de estruturas intermediárias ou adultos nas quais se tem os reagentes próximos o suficiente para se definir interações intermoleculares e que normalmente caracterizam estruturas mais estáveis do que os reagentes e produtos isolados

Normalmente, são propostas algumas estruturas de reagentes e produtos intermediários por meio de senso químico para se entender a termodinâmica da reação sem conhecimento prévio das estruturas obtidas através do cálculo do estado de transição e IRC. Neste trabalho, essas estruturas intermediárias de produtos e reagentes 32 m propostas para as reações estudadas e foram também analisados os parâmetros termodinâmicos contemplando estes intermediários. A Figura 3.4 mostra essas estruturas intermediárias citadas para a equação 3.1, presentes em ambas etapas.

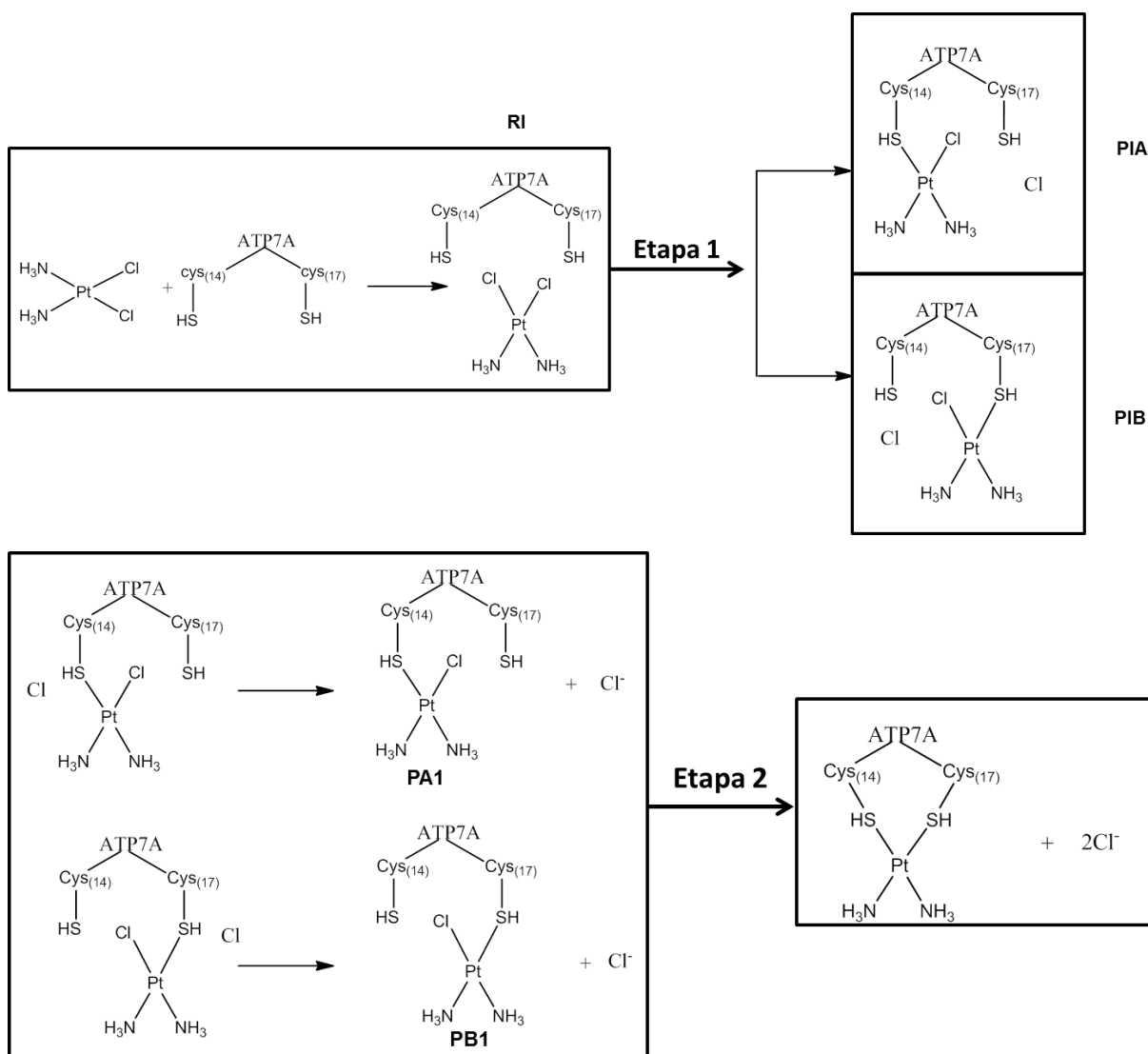


Figura 3.4 – Representação esquemática da equação 3.1 evidenciando as estruturas intermediárias e os produtos isolados.

É possível perceber, por meio da análise da Figura 3.4, que devido a não simetria dos outros aminoácidos envolvidos no ambiente dos aminoácidos cisteína, duas possibilidades de produtos intermediários são vislumbradas, assim como duas possibilidades de produto da primeira etapa da reação de substituição. Esta aproximação permite a análise estrutural e termodinâmica do processo. Estes intermediários foram denominados de RI, PIA e PIB e as estruturas de produtos isolados para essa reação denominados de PA1 e PB1.

Da mesma maneira, para a reação 2, também foram propostas as estruturas intermediárias RI', PIA' e PIB', bem como os produtos isolados PA1' e PB1'. Essas estruturas estão mostradas na figura 3.5.

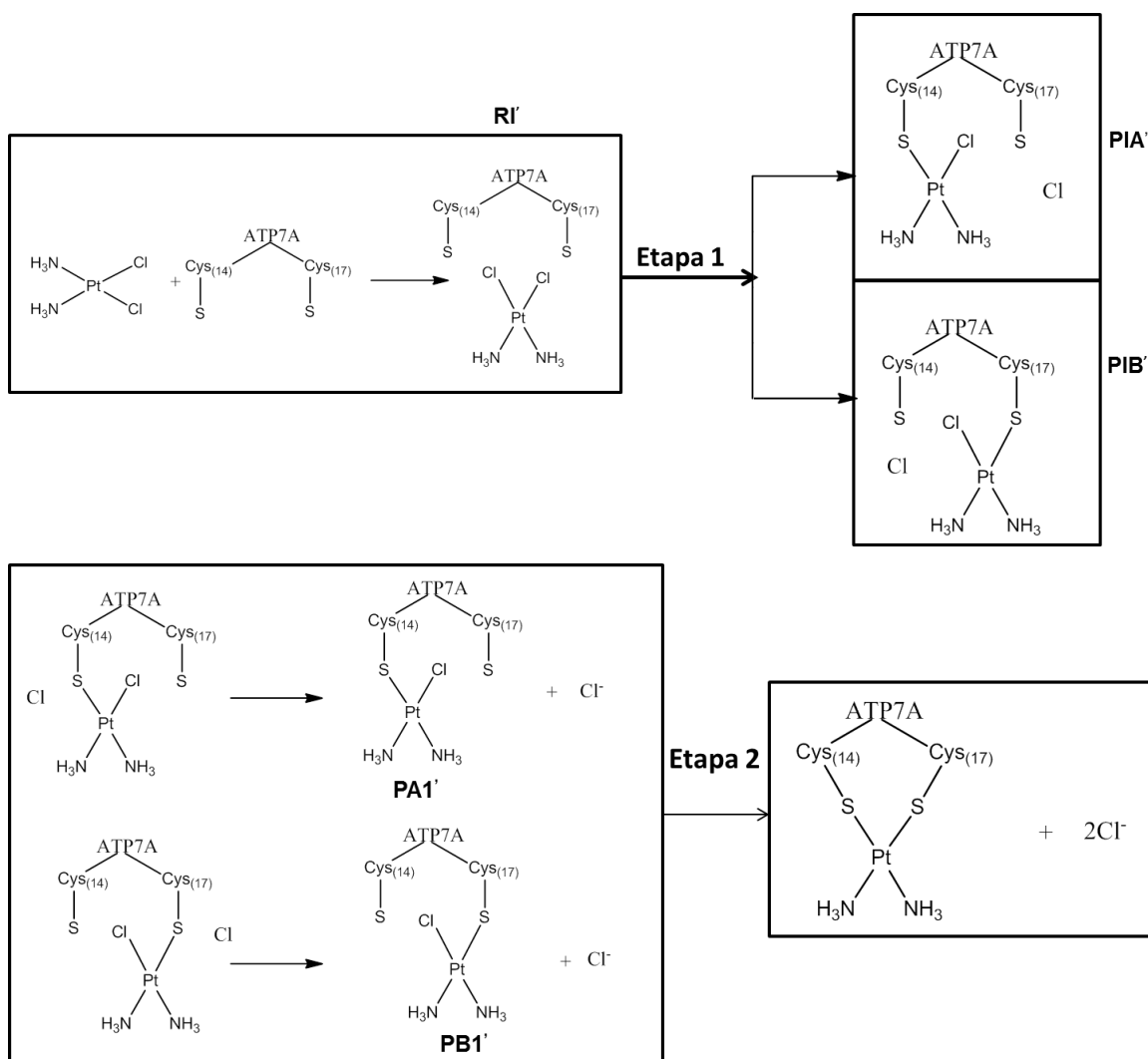


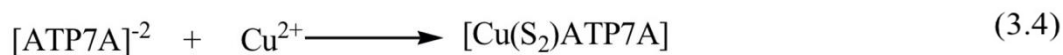
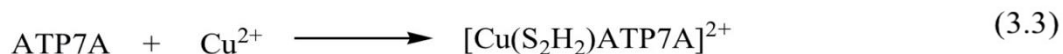
Figura 3.5 – Representação esquemática da equação 3.2 evidenciando as estruturas intermediárias e os produtos isolados.

A questão referente à simetria ao redor dos aminoácidos cisteína se mantém para a análise dos grupos tióis desprotonados como apresentado na Figura 3.5.

A estrutura do quinto domínio da proteína ATP7A coordenado ao cobre, retirada do banco de dados PDB (www.pdb.org), foi tomada como ponto de partida e, através dela, foram medidos alguns comprimentos e ângulos de ligação para posterior comparação com as estruturas otimizadas dos reagentes e produtos. Foram feitos cálculos de otimização e frequência das estruturas da cisplatina, da proteína ATP7A isolada, bem como da mesma coordenada à platina e ao cobre. Foram analisadas, também, as estruturas intermediárias e os produtos isolados propostos, sendo considerados os enxofres dos aminoácidos cisteína 14 e 17, protonados e não protonados.

Biologicamente, tem-se que a função da proteína ATP7A é regular a concentração de íons, principalmente íons de cobre, no corpo humano. Experimentalmente há a caracterização da coordenação da proteína ATP7A com íons cobre I e II do organismo, já que cobre, na sua valência 2+ é abundante no corpo humano. Assim para isso, foram calculados também os parâmetros termodinâmicos para a reação entre o enxofres das cisteínas cys₁₄ e cys₁₇ do quinto domínio da proteína ATP7A e o íon cobre II, com o objetivo de se fazer uma comparação entre os valores encontrados na reação de coordenação desses enxofres com a platina.

Novamente foi feita a análise da reação considerando a proteína os enxofres protonados (equação 3.3) e a proteína com os enxofres desprotonados (equação 3.4).



Uma vez descrita de forma geral a metodologia de execução do trabalho, as próximas seções seguem com a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

3.2 Análise estrutural e eletrônica

Serão mostradas as estruturas otimizadas de todas as espécies mostradas anteriormente e os cálculos de cargas dos átomos diretamente envolvidos nas reações para algumas dessas espécies, para verificar a variação das cargas desses átomos nas diversas estruturas. Os cálculos de carga foram feitos com as estruturas já otimizadas usando o modelo Chelpg, que é um cálculo de cargas atômicas onde o potencial eletrostático molecular é reproduzido em um número de pontos que representam as coordenadas cartesianas dos átomos das moléculas. Para o modelo de cargas Chelpg foi utilizado o raio de van der Waals igual a 1,78 Å para a platina e 1,42 Å para o cobre.

3.2.1 Cisplatina

Ao se obter a estrutura otimizada da cisplatina, alguns comprimentos de ligação foram medidos e comparados com outros valores experimentais e com valores teóricos, obtidos em outros trabalhos da literatura. A tabela 3.1 apresenta alguns resultados obtidos por cálculos teóricos e são apresentados também os parâmetros dos resultados experimentais.

Tabela 3.1 – Dados estruturais para a molécula da cisplatina

Nível de cálculo	Raio /r(Å)		Ângulo/(°)		
	Pt -Cl	Pt- N	Cl-Pt-Cl	N-Pt-N	N-Pt-Cl
MP2/6-311G(d) ^a	2,30	2,09	93,8	96,5	84,9
MP2/6-31G ⁺⁺ (d,p)/LANL2DZ ^b	2,33	2,08	95,2	97,7	83,5
pb1pbe/6-31G(d,p) ^c	2,32	2,08	95,2	98,4	83,1
Experimental(média) ^d	2,33± 0,01	2,01± 0,04	91,9± 0,40	87,0± 0,40	90,3± 0,40

^a[(Pavankumar, Seetharamulu *et al.*, 1999)]. ^b[(Lopes, Menezes *et al.*, 2006)]. ^cResultados obtidos neste trabalho (função de base para todos os átomos, exceto para a platina e o cobre). ^d[(Milburn e Truter, 1966)]

Como se pode observar, os valores medidos são bem próximos dos resultados experimentais e teóricos. É preciso ressaltar, que se para cisplatina é possível realizar cálculos com maior custo computacional e tratamento explícito da correlação eletrônica (MP2), para as estruturas contempladas pelo método híbrido, esse nível de cálculo não seria factível para a camada alta com os recursos computacionais disponíveis.

Como esperado a geometria da cisplatina otimizou-se como quadrática plana, já prevista pela literatura e portanto condizente.

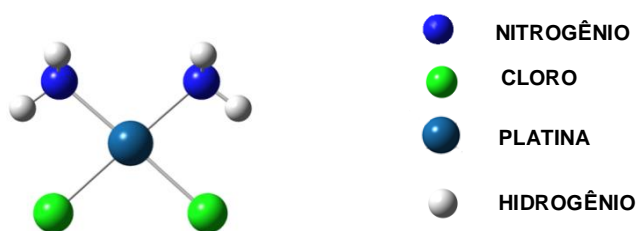


Figura 3.6 – Estrutura otimizada da cisplatina (CDDP)

Inicialmente o cálculo de cargas Chelpg foi feito para as moléculas da cisplatina e da cisteína, ambas otimizadas, como mostrado na figura 3.7, para servir de parâmetro de comparação com as outras estruturas.

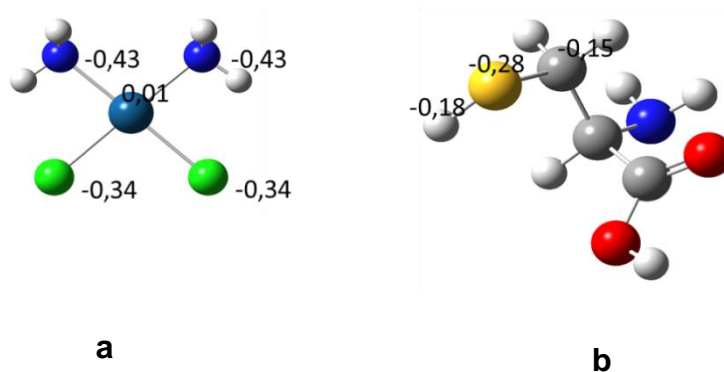


Figura 3.7 – Cargas de alguns átomos da: (a) cisplatina e (b) da cisteína

Como observado na figura 3.7 (a) e devido à simetria de coordenação, as cargas dos dois nitrogênios são iguais o mesmo acontecendo para a carga dos dois cloros e isso deve à simetria da molécula da cisplatina. É possível inferir, que os cloretos serão melhores ligantes abandonadores na substituição devido à menor concentração eletrônica tornando a ligação Pt—Cl mais fácil de ser quebrada. Na figura 3.7(b) observa-se, por meio das cargas atômicas calculadas para a cisteína, que o enxofre apresenta carga negativa, indicando que ele é um forte potencial ligante para a platina, como já sabido para moléculas tioladas. Apesar de não apresentado na figura, o nitrogênio da cisteína apresenta a carga negativa mais pronunciada do aminoácido, -0,92 a.u. No caso do aminoácido livre da cadeia peptídica, este átomo também seria um potencial ligante, o grupo —NH₂, no entanto, serve de conexão para as ligações peptídicas, não estando totalmente disponível para a coordenação ao metal e, de acordo com a estrutura experimental disponível e apresentada a seguir, não se apresenta como ligante coordenado ao Cobre.

3.2.2 Modelo experimental do quinto domínio da proteína ATP7A coordenada ao cobre

A estrutura depositada no PDB que representa o quinto domínio de coordenação à metais (MNK5) da proteína ATP7A coordenada ao cobre, sob o código 1Y3J foi obtida por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear. (Banci, Bertini, Ciofi-Baffoni et al., 2005) Neste trabalho, Banci e colaboradores determinaram que a proteína MNK5 adota uma conformação do tipo ferredoxina mesmo com a coordenação ao metal.

Devido ao tempo de resolução da técnica, muitos intermediários da reação de coordenação não são determinados e ao final da titulação, a estrutura resolvida é a média de algumas configurações espaciais. Estas estruturas apresentaram, após otimização, um desvio médio quadrático sobre os resíduos de aminoácidos de 0,70 Å e sobre os átomos pesados de 1,20 Å. Desta forma, o mesmo código PDB fornece 20 conjuntos de coordenadas cartesianas que representam, em média, a estrutura da proteína.

Para se fazer a escolha de qual conjunto de coordenadas seria utilizado para realizar os cálculos subsequentes envolvendo as reações de substituição, foram realizados, para cada uma delas, cálculos de otimização de geometria e análise vibracional para que, através destes valores de energias calculados para cada uma delas, se pudesse trabalhar com aquela que apresentasse o menor valor ou seja a mais estável. Além disso, que se apresentasse como mínimo local na superfície de energia potencial. A Tabela 3.2 apresenta os valores de energia encontrados para cada uma das vinte estruturas e as distâncias entre os átomos de enxofre dos aminoácidos cisteína 14 e 17 que foram mensuradas visando avaliar a possibilidade de coordenação bidentada com o metal. Estes cálculos foram realizados com o mesmo nível de teoria na metodologia ONIOM descrita previamente. Todas as 20 configurações se apresentaram como mínimos locais de energia, após a análise das frequências obtidas.

Tabela 3.2 – Valores de energia e distância entre enxofres para as 20 estruturas do quinto domínio depositadas no PDB

Estrutura/Modelo ^a	$\Delta G_{\text{relativo}} / \text{kcal mol}^{-1}$	$d(\text{S—S}) / \text{Å}$
2 ^b	0,0	3,59
6	61,0	3,62
9	62,7	3,68
13	64,3	3,78
17	69,8	3,78
3	77,6	3,47
14	82,0	3,66
19	83,8	3,74
10	84,7	3,46
15	85,3	3,26
20	88,2	3,64
8	91,1	3,78
16	93,4	3,63

11	100,5	3,53
12	100,8	3,65
4	101,3	3,68
7	104,4	3,61
18	106,2	3,58
1	119,2	3,71
5	157,2	3,61

(a) Estruturas numeradas de acordo com a ordem do arquivo PDB=1Y3J;

(b) Estrutura mais estável por isso sua variação de energia aparece como sendo igual à 0.

Como se pode observar, a estrutura 2 apresenta a menor energia, sendo escolhida, para que, por meio dela, todos os cálculos fossem realizados. Outro motivo que reforçou a escolha da estrutura 2, foi a distância entre os dois enxofres do sítio ativo do quinto domínio de ligação da proteína ATP7A, apresentando um valor médio razoável para permitir a coordenação bidentada. Desta forma, a partir deste modelo, dividiu-se a estrutura em duas camadas, ou níveis de teoria, como representado na Figura 3.8. A Figura 3.8 apresenta a estrutura de referência, sem otimização, do segundo conjunto de coordenadas do quinto domínio da proteína ATP7A coordenada ao cobre, sendo a camada alta representada pelo modelo “pau-bola” e a camada baixa pelo modelo “varetas”. Observando a figura, evidencia-se que a camada alta contém um número menor de átomos, que efetivamente participarão da reação de estudo e que a camada baixa contempla a maioria dos átomos da estrutura e tem um papel de sustentação da conformação da proteína e de ambiente eletrostático de média distância.

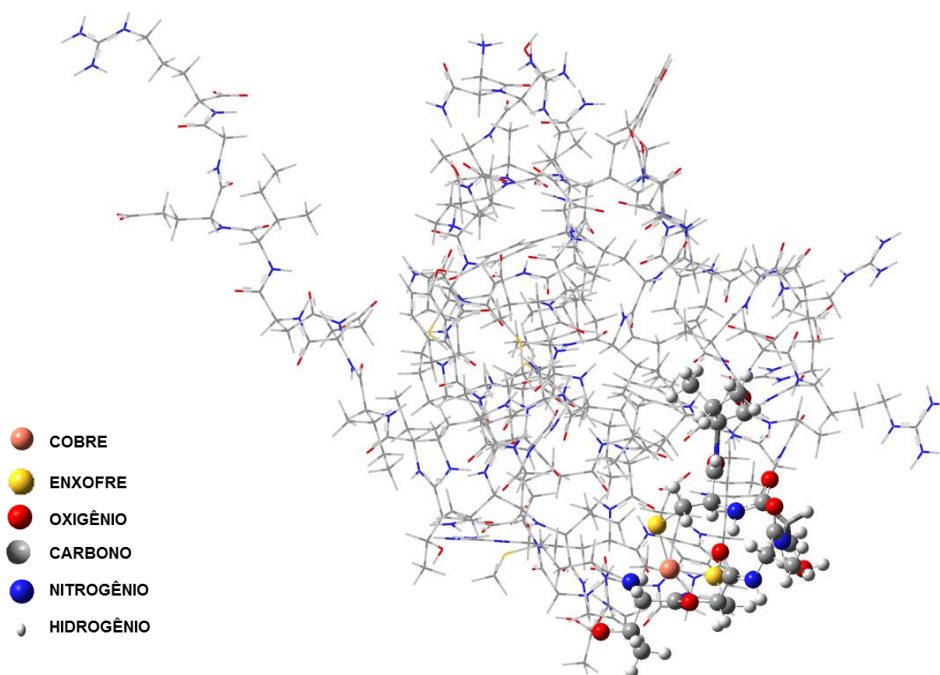


Figura 3.8 – Estrutura do quinto domínio da proteína ATP7A coordenada ao cobre

A partir dessa estrutura, iremos apresentar apenas os átomos da camada alta do quinto domínio da proteína ATP7A. As legendas de cores dos átomos apresentadas nas Figuras 3.6 e 3.8 irão se manter para as demais estruturas. Para fins comparativos com as estruturas otimizadas, para essa estrutura foram medidos: as distâncias entre os dois enxofres do sítio ativo de coordenação ao metal (presentes nas cisteínas 14 e 17), que é igual a 3,59 Å, além dos comprimentos de ligação entre o cobre e o enxofre da cisteína 17 (2,18 Å), o comprimento de ligação entre o cobre e o enxofre da cisteína 14 (2,17 Å) e o ângulo de ligação entre o cobre e os enxofres das cisteínas 14 e 17 (111°).

3.2.3 Estrutura otimizada do quinto domínio da proteína ATP7A livre

A estrutura da proteína livre é o ponto de partida para a reação de coordenação com o íon de cobre livre e para caracterizar a reação de substituição envolvendo a cisplatina. A partir da estrutura base, conjunto 2 do código 1Y3J, foi removido o átomo de cobre e foram feitos cálculos de otimização de geometria, análise vibracional e cargas atômicas Chelpg para a estrutura da proteína ATP7A com os grupos tiol protonados e desprotonados. Nas Figuras 3.9 e 3.10, as linhas tracejadas indicam as ligações intramoleculares que aumentam a estabilidade desse sistema, quando presentes

na região do sítio ativo/camada alta. As cargas dos átomos envolvidos diretamente na coordenação estão representadas para avaliarmos como o ambiente da proteína pode alterar as cargas atômicas dos aminoácidos envolvidos no sítio de ligação e para a comparação posterior com as estruturas ligadas aos metais. Na Figura 3.9 está representada a estrutura com os grupos tióis protonados.

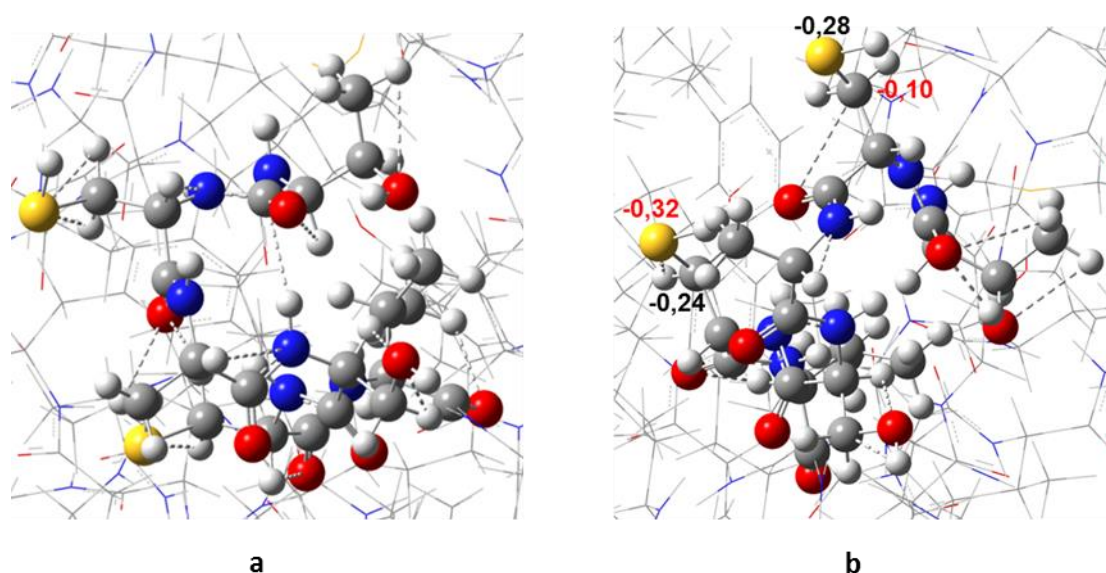


Figura 3.9 – Estrutura otimizada da camada alta do quinto domínio da proteína ATP7A:

(a) Interações intramoleculares e (b) Cargas dos átomos envolvidos

Para essa estrutura foi medida a distância entre os enxofres e o valor encontrado foi de 6,49 Å, valor muito superior ao valor encontrado na estrutura experimental (3,59 Å), quando os enxofres estão coordenados ao cobre. No entanto, este valor é esperado uma vez que sem o sítio metálico de coordenação, as cisteínas terminais livres adquirissem liberdade conformacional, ficando com os grupos SH mais distantes.

Como se pode verificar na Figura 3.6(b), apenas dois átomos dessa estrutura apresentaram valores com maior diferença em relação aos valores das estruturas usadas como parâmetros. Esses átomos estão representados em vermelho. O carbono (C—SH) da cisteína 14 apresentou o valor de $-0,10$ a.u, ficando com densidade de carga eletrônica ligeiramente menor do que o calculado na cisteína livre ($-0,15$ a.u). Mudança mais relevante é observada no enxofre da cisteína 17 que apresentou o valor de $-0,32$ a.u, ficando com maior densidade eletrônica podendo acarretar em um aumento da sua maciez, de acordo com a definição de Pearson e fazer com que a coordenação metal—

cisteína ocorra inicialmente pela cisteína 17. Os valores de carga dos demais átomos não sofreram alteração.

Na Figura 3.10, está apresentada a estrutura desprotonada. Como para esta estrutura, as ligações intramoleculares são em menor número, apenas uma figura se fez necessária para a representação.

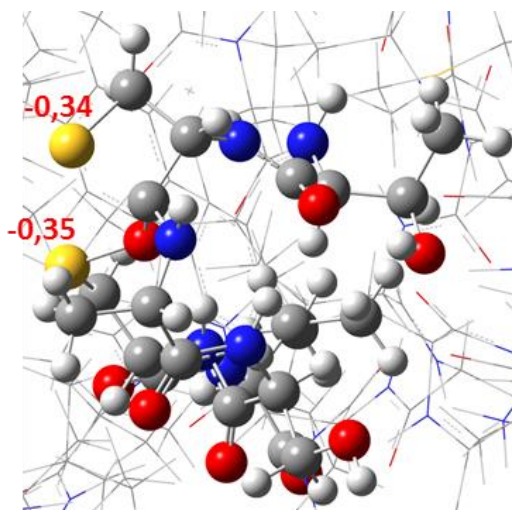


Figura 3.10 – Estrutura otimizada da camada alta do quinto domínio da proteína ATP7A desprotonada.

Para essa estrutura foi medido a distância entre os dois enxofres e o valor encontrado foi de 5,20 Å, inferior ao valor encontrado para a estrutura protonada (6,49Å). Apesar das cargas negativas destes átomos estarem concentradas, este fato não favorece uma repulsão e indica uma possibilidade de uma coordenação mais efetiva. Ambos os enxofres apresentaram uma maior densidade eletrônica quando comparados com os enxofres da estrutura protonada. Como esperado, esse fato pode evidenciar que na estrutura desprotonada os enxofres apresentam um caráter ligante mais acentuado, pois a carga negativa está mais concentrada nos átomos, facilitando a coordenação com o metal.

3.2.4 Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres protonados à platina

A análise estrutural segue na ordem cronológica de cálculo das estruturas. Por apresentar a geometria mais rígida, e portanto com menor liberdade conformacional e

superfície de energia potencial menos complexa, o produto final projetado, com coordenação bidentada traz os próximos resultados.

A Figura 3.11 traz a geometria otimizada juntamente com alguns valores de cargas atômicas importantes para a análise. Para essa estrutura foram medidos: as distâncias entre os dois átomos de enxofre (3,48 Å), o comprimento de ligação entre a platina e o enxofre da cisteína 17 (2,35 Å), o comprimento de ligação entre a platina e o enxofre da cisteína 14 (2,32 Å) e o ângulo de ligação entre a platina e os enxofres das cisteínas 14 e 17 (95,2^o). Houve um pequeno aumento do comprimento de ligação entre a platina e os átomos de nitrogênio, quando comparados com os dados da cisplatina, passando de 2,08 Å para 2,11 Å.

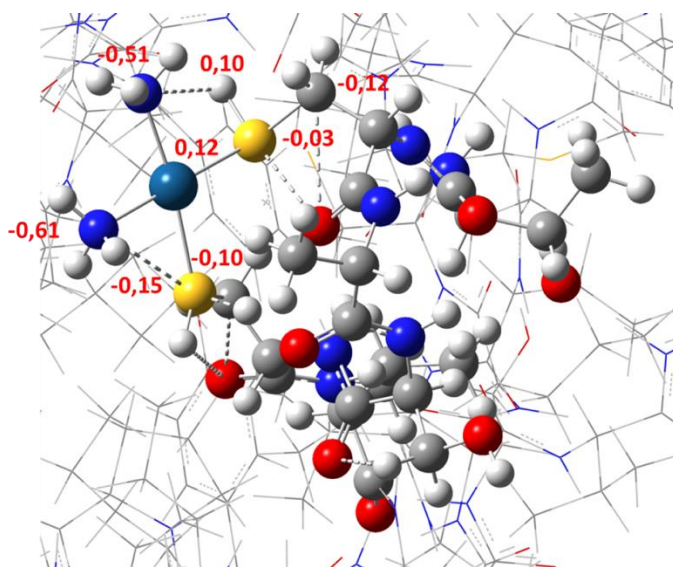


Figura 3.11 – Estrutura otimizada do produto final da coordenação da platina com os enxofres coordenados

A geometria de coordenação ao redor do centro metálico se mantém quadrático-plana, o que é esperado para Pt(II). Na estrutura do produto final, com exceção dos hidrogênios, todos os átomos tiveram uma variação de carga, o que é explicado principalmente pela formação da coordenação ao grupo $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{+2}$. As diferenças entre os ambientes de simetria, são devidas provavelmente às diferentes interações intramoleculares que são formadas. O nitrogênio que apresentou diminuição na carga atômica de $-0,43$ para $-0,51$ a.u. faz uma interação com um hidrogênio com distância de 1,86 Å. O outro nitrogênio, cuja carga é $-0,61$ a.u., faz uma interação com um enxofre, com distância de 2,84 Å. As principais modificações de densidade eletrônica são vislumbradas nas cargas atômicas dos átomos diretamente envolvidos com as novas

ligações químicas: Pt—S. O enxofre da cisteína 17 tem um aumento líquido da carga atômica chegando ao valor de -0,03 a.u após a coordenação à platina, indicando que grande parte de sua densidade eletrônica está envolvida com a ligação química assim como o outro enxofre, presente na cys14 apresenta-se agora com carga -0,15a.u, assim como pode ser observado que a carga atômica da platina aumentou consideravelmente, passando de 0,01 para 0,12 a.u. A diferença das cargas, ainda negativas, dos átomos de enxofre, reforça a ideia de que a primeira coordenação se dê com a cisteína 17.

3.2.5 Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres desprotonados à platina

Com a intenção de simular possibilidades de diferentes pHs fisiológicos, a estrutura do sítio de reação original, com os grupos tióis da cisteína desprotonados também foi utilizada para mapear a reação de substituição. Para análise dessa estrutura do produto final da referida reação, foram medidos: as distâncias entre os dois enxofres (3,60 Å), o comprimento de ligação entre a platina e o enxofre da cisteína 17 (2,30 Å), o comprimento de ligação entre a platina e o enxofre da cisteína 14 (2,32 Å) e o ângulo de ligação entre a platina e os enxofres das cisteínas 14 e 17 ($96,2^{\circ}$). O comprimento de ligação entre a platina e os nitrogênios dos grupos amino aumentou um pouco, passando para 2,16 Å, indicando novamente, um sutil enfraquecimento.

Nessa estrutura as cargas dos nitrogênios e dos hidrogênios não sofreram variação. As novas ligações químicas Pt—S são novamente responsáveis pelas principais modificações de densidade eletrônica quando se compara com a proteína livre (valores apresentados na figura 3.10). O enxofre da cisteína 17 tem um aumento líquido da carga atômica chegando ao valor de -0,43 a.u após a coordenação à platina, indicando que grande parte de sua densidade eletrônica está envolvida com a ligação química com o metal. Assim como pode ser observado que a carga atômica da platina aumentou, passando de 0,01 para 0,08 a.u. Novamente, diferença das cargas, ainda negativas, dos átomos de enxofre, reforça a ideia de que a primeira coordenação se dê com a cisteína 17. Além disso, ambos os átomos de enxofre apresentam interações intramoleculares com átomos de hidrogênio. O enxofre de carga -0,43 a.u faz três interações com comprimentos de 2,45 Å, 2,62 Å e 2,38 Å. O enxofre de carga -0,34 a.u faz duas interações com comprimentos de 2,37Å e 2,75Å. Mais uma vez, a geometria de coordenação é quadrático-plana.

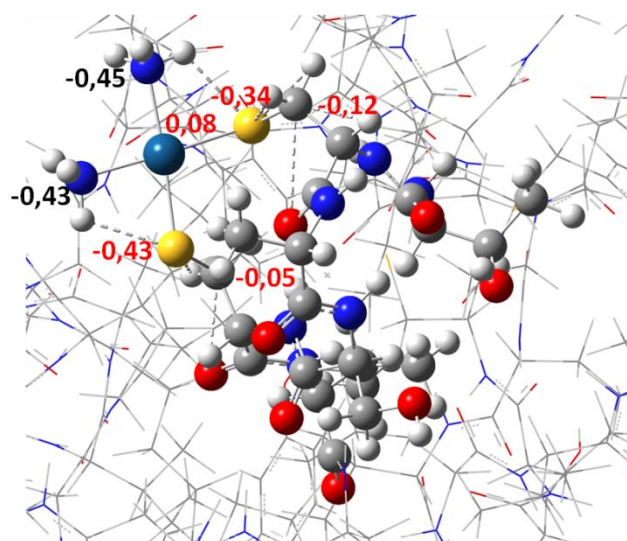


Figura 3.12 – Representação da estrutura otimizada do produto final da coordenação da platina com o enxofres desprotonados.

Comparando as duas estruturas dos produtos finais de coordenação entre a platina e os enxofres, apresentadas acima, pode-se verificar que na estrutura onde os enxofres estão desprotonados, menor quantidade de átomos sofreram variação de carga e essas variações foram menores quando comparadas com as estruturas da cisplatina e da cisteína isoladas.

Em relação às estruturas otimizadas, tem-se uma concordância geral com o previsto pelos resultados experimentais (ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e dicroísmo circular) apresentados no trabalho de Calandrini e colaboradores. (Calandrini, Arnesano et al., 2014) Neste trabalho, a coordenação do grupo $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ ao MNK1 (primeiro domínio de coordenação ao metal da ATP7A) foi analisada por métodos experimentais e computacionais. O modo de ligação previsto pelos resultados espectroscópicos e de espectrometria de massas é a coordenação bidentada por meio dos átomos de enxofre das cisteínas do ambiente CXXC da estrutura MNK1, assim como os produtos projetados nesta dissertação com a estrutura MNK5. Os resultados computacionais, entretanto, quando preveem a coordenação bidentada, relatam esta envolvendo um átomo de enxofre de uma cisteína e um átomo de nitrogênio de outra cisteína do ambiente CXXC.

3.2.6 Estrutura otimizada produto final da coordenação dos enxofres protonados ao cobre

A otimização desta estrutura é proveniente da segunda configuração espacial obtida por meio do arquivo do PDB cujos dados foram apresentados na tabela 3.2. Para essa estrutura foram medidos: as distâncias entre os dois enxofres (3,89Å), o comprimento de ligação entre o cobre e o enxofre da cisteína 17 (2,51 Å), o comprimento de ligação entre o cobre e o enxofre da cisteína 14 (2,33 Å) e o ângulo de ligação entre o cobre e os enxofres das cisteínas 14 e 17 (99,3⁰)

Nessa estrutura a carga apenas de um enxofre sofreu variação, ficando com o valor de -0,35 a.u., o que pode ser explicado por uma interação intramolecular com um hidrogênio de comprimento igual a 2,15 Å. A carga do átomo de cobre nesta estrutura é de 0,74 a.u.

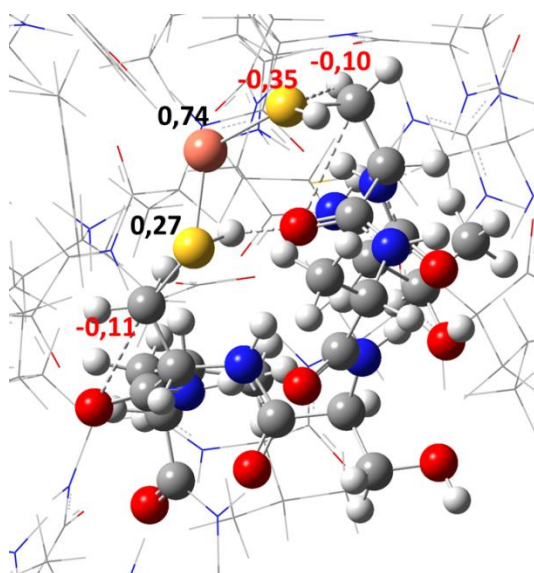


Figura 3.13 – Estrutura otimizada do produto final da coordenação do cobre com o enxofres protonados

3.2.7 Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres desprotonados ao cobre

Para essa estrutura foram medidos: as distâncias entre os dois enxofres (3,63Å), o comprimento de ligação entre o cobre e o enxofre da cisteína 17 (2,30 Å), o comprimento de ligação entre o cobre e o enxofre da cisteína 14 (2,33 Å) e o ângulo de ligação entre o cobre e os enxofres das cisteínas 14 e 17 (107,1⁰).

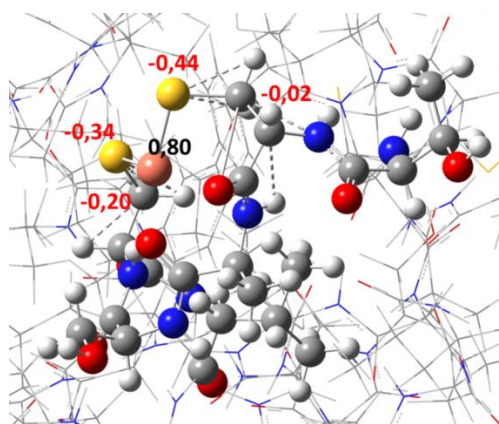


Figura 3.14 – Estrutura otimizada do produto final da coordenação dos enxofres desprotonados ao cobre

Nessa estrutura os enxofres apresentaram variações nas cargas devido a interações com átomos de hidrogênio. O enxofre de carga $-0,44$ a.u faz duas interações de comprimento $2,32$ e $2,38$ Å e o enxofre com carga de $-0,34$ a.u faz também duas interações de comprimento $2,64$ Å e $2,40$ Å. O carbono que apresentou carga de $-0,20$ Å faz uma interação com um hidrogênio de comprimento $2,18$ Å e o outro carbono, com carga de $0,02$ Å faz duas interações, uma com um nitrogênio com comprimento de $2,4$ Å e outra com hidrogênio, com comprimento de $2,17$ Å. Nessa estrutura o cobre ficou com carga de $0,80$ a.u.

Fazendo uma comparação das quatro estruturas otimizadas dos produtos finais com a estrutura experimental algumas considerações podem ser feitas: (i) a distância entre os enxofres protonados coordenados à platina é menor do que quando eles estão desprotonados, o mesmo não ocorrendo em relação à coordenação com o cobre, onde os enxofres protonados apresentam maior distância entre si. (ii) o comprimento de ligação entre os enxofres das cisteínas 14 e 17 e os metais (platina e cobre) apresentaram valores bem semelhantes em todas as quatro estruturas otimizadas, ficando entre $2,30$ Å e $2,51$ Å e portanto menores dos que os valores apresentados na estrutura experimental analisada ($2,17$ Å e $2,18$ Å), (iii) de uma maneira geral pode-se dizer que a estrutura otimizada com os enxofres desprotonados coordenados ao cobre apresenta dados bem similares aos da estrutura experimental, que apresenta também os enxofres desprotonados coordenados ao cobre.

Em relação às cargas, de uma maneira geral, pode-se dizer que a densidade eletrônica de um átomo aumenta sempre que ocorre uma interação inter ou intramolecular com algum átomo que seja mais eletronegativo. Da mesma maneira, pode-se dizer que a densidade eletrônica de um átomo diminui sempre que ocorre uma

interação inter ou intra molecular com outro átomo que seja menos eletronegativo. O quanto o valor de carga aumenta ou diminui com essas interações está diretamente relacionado também ao valor do comprimento das mesmas.

3.2.8 Estruturas otimizadas dos reagentes intermediários protonados e desprotonados da primeira etapa da reação de substituição

A partir de agora serão mostradas as estruturas otimizadas das espécies intermediárias apresentadas nas figuras 3.4 e 3.5.

Para as estruturas abaixo foram medidos as distâncias entre os dois enxofres, encontrando o valor de 7,04 Å para a estrutura protonada e de 7,01 Å para a estrutura desprotonada. Para ambas as estruturas pode-se observar que a aproximação da molécula de cisplatina à proteína ATP7A provoca um maior afastamento dos enxofres, visto que na proteína isolada, a medida encontrada para essa distância foi de 6,49Å. Na estrutura protonada, isto pode ser explicado por uma possível repulsão entre os cloros e o enxofre da cisteína 14, pois como pode ser observado nessa estrutura, os cloros ficam apontados na direção desse enxofre. Na estrutura desprotonada, esse afastamento pode ser explicado pela formação de duas ligações intermoleculares entre o enxofre da cisteína 17 com os hidrogênios do grupo amino.

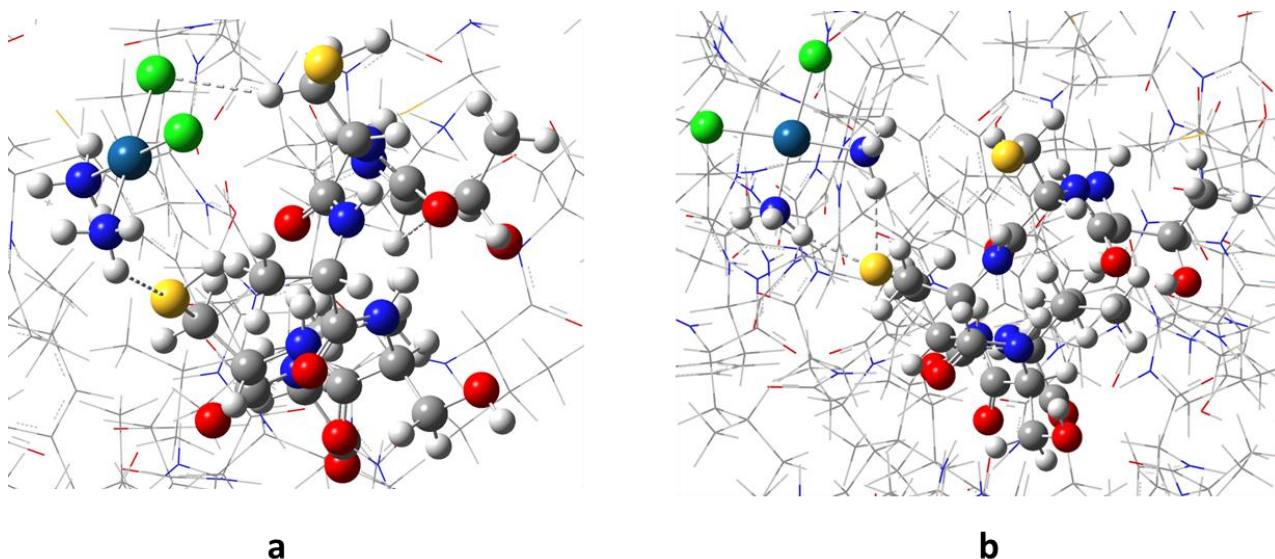


Figura 3.15 – Estrutura otimizada do reagente intermediário:

(a) protonado RI e (b) desprotonado RI'

Em ambos os casos, a presença de ligações intermoleculares entre o enxofre da cisteína 17 e hidrogênios do grupo amino pode explicar a maior proximidade da molécula da cisplatina com esse enxofre. As ligações entre a platina e os cloros e a platina e os nitrogênios não sofreram alteração significativa com a aproximação entre a molécula da cisplatina e a ATP7A nas duas estruturas.

3.2.9 Estruturas otimizadas dos produtos intermediários da primeira etapa da coordenação da platina com a proteína ATP7A

Alguns produtos intermediários foram propostos considerando a monocoordenação da platina aos enxofres das cisteínas 14 e 17 do quinto domínio da proteína ATP7A. Para a equação 3.1, esses produtos foram denominados de PIA e PIB e para a equação 3.2, foram denominados de PIA' e PIB'. Nesses produtos intermediários, os cloros substituídos foram mantidos perto da estrutura. Os produtos PIA e PIB referentes a equação 3.1, estão representados na Figura 3.16.

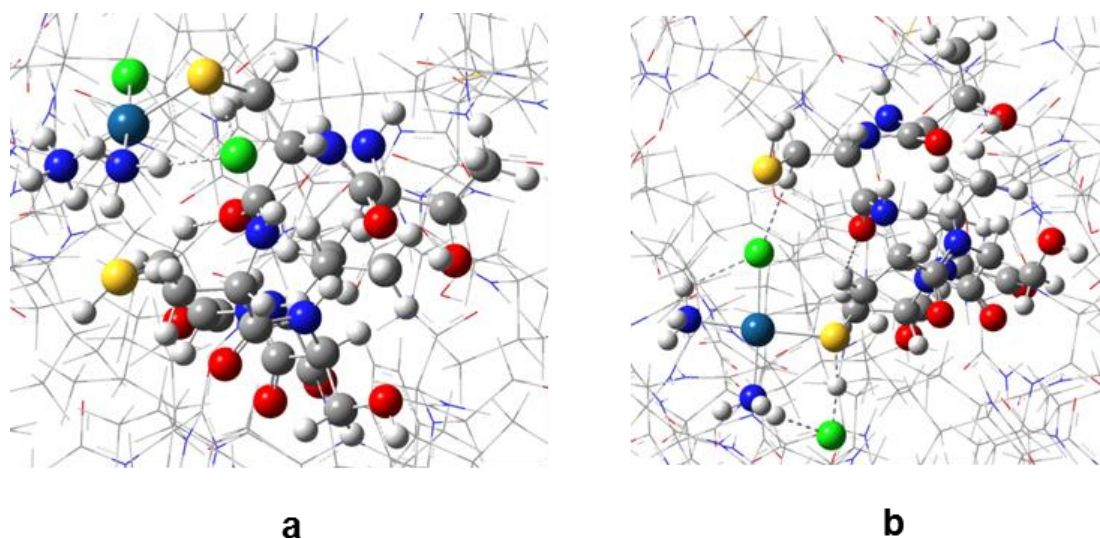


Figura 3.16 – Estrutura otimizada dos produtos intermediários: (a) PIA e (b) PIB

Medindo-se a distância entre os enxofres nessas estruturas, os valores obtidos foram de 6,30 Å para a estrutura PIA e 6,21 Å para a estrutura PIB. O valor maior encontrado na primeira estrutura em relação à segunda, pode ser explicado por uma possível repulsão entre o enxofre ligado à platina, com o cloro não ligado, na estrutura

PIA. O cloro que foi substituído, e agora está fora da esfera de coordenação da platina, realiza ligações intermoleculares com os hidrogênios em ambas as estruturas.

Os produtos PIA' e PIB' referentes à equação 3.2, estão representados na Figura 3.17

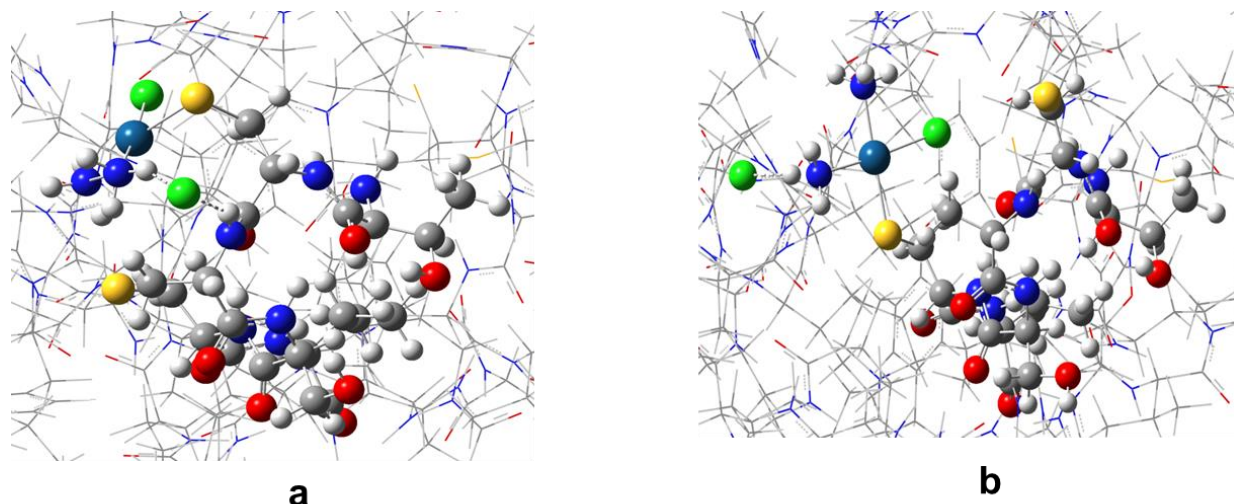


Figura 3.17 – Estrutura otimizada dos produtos intermediários: (a) PIA' e (b) PIB'

Medindo-se a distância entre os enxofres nessas estruturas, os valores obtidos foram de 6,49 Å para a estrutura PIA' e 7,40 Å para a estrutura PIB', valores maiores do que os encontrados para as estruturas anteriores (6,30 Å e 6,21Å). Na estrutura PIA', esse valor maior pode ser explicado pela posição do cloro. Nessa estrutura, comparada com a estrutura PIA, ele se posicionou em um lugar onde provocou uma repulsão com os dois enxofres. Na estrutura PIB', o valor foi ainda maior, pois houve a formação de uma ligação intermolecular entre o cloro substituído e um hidrogênio do grupo amino e uma repulsão entre o cloro que permaneceu ligado com o enxofre da cisteína 14.

3.2.10 Estruturas otimizadas dos produtos isolados da primeira etapa de coordenação da platina com a proteína ATP7A

Retirando o cloro substituído das estruturas dos quatro produtos intermediários, apresentados anteriormente, foram obtidas quatro estruturas de produtos isolados denominadas de PA1 e PB1, para a equação 3.1 e PA1' e PB1' para a equação 3.2. Os produtos isolados PA1 e PB1 estão representados na Figura 3.18.

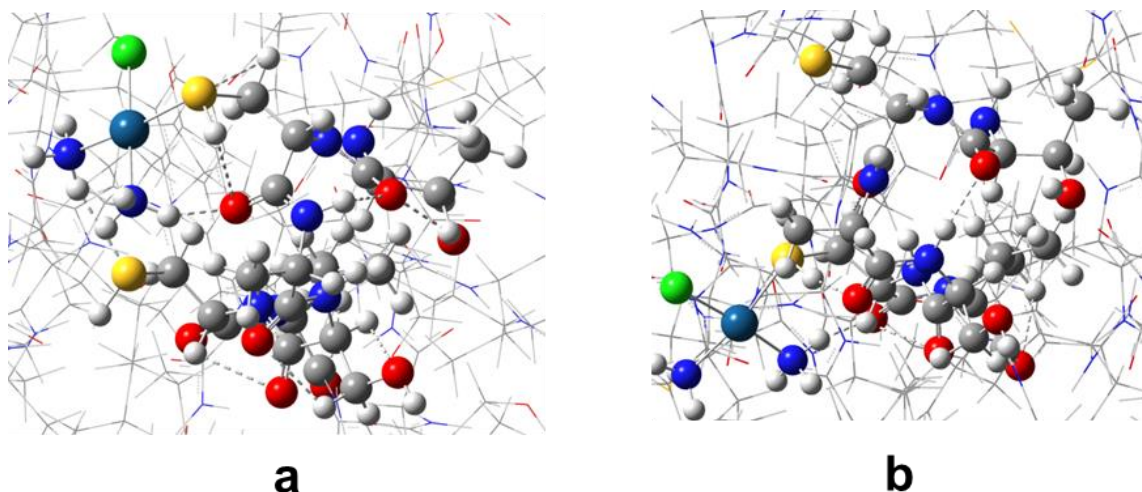


Figura 3.18 – Estrutura otimizada dos produtos isolados: (a) PA1 e (b)PB1

Nas estruturas PA1 e PB1, os valores encontrados para a distância entre os dois enxofres são respectivamente, 6,30 e 5,82 Å. Ao se retirar o cloro da estruturas PIB, a distância entre os enxofres diminui, o que poderia ser explicado pela nova posição do cloro ligado à platina, que agora, assumiu uma posição diferente, não exercendo repulsão ao enxofre da cisteína 14.

Os produtos isolados PA1' e PB1' estão representados na Figura 3.19.

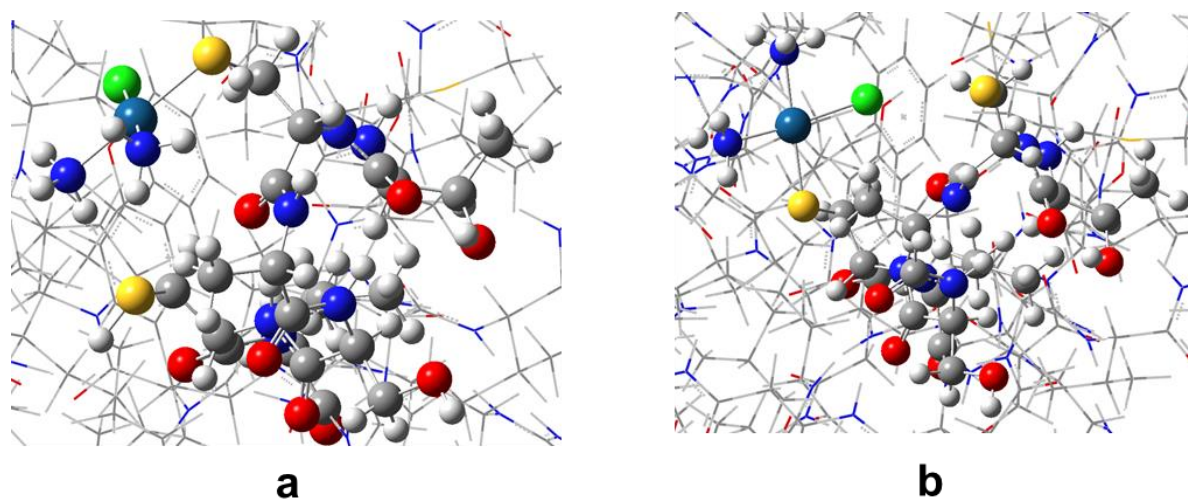


Figura 3.19 – Representação das estruturas otimizadas dos produtos isolados da primeira etapa da reação: (a) PA1' e (b)PB1'

Nas estruturas PA1' e PB1', os valores encontrados para a distância entre os dois enxofres são respectivamente, 6,21 e 6,75 Å. Ao se retirar o cloro não ligado da estrutura PIA, originando a estrutura PA1', a repulsão exercida do cloro não ligado sobre os enxofres não existe mais, por isso a distância entre eles fica menor. A retirada

do cloro na estrutura PIB' originando a estrutura PB1' provoca também um aumento da distância entre os enxofres, devido a não existir mais uma ligação intermolecular entre o cloro substituído e um hidrogênio do grupo amino.

3.2.11 Medidas de mudanças conformacionais da proteína ATP7A

A partir da estrutura experimental mostrada na Figura 3.8, foram definidos fatores de distância que indicam a mudança conformacional global da estrutura da proteína após os procedimentos de otimização. Desta forma foram escolhidos três átomos aleatórios que correspondessem a parâmetros latitudinais e longitudinais da proteína e a partir daí foram medidas as distâncias de cada um desses átomos e o átomo de enxofre da cisteína 14, como mostrado na Figura 3.20.

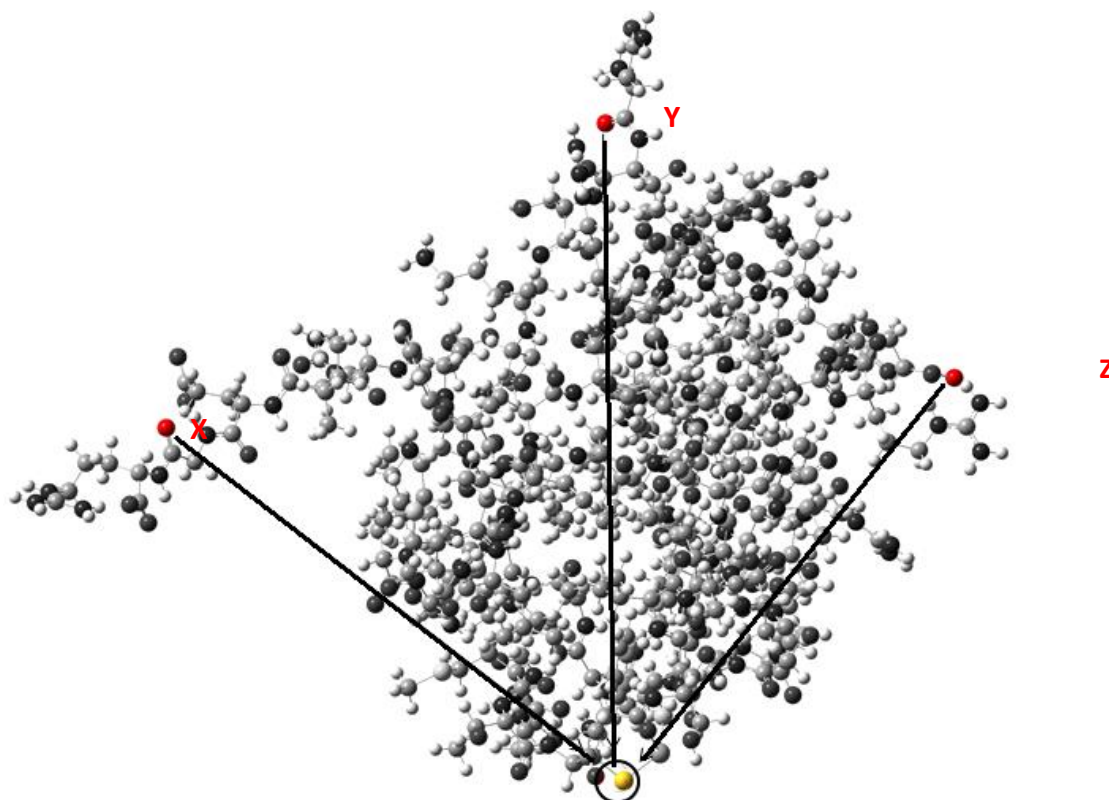


Figura 3.20 – Átomos usados como parâmetros na definição de mudança de conformação global. Os átomos de oxigênio marcados, foram definidos como sendo X, Y e Z.

Depois de obtidas todas as estruturas otimizadas, foram medidas novamente essas distâncias para os mesmos átomos em cada uma delas e não houve variação significativa entre esses valores, indicando não ter tido uma distorção da estrutura da proteína quando a mesma se aproxima ou se liga à molécula da cisplatina.

Com o objetivo de fortalecer as informações obtidas anteriormente, através do se ter uma visão geral de como a cisplatina distorce a molécula da proteína ATP7A, foram medidos os ângulos diedros das estruturas otimizadas anteriores como mostra a Figura 3.20.

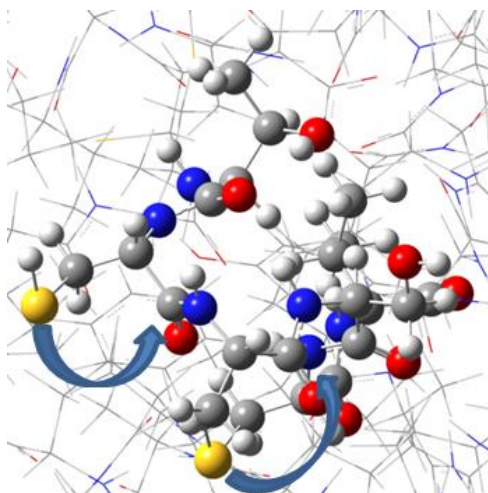


Figura 3.21 – Representação dos ângulos diedros medidos entre os enxofres das cisteínas e a cadeia peptídica

A Tabela 3.3 apresenta os valores encontrados para os ângulos diedros do sítio ativo e a Tabela 3.4 apresenta as distâncias entre os átomos de referência descritos na Figura 3.19 em cada estrutura calculada neste trabalho. A estratégia de utilizar estes parâmetros estruturais para definir a distorção global entre as estruturas e não uma medida, por exemplo, de desvios mínimos quadráticos, se deve ao fato de a análise poder ser feita para estruturas com configurações espaciais iniciais diferentes.

Tabela 3.3: Medidas dos ângulos diedros do sítio ativo

Estrutura	ÂNGULOS DIEDROS/(°)	
	S(cys ₁₄) – C – C – C	S(cys ₁₇) – C – C – C
ATP7A	67	160
RI	80	164
PIA	69	155
PIB	65	153
PIA1	67	142
PIB1	48	152
ATP7A/Pt com H	53	157
ATP7A/Pt sem H	71	153
ATP7A/Cu com H	63	174
ATP7A/Cu sem H	65,48	176
Banco de dados	66,41	160

Tabela 3.4 – Medidas das distâncias entre o enxofre da cisteína 14 e os átomos usados como parâmetros

Estrutura	Distância entre S(cys ₁₄) e parâmetros/Å		
	Átomo X	Átomo Y	Átomo Z
ATP7A	16,9	16,83	13,38
desprotonada			
RI	17,07	16,64	12,23
PIA	16,43	17,43	12,47
PIB	16,48	17,53	13,43
RI'	16,96	16,65	13,57
ATP7A/Cu com H	16,68	17,24	12,47
ATP7A/Cu sem H	14,70	15,92	13,47
Banco de dados	15,42	14,43	13,85

As proteínas são moléculas flexíveis e a aproximação de outra molécula pode afetar de alguma maneira as suas conformações originais. Observando a Tabela 3.3, nota-se que os valores dos ângulos diedros sofrem maior oscilação na cisteína 17 (variação de 23 graus entre o maior ângulo e o menor) do que na cisteína 14. Isto pode ser explicado pelo fato que os aminoácidos ligados à cisteína 17 apresentam maior número de forças intramoleculares atrativas entre seus átomos e a cadeia peptídica, em comparação aos aminoácidos diretamente ligados à cisteína 14.

Comparando os dados das estruturas calculadas, com a do banco de dados, percebemos uma maior distorção no ângulo S(cys₁₄) – C – C – C calculado para o reagente intermediário RI muito provavelmente devido à interação repulsiva dos enxofres com os átomos de cloro da cisplatina devido a orientação resultante destes átomos na geometria otimizada (apresentada na Figura 3.15).

Já os parâmetros de distância, apresentados na Tabela 3.4, indicam, que as mudanças conformacionais da região da proteína são sutis, com variações de no máximo 3Å entre os valores calculados.

De uma maneira geral, pode-se dizer que a formação ou quebra, bem como o encurtamento ou alongamento de ligações intramoleculares são responsáveis pelas pequenas diferenças entre os ângulos diedros entre as estruturas.

3.3 Análise termodinâmica das reações

A partir dos cálculos de frequência e análise vibracional de todas as estruturas mostradas acima, os parâmetros termodinâmicos para as reações propostas foram calculados;

A Tabela 3.5 mostra os parâmetros termodinâmicos encontrados para as equações 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8, apresentadas a seguir, que representam as reações globais de substituição.

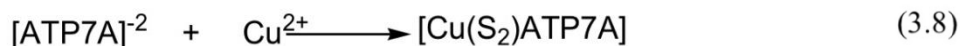
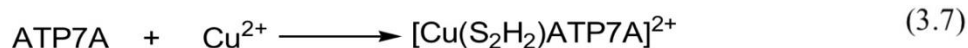
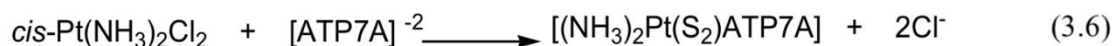


Tabela 3.5 – Dados termodinâmicos das reações globais em kcal/mol⁻¹

EQUAÇÃO	ΔG	ΔH	$-T\Delta S$
3.5	306,9	307,89	-0,98
3.6	-81,34	-77,16	-4,1
3.7	5798,4	6493,6	-701,1
3.8	6196,4	6887	-696,5

Como se pode observar, três das quatro equações apresentaram variação de energia livre de Gibbs positiva, indicando que, nas condições analisadas, elas não ocorreriam de maneira espontânea. Entretanto, podemos observar que o desbalanceamento das cargas entre reagente e produtos provoca uma superestimação das energias eletrônica-nuclear nas espécies com carga diferente de zero. Desta forma, resultando em valor de variação

entálpica, em módulo, muito grande. Apenas a equação 3.6, que representa a coordenação da cisplatina ao quinto domínio de ligação da ATP7A desprotonada apresentou variação de energia livre de Gibbs negativa, indicando ser espontânea. É possível observar que para esta equação química, não há desequilíbrio de cargas entre reagentes e produtos uma vez que o modelo da proteína desprotonada tem carga 2- assim como os dois cloretos que são substituídos. A superestimação da energia eletrônica-nuclear ocorre nos dois termos, atuando como um cancelamento de erros.

Os valores do termo entrópico ($-T\Delta S$) são todos negativos, contribuindo para a espontaneidade da reação. Observando a variação entrópica, há um aumento de entropia para todas as equações analisadas, provavelmente há um equilíbrio entre as mudanças conformacionais da proteína e o número de espécies de produtos formados.

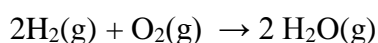
As interações inter e intramoleculares contribuem para a definição do caráter endotérmico ou exotérmico de cada reação. As reações onde os reagentes apresentam maior número de interações intermoleculares do que os produtos, tendem a apresentar variação de entalpia positiva, sendo portanto endotérmicas e as reações onde o número de interações intermoleculares são maiores nos produtos, tendem a apresentar variação de entalpia negativa, sendo portanto exotérmicas.

Observando as estruturas envolvidas na reação representada pela equação 3.5 e mostradas acima, o número de interações intramoleculares atrativas no reagente (proteína ATP7A) é superior ao número de ligações intermoleculares no produto final. Fato que não foi observado para a estruturas envolvidas na equação 3.6, onde o produto

final apresenta maior número de interações intramoleculares atrativas do que o reagente que por apresentar concentração de cargas negativas sobre os átomos de enxofre indicam uma maior repulsão. Nas duas equações, houve quebra das ligações entre platina e cloro para formação de ligações platina-enxofre. As ligações entre a platina e os nitrogênios no produto final ficaram maiores do que na cisplatina isolada, indicando um ligeiro enfraquecimento das mesmas. Esses fatores podem ter contribuído para que a variação de entalpia fosse positiva (Banerjee e Mukherjee, 2012). A variação de energia livre de Gibbs depende das contribuições entálpica e entrópica e sendo a primeira superior à segunda, era de se esperar que o ΔG apresentasse o mesmo sinal do ΔH .

Como se pode notar, as equação 3.5 apresentou valores bem superiores, quando comparada com a equação 3.6. Isso é explicado pelo desbalanceamento de cargas entre os reagentes e produtos. As equações 3.8 e 3.9 apresentaram valores muito superiores aos encontrados nas equações 3.5 e 3.6. O fato de haver a presença de um íon isolado (Cu^{+2}) afetou bastante esses resultados, visto que os cálculos foram feitos em fase gás, e portanto, a falta de moléculas de solvente não estabilizou o efeito das cargas.

Para se demonstrar o quanto o desbalanceamento de cargas afeta e superestima os valores dos parâmetros termodinâmicos (Grimme, 2012) foram feitos cálculos teóricos de mesmo nível usado nos anteriores para a equação da formação da água. Sabe-se pelos dados da literatura que a entalpia de formação da água gasosa é -57,8 kcal/mol. Fazendo o cálculo teórico para a primeira equação, o valor encontrado foi bem similar ao da literatura. Quando se faz o mesmo cálculo teórico para as equações iônicas, os valores se mostram superiores, como pode ser observado a seguir:



$$\Delta G = -66,46 \text{ kcal/mol} \quad \Delta H = -69,4 \text{ kcal/mol} \quad -T\Delta S = 13,44 \text{ kcal/mol}$$



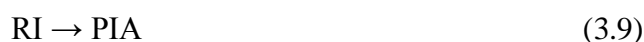
$$\Delta G = -421,54 \text{ kcal/mol} \quad \Delta H = -428,14 \text{ kcal/mol} \quad -T\Delta S = 6,59 \text{ kcal/mol}$$



$$\Delta G = -588,08 \text{ kcal/mol} \quad \Delta H = -601,45 \text{ kcal/mol} \quad -T\Delta S = 27,80 \text{ Kcal/mol}$$

Como se pode observar, a ordem de grandeza dos parâmetros termodinâmicos das equações 3.8 e 3.9 são bem parecidos, o que era esperado, visto que em ambas, o número de espécies iônicas é o mesmo.

Para as espécies intermediárias propostas para a reação entre o quinto domínio da proteína ATP7A e a platina, a análise foi diferenciada para a primeira etapa da substituição, contemplando se a primeira coordenação da platina ao MNK5 ocorreria pela cisteína 17 ou pela cisteína 14. Para esta observação foram realizados cálculos dos parâmetros termodinâmicos para as Equações químicas de 3.9 a 3.12 apresentadas a seguir.



Os resultados desses cálculos estão mostrados na tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Dados termodinâmicos para as reações envolvendo espécies intermediárias em kcal.mol⁻¹

EQUAÇÃO	ΔG	ΔH	-TAS
3.9	0,97	1,12	-0,15
3.10	1,35	3,09	-1,74
3.11	-2,04	-4,7	2,66
3.12	1,03	0,41	0,62

Como pode ser observado pela tabela, as reações envolvendo as espécies intermediárias onde as substituições são monocoordenadas, apresentaram valores mais próximos entre si e considerando o erro de +/- 1 kcal/mol, pode-se dizer que todas elas poderiam apresentar um comportamento tendendo a espontaneidade. Entretanto, a primeira substituição pela coordenação com a cisteína 17 é ligeiramente mais espontânea, comparando as equações 3.9 e 3.11 para as espécies com o modelo da ATP7A protonada ou equações 3.10 e 3.12 para as espécies que apresentam os grupos tiol desprotonadas.

Apenas a equação 3.11, apresentou caráter termodinâmico diferente, ou seja, variação de entalpia e variação de energia livre de Gibbs negativa. A estrutura PIA

comparada com a estrutura do reagente intermediário, RI, possui menor quantidade de ligações intramoleculares, fato que pode ajudar a explicar a variação de entalpia positiva encontrada para essa etapa. O contrário ocorre na estrutura PIB, que apresenta um maior número de ligações intramoleculares quando comparada com a estrutura do reagente intermediário.

Processos exotérmicos, que são aqueles nos quais a variação de entalpia no sistema é menor que 0 kcal/mol, tendem a ser considerados espontâneos. Mas apenas a variação de entalpia de uma reação não é um dado suficiente para que se preveja a espontaneidade da mesma com precisão, sendo necessário também considerar como a entropia varia durante o processo. Reações exotérmicas que possuem variação de entropia positiva são geralmente espontâneas. Da mesma maneira, reações endotérmicas que possuem variação de entropia negativa são geralmente não espontâneas. A energia livre de Gibbs (ΔG) é uma das funções mais usadas na química e na bioquímica em virtude desta acompanhar a maioria dos processos reacionais, em virtude de a energia livre ser capaz de prever se uma reação é espontânea, isto é, caso a temperatura e a pressão sejam constantes. Processos que apresentam um valor de energia livre de Gibbs negativo, são considerados espontâneos. Considerando o erro de ± 1 kcal/mol, apenas a equação 3.11 apresentou o valor da energia de Gibbs negativo, indicando ser um processo espontâneo. Uma explicação possível para esse fato é que o cloro que foi substituído ficou em uma posição que proporcionou a realização de diversas interações com diferentes átomos. A preferência pela cisteína 17 é uma indicação incipiente, entretanto poderia indicar um caminho de reversão da ligação, em casos de manifestação de resistência à cisplatina.

Mais uma vez é importante ressaltar que a conformação de uma biomolécula, como é o caso da proteína ATP7A, sofre diversas mudanças em sua conformação com a aproximação de ligante, como é o caso da molécula de cisplatina. E essas mudanças conformacionais podem alterar as posições de todos os átomos interligados na estrutura proteica, fazendo com que as interações intramoleculares sejam afetadas.

Com o objetivo de tentar minimizar o efeito da presença de espécies iônicas e tratá-las de forma mais realística, visto que em um meio aquoso, como um sistema biológico complexo, onde ocorre a reação, um íon não existe isolado, mas sim coordenado à moléculas de água, foi feito um novo cálculo dos parâmetros termodinâmicos da reação envolvendo o cobre e a proteína ATP7A. O íon cobre isolado, presente nas reações anteriores foi substituído por um complexo tetraédrico

formado pela coordenação de quatro moléculas de água com o cobre, entretanto ainda mantendo a carga geral diferente de zero, como mostra a figura 3.22.

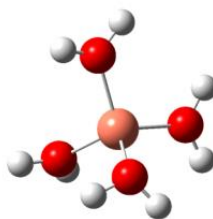
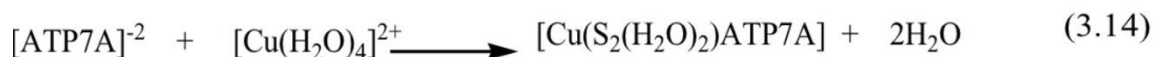
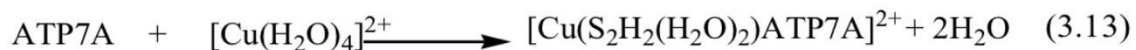


Figura 3.22 – Estrutura otimizada do complexo tetraédrico

Esta especiação do cobre com moléculas de água já está fundamentada em modelos já estudados na literatura (De Almeida, Rinkevicius et al., 2007) e abundantemente presentes no ambiente biológico no qual a reação se processa. Assim foi testado como reagente o tetraaquocobre (II), tendo toda a estrutura no nível da camada alta: PBE1PBE/6-31g(d,p) e ECP para o cobre lanl2dz. Novamente, para as moléculas de água, foi utilizado o mesmo nível de cálculo da camada alta: PBE1PBE/6-31g(d,p). Utilizando estas novas estruturas, duas novas equações químicas foram propostas. A equação 3.13, onde há a reação deste complexo com a proteína ATP7A mantendo os enxofres das cisteínas 14 e 17 protonados e a equação 3.14, onde há a reação deste mesmo complexo com a proteína ATP7A com os mesmos enxofres desprotonados. Estas reações estão representadas pelas equações 3.13 e 3.14, mostradas a seguir.



As estruturas otimizadas dos produtos finais das equações 3.13 e 3.14 estão mostradas na Figura 3.23.

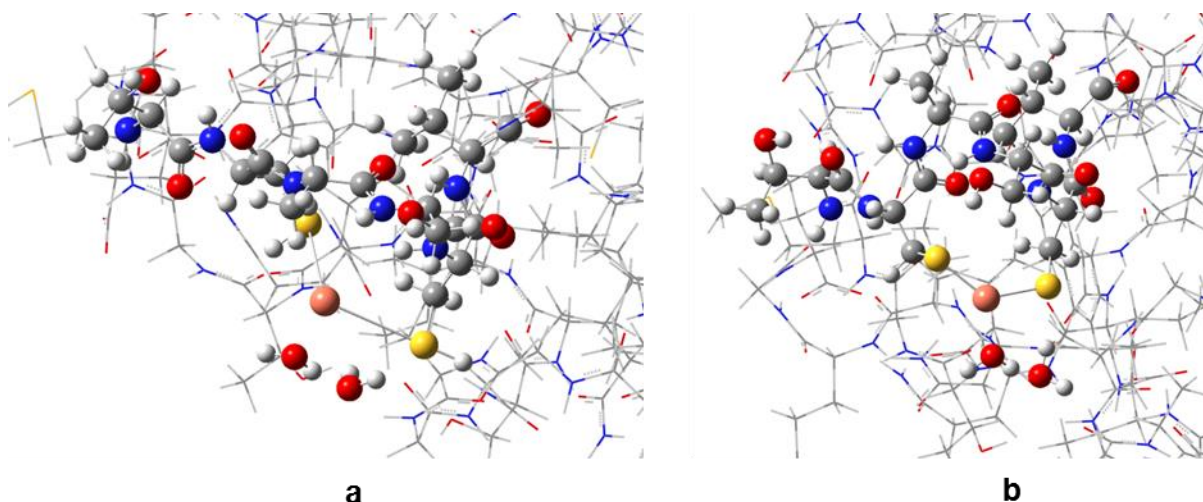


Figura 3.23 – Estrutura otimizada dos produtos finais: (a) da equação 3.13 (b) da equação 3.14

Para ambas as estruturas foram medidos as distâncias entre os dois enxofres, o comprimento de ligação entre o cobre e o enxofre da cisteína 17, o comprimento de ligação entre o cobre e o enxofre da cisteína 14 e o ângulo de ligação entre o cobre e os enxofres das cisteínas 14 e 17.

Os valores encontrados para a estrutura da equação 3.13 foram respectivamente: 5,68 Å, 3,56 Å, 3,42 Å e 108,8°. Para a estrutura da equação 3.14 os valores encontrados foram: 4,04 Å, 2,18 Å, 2,27 Å e 130,4°. Estes últimos valores se assemelham bastante com os valores da estrutura retirada do PDB e representada na Figura 3.8, que são : 3,59 Å, 2,18 Å, 2,17 Å e 111°.

Os cálculos com o íon cobre hidratado forneceram resultados novamente contestáveis devido aos altos valores de variação de energia livre de Gibbs: $\Delta G = 9345,2$ e $\Delta G = 9854,3$ kcal/mol respectivamente para as equações 3.13 e 3.14. Mesmo alterando a forma de apresentar o íon cobre no reagente, a falta de balanço entre as cargas presentes nos reagentes e ausentes nos produtos faz com que a energia dos primeiros sejam superestimadas e este efeito é aumentado quando se aumenta o número de elétrons do sistema com carga diferente de zero. O ideal, seria modificar a especiação do íon metálico por meio de um reagente neutro, mas que fosse possível em um ambiente biológico. Esta alternativa não pode ser analisada dentro da relação escopo/tempo desta dissertação.

Além desta questão, inerente ao cálculo de estruturas eletrônicas com carga, no trabalho de elucidação da estrutura do MNK5 coordenado ao cobre, (Banci, Bertini, Ciofi-Baffoni et al., 2005) especula-se que o transporte destes íons metálicos poderia se dar por meio de uma ligação em ponte, na qual o cobre se coordenaria por uma ou duas

cisteína de cada unidade de proteína. Se o mecanismo de transporte se der desta forma, nossa análise estaria contemplando apenas a formação de um intermediário de primeira etapa.

Os dados termodinâmicos permitem prever o sentido de uma reação química e consequentemente a espontaneidade da mesma. O fato de uma reação química ser espontânea, não significa que ela ocorra a uma velocidade observável, sendo necessário aliar aos dados termodinâmicos, os dados cinéticos das reações, que são obtidos por meio dos estados de transição e seus respectivos cálculos de IRC. Novamente, devido ao volume de cálculos realizados para contemplar as diferenças estruturais entre as espécies envolvidas na termodinâmica das reações estudadas, não foi possível convergir nenhuma estrutura de estado de transição, apesar das inúmeras tentativas realizadas.

CAPÍTULO 4

4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar de um sistema muito complexo e levando em conta a capacidade computacional disponível no laboratório de química computacional da Universidade Federal de Itajubá, todos os cálculos foram realizados em fase gás, não se incluindo a presença do solvente. Então apenas uma parte do problema foi modelada.

Todas as estruturas otimizadas apresentaram medições bastante semelhantes com a estrutura experimental retirada no banco de dados. Ao se realizar os cálculos termodinâmicos da reação global entre os enxofres das cisteínas, *cys*₁₄ e *cys*₁₇ do quinto domínio de ligação à metais da proteína ATP7A com a platina, da cisplatina, os valores de variação de entalpia indicaram reações endotérmicas, o que foi justificado pelo maior número de ligações intramoleculares nos reagentes e nos produtos.

Um outro fato observado foi que algumas das interações intramoleculares encontradas nos reagentes permaneceram nos produtos, mas se alongaram, caracterizando um enfraquecimento das mesmas. Os valores de energia livre de Gibbs para as reações globais apresentaram valores positivos, indicando processos não espontâneos.

Os comprimentos de ligação, a distância entre átomos, os ângulos normais e diedros medidos para todas as estruturas otimizadas apresentaram valores bem próximos aos valores medidos na estrutura retirada do banco de dados, onde os enxofres se encontram coordenados ao cobre, mostrando que as estruturas obtidas pelos cálculos de frequência e otimização estão corretas.

Já foi comprovado através de vários estudos experimentais e teóricos, citados anteriormente, que os domínios de ligação à metais da proteína ATP7A se ligam a íons de cobre, fazendo a sua homeostase no organismo, ou seja, é uma reação que ocorre com certeza no meio biológico. Os parâmetros termodinâmicos da reação global entre os enxofres das cisteínas *cys*₁₄ e *cys*₁₇ do quinto domínio da proteína ATP7A com o cobre também foram calculados e também apresentaram o mesmo comportamento para a variação de entalpia e para a energia livre de Gibbs.

Comprimentos de ligação, distância entre os átomos, medidas de ângulos normais e diedros foram medidos também para as estruturas obtidas através dos cálculos de frequência e análise vibracional e mais uma vez os resultados se assemelharam muito com os valores da estrutura retirada do banco de dados.

A reação entre a proteína e a cisplatina ocorre em um meio biológico, rico em solventes. A não inclusão dos mesmos nos cálculos pode ter provocado resultados que não retratam a realidade e por isso os valores da energia de Gibbs podem ter apresentado resultados positivos, indicando que as reações não tem tendência a ocorrer.

Outros fatos relevantes são: (i) existem estudos que comprovaram que a platina é muito sensível ao efeito do solvente (Da Silva, Costa et al., 2008); (ii) o resultado das interações hidrofóbicas entre os aminoácidos que constituem uma proteína são responsáveis pela sua estrutura terciária, estrutura esta, que geralmente coincide com a estrutura nativa de uma proteína, que é a estrutura que confere a ela uma função biológica específica. Estes fatos reforçam a importância de se realizar cálculos incluindo o efeito solvente, o que não foi possível, devido a limitações computacionais e de tempo de execução desta dissertação.

Foi observado que a presença de espécies iônicas nas reações provocou a superestimação dos valores termodinâmicos encontrados. Para demonstrar o quanto essa presença de espécies carregadas realmente influencia os valores dos parâmetros termodinâmicos, foram realizados cálculos com a reação de formação da água, de três maneiras diferentes e mais uma vez se observou que quanto maior o número de espécies iônicas, maiores os valores encontrados.

A especiação química permite tratar espécies químicas, como íons isolados, de maneira mais realística. Os cálculos envolvendo o íon cobre II foram refeitos, utilizando um complexo tetraédrico onde o cobre se coordena a quatro moléculas de água, essa alternativa entretanto, não foi bem sucedida na intenção de equilíbrio de cargas. Estratégias computacionais estão sendo estudadas para serem aplicadas de tal maneira que minimizem esses efeitos em estudos futuros assim como novas tentativas de se encontrar os estados de transição para avaliar a cinética destas substituições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, S., Z. S. Chen, *et al.* Resistance to cisplatin. **Anti-Cancer Drug Design**, v.14, n.2, Apr, p.143-151. 1999.
- ANDRADE, M. D. e S. R. D. Silva. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.60, p.331-335. 2007.
- ANDREWS, P. A. e S. B. Howell. CELLULAR PHARMACOLOGY OF CISPLATIN - PERSPECTIVES ON MECHANISMS OF ACQUIRED-RESISTANCE. **Cancer Cells-a Monthly Review**, v.2, n.2, Feb, p.35-43. 1990.
- BANCI, L., I. Bertini, *et al.* A NMR study of the interaction of a three-domain construct of ATP7A with copper(I) and copper(I)-HAH1 - The interplay of domains. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.46, Nov, p.38259-38263. 2005.
- BANCI, L., I. Bertini, *et al.* An NMR study of the interaction between the human copper(I) chaperone and the second and fifth metal-binding domains of the Menkes protein. **Febs Journal**, v.272, n.3, Feb, p.865-871. 2005.
- BANCROFT, D. P., C. A. Lepre, *et al.* PT-195 NMR KINETIC AND MECHANISTIC STUDIES OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM AND TRANS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) BINDING TO DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v.112, n.19, Sep, p.6860-6871. 1990.
- BANERJEE, S. e A. K. Mukherjee. A detailed quantum chemical study of the interactions of [Pt(dien)Cl](+) with a series of S-donor ligands: A computational approach. **Computational and Theoretical Chemistry**, v.991, Jul, p.116-123. 2012.
- BARREIRO, E. J. **Química Medicinal : As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre. 2015
- BARREIRO, E. J., C. R. Rodrigues, *et al.* Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v.20, p.300-310. 1997.
- BAZAN, S. F. e J. Fedoce Lopes. **Estudo teórico de processos de interação da cisplatina com modelos de proteínas ATP7A, Relatório de Iniciação Científica**. Universidade Federal de Itajubá Itajubá. 2014
- BOULIKAS, T. e M. Vougiouka. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (review). **Oncology Reports**, v.10, n.6, Nov-Dec, p.1663-1682. 2003.
- BRABEC, V. e J. Kasparkova. Modifications of DNA by platinum complexes - Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. **Drug Resistance Updates**, v.8, n.3, Jun, p.131-146. 2005.

- BRAY, B. A. E. D. **Biologia Molecular da Célula**: Bruce Alberts. 1983
- CALANDRINI, V., F. Arnesano, *et al.* Platination of the copper transporter ATP7A involved in anticancer drug resistance. **Dalton Transactions**, v.43, n.31, Aug, p.12085-12094. 2014.
- CAPELOZZI, V. L. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, p.375-382. 2009.
- CARVALHO, I., M. T. Pupo, *et al.* Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v.26, p.428-438. 2003.
- CENTERWALL, C. R., D. J. Kerwood, *et al.* New extracellular resistance mechanism for cisplatin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.102, n.5-6, May-Jun, p.1044-1049. 2008.
- CHU, G. CELLULAR-RESPONSES TO CISPLATIN - THE ROLES OF DNA-BINDING PROTEINS AND DNA-REPAIR. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.2, Jan, p.787-790. 1994.
- CHUNG, L. W., W. M. C. Sameera, *et al.* The ONIOM Method and Its Applications. **Chemical Reviews**, v.115, n.12, Jun, p.5678-5796. 2015.
- COUTINHO, N. H. M. E. K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Editora Livraria de Física. 2007
- DA SILVA, V. J., L. A. S. Costa, *et al.* Ab initio reaction path for cisplatin interaction with L-cysteine and L-methionine. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.108, n.2, Feb, p.401-414. 2008.
- DE ALMEIDA, K. J., Z. Rinkevicius, *et al.* Modeling of EPR parameters of copper(II) aqua complexes. **Chemical Physics**, v.332, n.2-3, Feb, p.176-187. 2007.
- DUBOS, R. J. THE MODE OF ACTION OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v.21, n.1, p.27-36. 1945.
- EL-KHATEEB, M., T. G. Appleton, *et al.* Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.77, n.1-2, Oct, p.13-21. 1999.
- FIELD, M. J., P. A. Bash, *et al.* A COMBINED QUANTUM-MECHANICAL AND MOLECULAR MECHANICAL POTENTIAL FOR MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATIONS. **Journal of Computational Chemistry**, v.11, n.6, Jul, p.700-733. 1990.
- G. H. GRANT, W. G. R. **Computational Chemistry**: Oxford. 1995
- GALLIANI, A., M. Losacco, *et al.* Cisplatin handover between copper transporters: the effect of reducing agents. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.19, n.4-5, Jun, p.705-714. 2014.

GALLUZZI, L., L. Senovilla, *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v.31, n.15, Apr, p.1869-1883. 2012.

GARCIA-VILOCA, M., J. Gao, *et al.* How enzymes work: Analysis by modern rate theory and computer simulations. **Science**, v.303, n.5655, Jan, p.186-195. 2004.

GATELY, D. P. e S. B. Howell. CELLULAR ACCUMULATION OF THE ANTICANCER AGENT CISPLATIN - A REVIEW. **British Journal of Cancer**, v.67, n.6, Jun, p.1171-1176. 1993.

GODWIN, A. K., A. Meister, *et al.* HIGH-RESISTANCE TO CISPLATIN IN HUMAN OVARIAN-CANCER CELL-LINES IS ASSOCIATED WITH MARKED INCREASE OF GLUTATHIONE SYNTHESIS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.7, Apr, p.3070-3074. 1992.

GONZALEZ, V. M., M. A. Fuertes, *et al.* Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v.59, n.4, April 1, 2001, p.657-663. 2001.

GOODYER, I. D., E. E. Jones, *et al.* Characterization of the Menkes protein copper-binding domains and their role in copper-induced protein relocalization. **Human Molecular Genetics**, v.8, n.8, Aug, p.1473-1478. 1999.

GRIMME, S. Supramolecular Binding Thermodynamics by Dispersion-Corrected Density Functional Theory. **Chemistry-a European Journal**, v.18, n.32, Aug, p.9955-9964. 2012.

GUMINSKI, A. D., P. R. Harnett, *et al.* Scientists and clinicians test their metal-back to the future with platinum compounds. **Lancet Oncology**, v.3, n.5, May, p.312-318. 2002.

HARRACH, S. e G. Ciarimboli. Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs. **Frontiers in Pharmacology**, v.6, Apr, p.7. 2015.

HAY, P. J. e W. R. Wadt. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. **The Journal of Chemical Physics**, v.82, n.1, p.270-283. 1985.

HEERDT, G. e N. H. Morgon. Validação computacional de métodos compostos no estudo de propriedades moleculares. **Química Nova**, v.34, p.868-873. 2011.

HORIBE, S., A. Matsuda, *et al.* Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins. **Life Sciences**, v.124, Mar, p.31-40. Johnstone, T. C., K. Suntharalingam, *et al.* Third row transition metals for the treatment of cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v.373, n.2037, Mar, p.12. 2015.

JUNG, Y. W. e S. J. Lippard. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chemical Reviews**, v.107, n.5, May, p.1387-1407. 2007.

KALAYDA, G. V., C. H. Wagner, *et al.* Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. **Bmc Cancer**, v.8, Jun, p.12. 2008.

KATANO, K., A. Kondo, *et al.* Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. **Cancer Research**, v.62, n.22, Nov, p.6559-6565. 2002.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v.7, n.8, Aug, p.573-584. 2007.

KIM, B. E., K. Smith, *et al.* A conditional mutation affecting localization of the Menkes disease copper ATPase - Suppression by copper supplementation. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.46, Nov, p.44079-44084. 2002.

KOMATSU, M., T. Sumizawa, *et al.* Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. **Cancer Research**, v.60, n.5, Mar, p.1312-1316. 2000.

KRYACHKO, E. S. HOHENBERG-KOHN THEOREM. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.18, n.4, p.1029-1035. 1980.

KUO, M. T., H. H. W. Chen, *et al.* The roles of copper transporters in cisplatin resistance. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.26, n.1, Mar, p.71-83. 2007.

LAI, G. M., R. F. Ozols, *et al.* ENHANCED DNA-REPAIR AND RESISTANCE TO CISPLATIN IN HUMAN OVARIAN-CANCER. **Biochemical Pharmacology**, v.37, n.24, Dec, p.4597-4600. 1988.

LEAL, R. G. C., J. M. Moita Neto, *et al.* A Química Quântica na compreensão de teorias de Química Orgânica. **Química Nova**, v.33, p.1211-1215. 2011.

LEVINE, I. N. **Quantum Chemistry**. New Jersey. 1991

LOPES, J. F., V. S. D. Menezes, *et al.* Monte Carlo simulation of cisplatin molecule in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v.110, n.24, Jun, p.12047-12054. 2006.

LUTSENKO, S., N. L. Barnes, *et al.* Function and regulation of human copper-transporting ATPases. **Physiological Reviews**, v.87, n.3, Jul, p.1011-1046. 2007.

Maeda, S., Y. Harabuchi, *et al.* Intrinsic Reaction Coordinate: Calculation, Bifurcation, and Automated Search. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.115, n.5, Mar, p.258-269.

MAPARA, M. Y. e M. Sykes. Tolerance and cancer: Mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. **Journal of Clinical Oncology**, v.22, n.6, Mar, p.1136-1151. 2004.

MARQUES, M. P. M., D. Gianolio, *et al.* A molecular view of cisplatin's mode of action: interplay with DNA bases and acquired resistance. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.17, n.7, p.5155-5171.

MILBURN, G. H. W. e M. R. Truter. CRYSTAL STRUCTURES OF CIS- AND TRANS-DICHLORODIAMMINEPLATINUM(2). **Journal of the Chemical Society a -Inorganic Physical Theoretical**, n.11, p.1609-&. 1966.

MORGON, N. H. Computação em química teórica: informações técnicas. **Química Nova**, v.24, p.676-682. 2001.

MORGON, N (Org.) ; COUTINHO, K. (Org.). **Métodos de Química Teórica e modelagem molecular**, v.1^o. 2007

OLSZEWSKI, U. e G. Hamilton. A Better Platinum-Based Anticancer Drug Yet to Come? **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.10, n.4, May, p.293-301. 2010.

ORIO, M., D. A. Pantazis, *et al.* Density functional theory. **Photosynthesis Research**, v.102, n.2-3, Dec, p.443-453. 2009.

PAVANKUMAR, P. N. V., P. Seetharamulu, *et al.* Comprehensive ab initio quantum mechanical and molecular orbital (MO) analysis of cisplatin: Structure, bonding, charge density, and vibrational frequencies. **Journal of Computational Chemistry**, v.20, n.3, Feb, p.365-382. 1999.

PERES, L. A. B. e C. J. A. D. Da. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: mecanismos moleculares. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.35, p.332-340. 2013.

PEREZ, R. P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. **European Journal of Cancer**, v.34, n.10, Sep, p.1535-1542. 1998.

PIRAUD, M., C. Vianey-Saban, *et al.* ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.17, n.12, p.1297-1311. 2003.

RAPPE, A. K., C. J. Casewit, *et al.* UFF, A FULL PERIODIC-TABLE FORCE-FIELD FOR MOLECULAR MECHANICS AND MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATIONS. **Journal of the American Chemical Society**, v.114, n.25, Dec, p.10024-10035. 1992.

ROHR, A. K., M. Hammerstad, *et al.* Tuning of Thioredoxin Redox Properties by Intramolecular Hydrogen Bonds. **Plos One**, v.8, n.7, Jul.

ROSENBERG, B., L. Vancamp, *et al.* INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. **Nature**, v.205, n.4972, p.698-&. 1965.

PLATINUM COMPOUNDS - A NEW CLASS OF POTENT ANTITUMOUR AGENTS. **Nature**, v.222, n.5191, p.385-&. 1969.

S. DAPPRICH, I. Komaromi, K.S. Byun, K. Morokuma, and M.J. Frisch (1999). **Journal of Molecular Structure**, 461-462.

SAFAEI, R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. **Cancer Letters**, v.234, n.1, Mar, p.34-39. 2006.

SAFAEI, R., A. K. Holzer, *et al.* The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.98, n.10, Oct, p.1607-1613. 2004.

SAMIMI, G., R. Safaei, *et al.* Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v.10, n.14, Jul, p.4661-4669. 2004.

SAMIMI, G., N. M. Varki, *et al.* Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v.9, n.16, Dec, p.5853-5859. 2003.

SCHMIDT, W. e S. G. Chaney. ROLE OF CARRIER LIGAND IN PLATINUM RESISTANCE OF HUMAN CARCINOMA CELL-LINES. **Cancer Research**, v.53, n.4, Feb, p.799-805. 1993.

SHEN, D. W., L. M. Pouliot, *et al.* Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. **Pharmacological Reviews**, v.64, n.3, Jul, p.706-721.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v.22, n.47, Oct, p.7265-7279. 2003.

SIEGSMUND, M. J., C. Marx, *et al.* Cisplatin-resistant bladder carcinoma cells: enhanced expression of metallothioneins. **Urological Research**, v.27, n.3, Jun, p.157-163. 1999.

SOUSA, J. A., P. P. Silva, *et al.* Application of computational chemistry methods to obtain thermodynamic data for hydrogen production from liquefied petroleum gas. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.30, p.83-93. 2013.

STEWART, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v.63, n.1, Jul, p.12-31. 2007.

SVENSSON, M., S. Humbel, *et al.* ONIOM: A multilayered integrated MO+MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels-Alder reactions and Pt(P(t-Bu)(3))(2)+H-2 oxidative addition. **Journal of Physical Chemistry**, v.100, n.50, Dec, p.19357-19363. 1996.

VALATIN, J. G. GENERALIZED HARTREE-FOCK METHOD. **Physical Review**, v.122, n.4, p.1012-&. 1961.

VESSECCHI, R., S. R. E. Galembeck, *et al.* Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, v.31, p.840-853. 2008.

VREVEN, T., K. S. Byun, *et al.* Combining quantum mechanics methods with molecular mechanics methods in ONIOM. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v.2, n.3, May, p.815-826. 2006.

WHEATE, N. J., S. Walker, *et al.* The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v.39, n.35, p.8113-8127. 2010.

WONG, E. e C. M. Giandomenico. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Chemical Reviews**, v.99, n.9, Sep, p.2451-2466. 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>> . Acesso em: 21 jul 2014.

FUNDAÇÃO DO CÂNCER. Disponível em: < <http://cancer.org.br>>. Acesso em: 25 jul 2014.

RCSB PDB. **Protein Data Bank**. Disponível em: < <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 12 dez 2014.

ZHANG, Y. K., T. S. Lee, *et al.* A pseudobond approach to combining quantum mechanical and molecular mechanical methods. **N**, v.110, n.1, Jan, p.46-54. 1999.

ZIMMERMANN, T. e J. V. Burda. Reactions of cisplatin with cysteine and methionine at constant pH; a computational study. **Dalton Transactions**, v.39, n.5, p.1295-1301.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

Participações em eventos científicos durante o período (2014-2016)

1. Estudo dos mecanismos de resistência à cisplatina. (Apresentação de pôster)
Christina Telles Borges, J. F.Lopes
I Semana Acadêmica de Química da Universidade Federal de Itajubá,
Itajubá, MG, maio de 2014
2. Análise estrutural da proteína ATP7A: livre, coordenada ao cobre e à platina. (Apresentação de pôster)
Christina Telles Borges, J.F. Lopes, S. F. Bazan
XVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, novembro de 2014
3. Estudo das interações dos modelos da proteína ATP7A no mecanismo de resistência à cisplatina
Christina Telles Borges, J. F.Lopes
XVIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica , Pirenópolis,
GO, novembro de 2015

Certificado

Certificamos que o trabalho **Análise estrutural da proteína ATP7A : livre, coordenada ao cobre e à platina**, de autoria de CHRISTINA TELLES BORGES, SELMA FABIANA BAZAN e JULIANA FEDOCE LOPES, foi apresentado, na forma de painel, no **XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, realizado no período de 10 a 12 de novembro de 2014.

Alfenas, 15 de dezembro de 2014.



ALZIRA MARIA SERPA LUCHO

COORDENADOR(A)



ANARUTEDOVALE

PRÓ-REITORA DE EXTENSÃO EM EXERCÍCIO

**Encontro Regional da Sociedade
XXVIII Brasileira de Química**
Poços de Caldas - MG | 2014

Certificado nº 20140000001742000798

<http://www.unifal-mg.edu.br/caex/certificados>



XVIII
**Simpósio Brasileiro
de Química Teórica**
22 a 25 de Novembro de 2015
sbqt-2015.net.br



Pirenópolis – (GO)- Brasil

CERTIFICADO

Certificamos que **Christina Telles Borges** apresentou o trabalho intitulado “**Estudo das interações dos modelos da proteína ATP7A no mecanismo de resistência ... cisplatina**”, na forma de pôster, no XVIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica realizado no período de 22 a 25 de novembro de 2015 em Pirenópolis – Goiás.

Kleber C. Mundim
Coordenador – SBQT 2015



Certificado



Certificamos que o trabalho Estudo dos mecanismos de resistência à cisplatina , de autoria de CHRISTINATELLES BORGES, JULIANA FEDOCE LOPES, foi apresentado, na forma de poster, na **I Semana Acadêmica de Química**, realizada de 13 a 16 de agosto de 2014, no Instituto de Física e Química da Universidade Federal de Itajubá - Unifei.

Itajubá, 08 de Dezembro de 2014

Presidente da Comissão Organizadora
Wanessa M. Alves Faria

Coordenador do Curso de Bacharelado em Química
Maurício dos Santos Silva

