



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**DISRAELI CAVALCANTE ARAUJO VASCONCELOS**

**DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE TLR1: UM ESTUDO DE DINÂMICA  
MOLECULAR E DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À PROTEÍNA**

**FORTALEZA**

**2014**

DISRAELI CAVALCANTE ARAUJO VASCONCELOS

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE TLR1: UM ESTUDO DE DINÂMICA  
MOLECULAR E DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À PROTEÍNA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. João Hermínio Martins da Silva

Coorientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- V450d Vasconcelos, Disraeli Cavalcante Araújo.  
Determinação estrutural de TLR1: um estudo de dinâmica molecular e dos polimorfismos associados à proteína / Disraeli Cavalcante Araújo Vasconcelos.– 2014.  
52f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2014.  
Orientação: Prof. Dr. João Hermínio Martins da Silva.  
Coorientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
1. Hanseníase. 2. Dinâmica molecular. 3. Polimorfismo genético. I. Título.

---

CDD 660.6

DISRAELI CAVALCANTE ARAUJO VASCONCELOS

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE TLR1: UM ESTUDO DE DINÂMICA  
MOLECULAR E DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À PROTEÍNA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. João Hermínio Martins da Silva

Coorientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva

Aprovada em 21/11/2014

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. João Hermínio Martins da Silva (Orientador)  
Fundação Oswaldo Cruz – Unidade Ceará (FIOCRUZ/CE)

---

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca  
Fundação Oswaldo Cruz – Unidade Ceará (FIOCRUZ/CE)

A Deus

Aos meus pais, Marta e Valdemir.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço ao Criador, pelo dom de minha vida e por me fortalecer na fé.

Aos meus pais, Marta e Valdemir, que nunca duvidaram de meu potencial e investiram na minha vida estudantil, sem vacilar. Obrigado pelo apoio de sempre! À minha segunda mãe, Lúcia, por toda criação e pela presença constante em minha vida. Aos meus irmãos, Marcus e Philipe, pelos incentivos e pelo companheirismo.

À minha família, de maneira geral. Aos meus avós, Izaura e Aloisio, que sempre me trataram com afeto e ternura. Aos tios e tias, em especial à tia Regina (tia Pepe 😊), obrigado pela compreensão e pelo carinho ímpar. Aos primos queridos, obrigado pelos momentos de diversão e cumplicidade.

Aos meus amigos. Todos, sem exceção, contribuíram de seu jeito para me engrandecer e me fortalecer, pessoal e profissionalmente.

Ao meu orientador e supervisor de estágio, Dr. João Hermínio, obrigado pelos conselhos e ensinamentos durante esta jornada. Acima de tudo, obrigado pela parceria, pela amizade, pelos lanches pagos 😊, pelas conversas, enfim, obrigado pelo seu zelo para comigo.

Ao meu coorientador, Prof. André, obrigado pelos ensinamentos nas diversas disciplinas ministradas. Obrigado por sua dedicação com os alunos e ao enorme apreço ao curso de Biotecnologia.

À Dra. Marcela Gambim, obrigado pelas conversas, sugestões de melhoria do trabalho e pelas dicas de Rio Preto/SP 😊.

Ao Dr. Marcos Lourenzoni, pelo contato inicial na Fiocruz e pelos valiosos conselhos na elaboração deste trabalho.

À coordenação do curso de Bacharelado em Biotecnologia da UFC e aos professores, pelo apoio e esforço que vocês tiveram comigo durante a graduação. Que vocês sejam recompensados!

À FIOCRUZ e à UFC, pela oportunidade de estágio e pelos apoios técnico, financeiro e estrutural.

Enfim, a todos que, de sua maneira, me ajudaram a concluir este trabalho.

“O segredo do sucesso é a constância do propósito.” (Benjamin Disraeli)

## RESUMO

Durante os eventos da interação de *Mycobacterium leprae* com células do hospedeiro, genes específicos são ativados e estão envolvidos na ligação de receptores capazes de reconhecer padrões, dentre eles, os TLRs (Receptores do Tipo *Toll*). Eles são aptos a modular a autofagia, regular a formação de vesículas lipídicas e promover o processo de apoptose. Sabe-se que variações sutis em genes responsáveis pelas respostas imunológicas regulam cada etapa da interação patógeno-hospedeiro. Enquanto isso, a baixa variabilidade genética de *M. leprae* sugere que a progressão da hanseníase se deve, fortemente, à genética do hospedeiro. Desse modo, é importante o conhecimento acerca dos receptores TLR1 e TLR2, que cooperam na detecção de lipopeptídios triacilados micobacterianos, e dos polimorfismos de base única associados a estas proteínas, no entendimento da hanseníase *per se* e de suas reações. Neste contexto, este trabalho objetivou entender, primeiramente, como funciona ao longo do tempo o complexo TLR1 (domínios transmembranar e intracelular) imerso em membrana biológica, além de analisar os efeitos energéticos dos polimorfismos associados, a partir da sequência de TLR1. Para isso, foi necessária a determinação estrutural do sistema, além da realização de análises após dinâmica molecular. Os efeitos das mutações foram preditos por meio de estudos realizados em programas disponíveis publicamente. Os resultados mostram a participação da alfa-hélice transmembranar de TLR1 em membrana de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina). Além disso, as análises da dinâmica demonstram que o sistema se apresentou estável durante a simulação, em vários aspectos. Os efeitos dos polimorfismos revelam que alguns deles podem desestabilizar a molécula, causando possíveis mudanças na suscetibilidade à hanseníase. Portanto, pode-se concluir que um modelo estrutural de TLR1 foi construído, assim como o processo de dinâmica molecular do sistema foi padronizado. Além disso, o efeito das mutações em TLR1 foi avaliado, conforme valores de  $\Delta\Delta G$  e, se neutras ou deletérias. Porém, novos estudos devem ser realizados, no sentido da busca de resultados mais profundos na avaliação da suscetibilidade de indivíduos portadores de hanseníase.

**Palavras-chave:** Hanseníase. TLR. Modelagem Molecular. Dinâmica Molecular. Polimorfismos de Base Única.

## ABSTRACT

During the events of *Mycobacterium leprae* interaction with host cells, specific genes are activated and are involved in the binding of receptors capable of recognizing patterns, like TLRs (Toll Like Receptors). They modulate autophagy, regulate the formation of lipid vesicles and may lead to cell apoptosis. It has been suggested that subtle variations in genes responsible for immune responses are regulating every step of the host-pathogen interaction. The low genetic variability of *M. leprae* suggests that host genetic factors may have a major influence on the progression of leprosy. Thus, it is important to know about the TLR1 and TLR2 receptors, which cooperate in the detection of mycobacterial triacylated lipopeptides, and single nucleotide polymorphisms associated with these proteins, to understand the leprosy *per se* and their reactions. In this context, this study aimed to understand, first of all, how works over time the TLR1 (transmembrane and intracellular domains) complexed with a biological membrane, and analyze the energetic effects of polymorphisms associated, from the sequence of TLR1. Therefore, it was necessary the system structural determination, and performing such analyzes after molecular dynamics. The effects of the mutations were predicted by studies in programs publicly available. The results show the participation of TLR1 alpha-helix transmembrane in a DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) membrane. Furthermore, analyzes of the molecular dynamics show that the system is stable during the simulation presented in several respects. The effects of polymorphisms reveal that some of them can destabilize the molecule, causing possible changes in susceptibility to leprosy. Therefore, one can conclude that the TLR1 structural model was constructed, as well as the process of molecular dynamics of the system was standardized. Furthermore, the effect of mutations in TLR1 was evaluated as  $\Delta\Delta G$  values and, if neutral or deleterious. But, further studies should be performed in order to look for more profound results in assessing the susceptibility of patients with leprosy.

**Keywords:** Leprosy. TLR. Molecular Modeling. Molecular Dynamics. Single Nucleotide Polymorphisms.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura geral do TLR.....	18
Figura 2 – Via de sinalização intracelular mediada por TLR1/TLR2.....	20
Figura 3 – Etapas do processo de modelagem comparativa.....	26
Figura 4 – Predições da estrutura secundária do domínio transmembranar de TLR1.....	33
Figura 5 – Estrutura do domínio transmembranar de TLR1, obtida através do método de modelagem <i>ab initio</i> .....	34
Figura 6 – Modelo tridimensional final de TLR1.....	35
Figura 7 - Modelo dos domínios transmembranar e TIR de TLR1 em DPPC.....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Energia potencial do sistema.....	37
Gráfico 2 – Temperatura do sistema.....	37
Gráfico 3 – Pressão do sistema.....	38
Gráfico 4 – RMSD de TLR1.....	39
Gráfico 5 – RMSF de TLR1.....	40
Gráfico 6 – Raio de giro de TLR1.....	41
Gráfico 7 – RDF de TLR1 (Cadeia lateral).....	42
Gráfico 8 – RDF de TLR1 (Grupamento amina).....	42
Gráfico 9 – Ligações de hidrogênio da região transmembranar de TLR1.....	43
Gráfico 10 – Estrutura secundária de TLR1.....	44
Gráfico 11 – Análise do PREDICTSNP para o polimorfismo N248S.....	46
Gráfico 12 - Análise do PREDICTSNP para os polimorfismos H305L e S602I.....	46
Gráfico 13 - Análise do PREDICTSNP para o polimorfismo P315L.....	47

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Predição dos efeitos do polimorfismo N248S em TLR1.....	45
Quadro 2 – Predição dos efeitos do polimorfismo H305L em TLR1.....	45
Quadro 3 - Predição dos efeitos do polimorfismo P315L em TLR1.....	45
Quadro 4 - Predição dos efeitos do polimorfismo S602I em TLR1.....	45

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Considerações iniciais.....	15
1.2 <i>Toll Like Receptors</i> (Receptores do Tipo <i>Toll</i> ).....	17
1.2.1 Estrutura dos TLRs.....	17
1.3 O complexo heterodimérico TLR1/TLR2.....	18
1.4 Desenvolvimento de novas drogas.....	20
1.5 Desenho de fármacos.....	21
1.6 Desenvolvimento de novas drogas baseado na sua estrutura – “Desenho racional de fármacos”.....	23
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral.....	24
2.2 Metas.....	24
3 METODOLOGIA.....	25
3.1 Modelagem molecular.....	25
3.1.1 Modelagem comparativa.....	25
3.1.2 Modelagem <i>ab initio</i> .....	27
3.1.3 Construção do modelo de TLR1.....	28
3.2 Dinâmica molecular.....	29
3.2.1 Inserção de TLR1 (Domínios transmembranar e TIR) em membrana biológica e simulação do sistema.....	31
3.3 Predição energética dos polimorfismos em TLR1.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Modelo de TLR1 inserido em membrana biológica de DPPC.....	33
4.2 Análises da dinâmica molecular de TLR1 (domínios transmembranar e TIR) em DPPC.....	36
4.2.1 Energia potencial.....	36
4.2.2 Temperatura.....	37
4.2.3 Pressão.....	38
4.2.4 RMSD.....	38
4.2.5 RMSF.....	39
4.2.6 Raio de giro.....	40
4.2.7 RDF.....	41

4.2.8	Ligações de hidrogênio.....	43
4.2.9	Estrutura secundária.....	43
4.3	Análises das predições dos efeitos dos polimorfismos de base única em TLR1.....	44
5	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações iniciais

Uma das doenças que ainda representam um grave problema de saúde pública no Brasil é a hanseníase. Trata-se de uma doença multifatorial e diversos estudos sugerem fortes influências genéticas, tanto para suscetibilidade *per se* (ficar ou não doente), quanto para os graus de gravidade da doença. Dos tipos de marcadores genéticos depositados em bancos de dados, o polimorfismo de base única (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) é o mais bem estudado, dada a sua grande abundância (mais de 15 milhões de SNPs são estimados), o padrão bialélico de apresentação e a fácil caracterização em nível populacional.

Estudos têm sido realizados, analisando-se famílias através do uso de marcadores genéticos, como os SNPs e microssatélites, em genomas. Além disso, estudos *in vitro* de expressão gênica global por microarranjos têm sugerido a participação de novos genes na susceptibilidade e gravidade em doenças infecciosas (Luo *et al.*, 2014). Esses genes são avaliados utilizando-se os mesmos marcadores genéticos em desenhos populacionais do tipo caso-controle.

Evidências demonstram que a genética do hospedeiro influencia, de modo decisivo, para a suscetibilidade às doenças infecciosas. Dados epidemiológicos mostram, em diferentes doenças, que apenas uma pequena fração dos indivíduos expostos aos respectivos agentes etiológicos desenvolve a doença (0,1% à 20%, em função da doença estudada) (Hill, 2006).

De uma maneira geral, a hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela bactéria *Mycobacterium leprae*. Porém, a hanseníase não é somente um quadro infeccioso e sim, uma doença influenciada pelos genes. Desse modo, a hanseníase representa uma condição infecciosa complexa, na qual tanto as características ambientais, como as do hospedeiro são fundamentais na determinação das causas da doença (Cooke e Hill, 2001; Moraes *et al.*, 2006).

*M. leprae* preferencialmente infecta os macrófagos residentes na pele e as células de *Schwann* dos nervos periféricos. Assim, a presença do bacilo causa uma forte resposta inflamatória, a qual pode gerar uma lesão nervosa. O grande número de diferentes manifestações clínicas da doença é contrastado com a baixa variabilidade da bactéria, sugerindo que as diferentes formas da doença são

devidas, principalmente, ao hospedeiro. Logo, o espectro clínico da hanseníase é formado por cinco diferentes manifestações, que são relacionadas fortemente à resposta imune do indivíduo infectado (Monot *et al.*, 2005; Singh e Cole, 2011).

A noção clássica de que somente fatores ambientais isolados (por exemplo, vacinação) explicam a suscetibilidade em contrair doenças infecciosas em geral, e a hanseníase em particular, está presente na literatura desde muito tempo. Porém, durante as últimas décadas, há várias pesquisas revendo esse conceito. Desse modo, os artigos científicos têm reportado as associações existentes entre genes ou regiões genômicas com a hanseníase (Alter *et al.*, 2011). Logo, a simples presença do bacilo não demonstra ser suficiente para a deflagração dos sintomas da doença (Cardoso *et al.*, 2011).

O primeiro nível de interação do *M. leprae* com as células do hospedeiro é mediado por receptores de reconhecimento de padrões, os TLRs (do inglês, *Toll Like Receptors*) e por outros receptores associados à adesão e à entrada do bacilo nas células de *Schwann* e nos macrófagos (por exemplo MRC1 e  $\alpha$ 2-laminina) (Cardoso *et al.*, 2011).

Polimorfismos genéticos, nesse estágio, podem provocar resistência por parte do hospedeiro, através da modulação de ativação pelos TLRs ou simplesmente por meio de bloqueio ou diminuição da taxa de captação dos bacilos pelas células. Assim, indivíduos suscetíveis são capazes de fagocitar o *M. leprae*, o qual conseguirá escapar dos mecanismos de defesa por morte microbiana do hospedeiro e infectar a célula (Cardoso *et al.*, 2011).

Vias bioquímicas principais e alguns genes associados à suscetibilidade à hanseníase estão sendo investigados por estarem atrelados a outras doenças imunes. Assim, cria-se uma plataforma de pesquisa da imunopatologia de doenças complexas, a fim de que se promovam novas ideias para o tratamento e para a prevenção dessas infecções. Desse modo, simulações computacionais surgem como ferramentas na geração de dados estruturais, os quais auxiliarão em estratégias de tratamento ainda não exploradas (Roy *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2002).

## 1.2 Toll Like Receptors (Receptores do Tipo Toll)

O sistema imune inato evoluiu em direção à detecção de microrganismos por meio da ajuda de um sistema de receptores sinalizadores. Uma estratégia desenvolvida é a de detectar os microrganismos infecciosos ou as células do hospedeiro danificadas, através do reconhecimento de moléculas que podem aparecer modificadas (Rast e Booth, 2011).

Os TLRs são uma conservada família de receptores de reconhecimento de padrões, expressos em muitos tipos celulares, os quais reconhecem uma variedade de produtos microbianos (Abbas *et al.*, 2012).

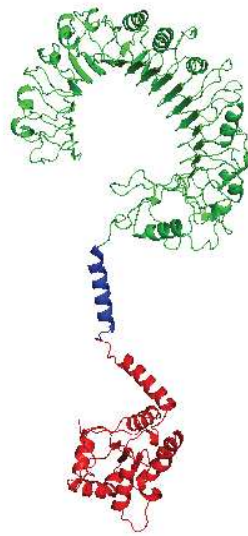
Os ligantes que são reconhecidos pelos diferentes TLRs possuem estruturas diversas e incluem produtos de várias classes de microrganismos. Dentre os ligantes bacterianos, há os lipopolissacarídeos (LPS), o ácido lipoteicóico e os constituintes das paredes celulares de gram-positivas e gram-negativas. Os vírus também podem ser reconhecidos, devido à presença de RNAs de dupla fita (Abbas *et al.*, 2012).

Os TLRs são encontrados tanto na superfície celular, como em membranas localizadas no ambiente intracelular, por exemplo, em endossomos. Logo, esses receptores são capazes de se ligar a microrganismos presentes em diversos compartimentos celulares (Rast e Booth, 2011; Abbas *et al.*, 2012).

### 1.2.1 Estrutura dos TLRs

Os TLRs são glicoproteínas integrais de membrana do tipo I, que contêm repetições ricas em leucina flanqueadas por motivos ricos em cisteína, na extremidade extracelular, os quais são responsáveis pelos sítios de ligação ao microrganismo. Na extremidade intracelular, existem domínios Toll/Interleucina-1, chamados de TIR (do inglês, *Toll/IL-1 Receptors*), os quais são responsáveis pela transdução de sinais na célula (Abbas *et al.*, 2012), como mostrado na figura 1:

**Figura 1** - Estrutura geral do TLR



Domínios do TLR:
Extracelular - <i>verde</i>
Transmembranar - <i>azul</i>
TIR (intracelular) - <i>vermelho</i>

Fonte: Autor (elaborada por meio do programa *Pymol* – Versão 1.3.0.0).

### 1.3 O complexo heterodimérico TLR1/TLR2

O complexo heterodimérico TLR1/TLR2 está presente na membrana plasmática de células de reconhecimento primário do sistema imune (Abbas *et al.*, 2012). O heterodímero é responsável pela detecção de lipoproteínas triaciladas de micobactérias (Thoma-Uszynski *et al.*, 2001).

Estudos imunológicos e genéticos do gene que codifica TLR1 revelaram que polimorfismos em determinadas regiões foram associados à hanseníase *per se* ou a reações relacionadas à doença. O alelo 602S do polimorfismo S602I está associado à proteção contra hanseníase (Hawn *et al.*, 2007). Foi demonstrado, também, que esse alelo é menos expresso na superfície da célula, causando sinalização anormal. Além disso, sua presença promove diminuição na produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF nas células mononucleares do sangue periférico estimuladas com *M. leprae*. Foi mostrado, também, que houve proteção contra o

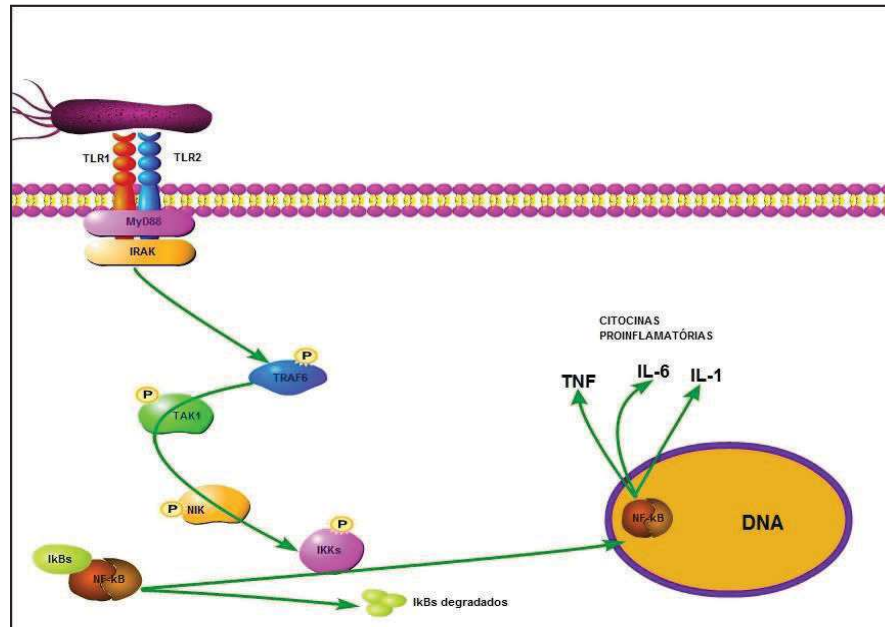
desenvolvimento de reação reversa pelo alelo 602S (Hawn *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007).

Os mecanismos exatos pelos quais esses receptores limitam a internalização e o crescimento de *M. leprae* ainda não são bem conhecidos. Desse modo, simulações computacionais representam uma possibilidade na análise das diferentes mutações já conhecidas, até hoje. O processo seria desencadeado avaliando-se o padrão de reconhecimento dos diferentes haplótipos frente a diversas lipoproteínas micobacterianas expressas por *M. leprae*.

Além do polimorfismo S602I, outras três mutações são relacionadas à susceptibilidade do hospedeiro: N248S, H305L e P315L (Marques Cde *et al.*, 2013; Omueti *et al.*, 2007). Esses defeitos estão localizados no domínio extracelular do receptor TLR1, responsável pela detecção das lipoproteínas micobacterianas. No que diz respeito ao receptor TLR2, aproximadamente 22% dos indivíduos acometidos por hanseníase revelam uma substituição do tipo R677W em TLR2, que bloqueia a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em resposta a *M. leprae* (Alcais *et al.*, 2005). Assim, pode-se afirmar que TLR2 desempenha uma importante função na resposta imuno-inflamatória mediada por lipoproteínas.

O contato de lipopeptídeos de *M. leprae* com o heterodímero TLR1/TLR2 é capaz de aumentar a conversão de provitamina D em vitamina D e, assim, ativar uma cascata de peptídeos antimicrobianos, como a catelicidina entre outros (Liu *et al.*, 2006). Desse modo, uma sinalização equivocada do sistema poderá acarretar em um bloqueio da via e, assim, favorecer a infecção, conforme mostra a figura 2. Porém, os TLRs são responsáveis também pela ativação das vias de autofagia celular, funcionando, portanto, como controladores do processo infeccioso (Delgado *et al.*, 2008). A vitamina D regula o processo de autofagia, quando células são estimuladas por lipoproteínas micobacterianas, através de TLR1/TLR2 e CD14 (Shin *et al.*, 2010):

**Figura 2** - Via de sinalização intracelular mediada por TLR1/TLR2



**Fonte:** Autor (elaborada por meio do programa *Pathway Builder Tool 2.0*).

Dessa forma, a análise estrutural de proteínas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro é de suma importância, no que diz respeito ao estudo do desenho de drogas, que são capazes de atuar como antagonistas ou agonistas, dependendo do efeito desejado. Logo, as ferramentas computacionais utilizadas no estudo do comportamento estrutural do complexo TLR1/TLR2, que interage com lipopeptídeos de *M. leprae*, são de grande valia no desenho de fármacos que possam agir bloqueando a ação do complexo e, assim, inibir a progressão da doença.

#### 1.4 Desenvolvimento de novas drogas

A alta competitividade de indústrias farmacêuticas na busca da geração de novos medicamentos fez com que a produção de fármacos para doenças menos visadas no mercado ficasse ligada às forças da economia. Atualmente, o poder de compra é o principal fator em prioridade de pesquisas, deixando de serem atendidas as necessidades de saúde da população menos favorecida.

A população de países em desenvolvimento, correspondente a cerca de 80% da população mundial, só compreende a 20% da venda de remédios no mundo. Isso é refletido no desequilíbrio entre as necessidades pessoais de certos

medicamentos e a oferta deles no mercado. Diz-se que quando não há opções terapêuticas ou quando esses tratamentos são inadequados, uma doença pode ser considerada “negligenciada” ou até mesmo “extremamente negligenciada”. Portanto, a negligência pode ser considerada uma falha de mercado ou de políticas públicas.

As doenças negligenciadas, como a hanseníase, não despertam tanto interesse em indústrias farmacêuticas baseadas em pesquisa, pelos diversos motivos citados anteriormente. Apesar disso, há pacientes com hanseníase em países desenvolvidos, como aqueles que contraem o bacilo em viagens, embora a maior parte de indivíduos portadores do microrganismo se encontre nos países menos favorecidos em termos socioeconômicos.

Tendo ciência da urgência em achar novos medicamentos para doenças negligenciadas, a aplicação de metodologias computacionais é fundamental, na busca por novos compostos, os quais tenham atividade antagonista ao *M.leprae*. No processo da busca, é necessário o uso de técnicas de modelagem molecular, que auxiliam no esclarecimento da interação receptor-ligante, responsável por desencadear a hanseníase. Desse modo, as estratégias que podem ser utilizadas são a modelagem comparativa, para a predição das estruturas dos heterodímeros formados pelos diversos haplótipos de TLR1/TLR2, além da dinâmica molecular dos complexos e posterior análise do mecanismo de interação de lipoproteínas de *M.leprae* com os heterodímeros preditos.

### **1.5 Desenho de fármacos**

A descoberta de novas drogas é um processo laboroso que demanda bastante tempo. Em média, todo o sistema de descoberta passa por uma preparação e avaliação de, aproximadamente, 10.000 compostos ao longo de 12 anos a um custo de mais de 350 milhões de dólares (Tari, 2012).

Quando as drogas já circulam no mercado, seu preço de venda, muitas vezes, não cobre os preços de custo (com um percentual de 30%, segundo dados da década de 1980) (Grabowski e Vernon, 1994) e muitos outros fármacos são retirados do mercado. Esses aspectos, combinados com o tempo de vida útil de uma patente, a competição econômica global e as leis de restrição impostas pelo governo, quanto à aprovação de drogas, têm acelerado às pesquisas, a fim de que novos compostos sejam descobertos e comercializados (Tari, 2012).

Atualmente, conhecimentos teóricos e computacionais sobre como pode ocorrer o reconhecimento receptor-ligante são de grande valia no entendimento das bases moleculares, que regem esse sistema, a fim de que a indústria farmacêutica possa planejar fármacos, com potencialidades terapêuticas úteis (Satyanarayanaojis, 2011).

O método tradicional utilizado chamado de *screening* cego é responsável pela descoberta de muitos dos protótipos de fármacos conhecidos hoje. A técnica consiste de testes diretos, seja de produtos naturais ou sintéticos, em células, modelos animais ou ensaios biológicos (Hajduk *et al.*, 2011). Estudos centrados em isolar, purificar e caracterizar princípios ativos tornam-se recorrentemente ineficazes, por inúmeros fatores. Dentre eles, estão os custos de produção que chegam a bilhões de dólares, devido à necessidade de diversos materiais biológicos para a síntese, o que torna o processo trabalhoso e ineficiente, afastando, assim, as possibilidades de investimentos pesados por parte das multinacionais farmacêuticas. Ainda que uma molécula se mostre eficaz, seu mecanismo de ação na célula é, muitas vezes, desconhecido.

Uma abordagem, que vem sendo mais utilizada e parece ser mais promissora, é o desenho racional de fármacos (do inglês, *rational drug design*), a qual compreende uma mais completa identificação molecular da interação receptor-ligante, envolvendo simulações computacionais que analisam as estruturas tridimensionais dos compostos envolvidos (Mavromoustakos, 2011). Essas análises de visualização molecular, o uso da modelagem por dinâmica molecular, por exemplo, além de novos métodos que visam a construção de ligantes através de fragmentos moleculares menores (do inglês, *de novo ligand design*) e metodologias de *docking* molecular (Lengauer e Rarey, 1996) são alguns dos possíveis meios para que novos compostos protótipos possam ser planejados e idealizados.

O ramo de desenvolvimento de fármacos é estratégico em todo planeta e novos avanços em tecnologia nessa área representam muitas perspectivas econômicas aos diversos países do mundo. Assim, com investimentos nesse setor, há a possibilidade de que diminuam-se os gastos com importação de medicamentos de alto custo e, dessa forma, propicia-se o desenvolvimento de medicamentos nacionais especializados no combate às doenças negligenciadas.

## **1.6 Desenvolvimento de novas drogas baseado na sua estrutura – “Desenho racional de fármacos”**

As deficiências existentes na descoberta de novos fármacos pelo método tradicional, bem como o fascínio pela abordagem mais determinística no combate às doenças, levaram ao conceito de desenho racional de fármacos (Kuntz, 1992).

Termos como “mecanicista” ou “baseado na estrutura” são mais apropriados ao novo conceito, pois o termo “racional” daria uma noção de que a abordagem tradicional do desenvolvimento de novos compostos seria, dessa forma, “irracional”.

O primeiro passo a ser tomado em busca do objetivo principal é a identificação de uma molécula alvo, a qual esteja relacionada ao processo infeccioso da doença ou ao patógeno. De forma ideal, tal composto tem de ser único ao processo patológico. A respeito disso, doenças infecciosas são cada vez mais exploradas para o entendimento de novas rotas metabólicas (Cohen, 1977). Conhecendo-se o alvo, deve-se prosseguir a uma adaptação na aplicação dos postulados de Koch, já que uma inibição específica da molécula alvo ou uma mutação que inative seu gene podem acarretar em uma reversão do processo, levando a uma fisiologia considerada normal ou a um fenótipo avirulento.

O próximo passo segue na direção do conhecimento da estrutura do composto alvo. A validade do método de desenho racional de fármacos se dá na busca por uma estrutura de alta resolução, aprofundando-se nos detalhes, a fim de que haja seletividade na varredura de protótipos. Normalmente, este é um grande entrave na continuidade do processo. Porém, com o avanço da biologia molecular e da biofísica, surgiram novas tecnologias para a predição das estruturas de biomoléculas de forma mais acurada. Logo, a cristalografia de raios-X, a espectroscopia por ressonância magnética nuclear, além dos novos métodos computacionais são determinantes no sentido de facilitar a análise tridimensional de biomoléculas, permitindo a superação de antigos dificuldades técnicas, fazendo com que as pesquisas avancem em direção a descobertas de novos protótipos, capazes de combater doenças infecciosas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Analisar temporalmente o sistema TLR1 imerso em membrana biológica de DPPC, assim como os efeitos energéticos dos principais polimorfismos associados à proteína, na avaliação da suscetibilidade de pacientes com hanseníase.

### **2.2 Metas**

- Determinar a estrutura do complexo heterodimérico TLR1/TLR2;
- Analisar o efeito de polimorfismos de base única associados ao complexo, a partir de sua estrutura primária;
- Padronizar a aplicação do método de dinâmica molecular para o sistema em estudo.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Modelagem molecular

#### 3.1.1 Modelagem comparativa

A predição de estruturas de proteínas a partir de uma sequência de aminoácidos prévia tem se tornado um dos maiores desafios que a biologia estrutural computacional enfrenta e enfrentará ao passar dos anos (Skolnick *et al.*, 2000; Baker e Sali, 2001).

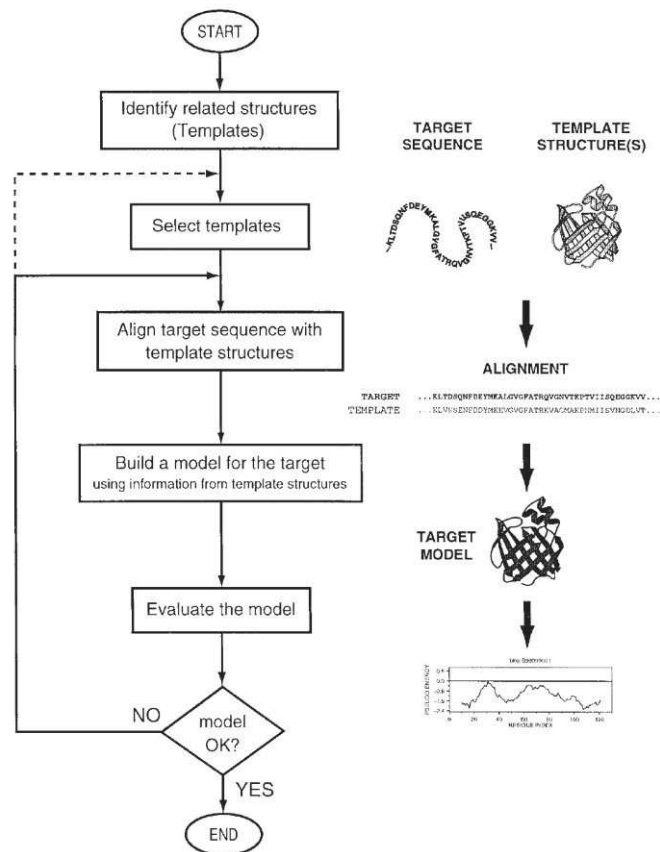
Historicamente, a predição de estruturas proteicas é classificada em três grupos: 1º) Modelagem Comparativa; 2º) *Threading*; 3º) Predição *Ab Initio*.

Desse modo, a técnica da modelagem comparativa refere-se à predição estrutural de moléculas, as quais não possuem sua estrutura depositada em banco de dados. Desse modo, a modelagem comparativa de proteínas é utilizada através da estrutura primária da biomolécula, técnica chamada também de modelagem por homologia. Trata-se de um método empírico, baseado no alinhamento feito entre a sequência de aminoácidos da proteína a ser modelada e a sequência da proteína molde (do inglês, *template*), a qual deve ser relacionada à anterior evolutivamente, isto é, são homólogas (Sali e Blundell, 1993; Fiser *et al.*, 2000). Além disso, a proteína molde deve possuir sua estrutura tridimensional resolvida experimentalmente e depositada em um banco de dados. Geralmente o escolhido é o *Protein Data Bank* (PDB) (Berman *et al.*, 2000).

Por meio de estudos da comparação entre estruturas proteicas homólogas, foi provado que pequenas mudanças na sequência dessas proteínas remetem a mudanças na estrutura tridimensional e, através de estimativas obtidas por meio da análise das estruturas depositadas no PDB, a diversidade estrutural é bastante relevante, girando em torno de milhares de tipos diferentes (Sali e Blundell, 1993). As estruturas tridimensionais de proteínas em uma família são mais conservadas que suas próprias sequências (Lesk e Chothia, 1980). Além disso, se houvesse semelhança nas sequências de duas proteínas, poderia-se inferir que existiriam similaridades estruturais entre elas. Por outro lado, caso não houvesse similaridade nas estruturas primárias de duas proteínas, mesmo assim, elas poderiam assumir certas semelhanças em suas estruturas tridimensionais. Todo o

processo de predição estrutural de proteínas utilizando a técnica de modelagem comparativa é realizado por meio de quatro etapas: 1<sup>a</sup>) identificação de referências; 2<sup>a</sup>) alinhamento entre as sequências; 3<sup>a</sup>) construção do modelo e 4<sup>a</sup>) validação do modelo. A figura 3 retrata bem o processo:

**Figura 3** - Etapas do processo de modelagem comparativa



**Fonte:** Marti-Renom *et al.*, 2000.

O texto abaixo descreve todas as etapas do processo.

A primeira etapa, de identificação de referências, é realizada através do uso de ferramentas de bioinformática, as quais se utilizam de alguns algoritmos que permitem ao usuário fazer buscas em banco de dados e, desse modo, identificar proteínas que sejam similares evolutivamente e, assim, serem usadas como referência. Após esse período, deve-se realizar o melhor alinhamento possível entre a sequência da proteína a ser modelada e a sequência ou sequências da proteína molde. Esses alinhamentos construídos visam encontrar relações evolutivas entre as sequências, por meio da elaboração de alinhamentos locais entre elas. Após o

algoritmo de alinhamento entre as referências ter sido montado, a sequência a ser modelada, então, é alinhada a seu molde. Trata-se de uma fase bastante importante na modelagem comparativa, já que os modelos a serem formados possuem informação contida no alinhamento.

O método mais confiável na predição dos modelos por meio da técnica de modelagem comparativa é usado no programa MODELLER (Marti-Renom *et al.*, 2000), o qual se utiliza da satisfação das restrições espaciais, promovendo distâncias geométricas e técnicas de otimização para satisfazer as restrições espaciais contidas nas sequências proteicas de referência, dados obtidos através das informações presentes no alinhamento já realizado.

Por último, a validação dos modelos construídos, feita por diferentes programas, como o PROCHECK, possui dois objetivos básicos: o primeiro é referente à avaliação da qualidade do modelo, verificando, assim, a precisão de sua estrutura tridimensional e avaliando sua possível utilização, o segundo objetivo diz respeito à identificação de possíveis erros na estrutura tridimensional do modelo, que pode ser resultante de atos falhos na escolha das sequências moldes ou na formulação do alinhamento.

### **3.1.2 Modelagem *ab initio***

A técnica de modelagem *ab initio* consiste no princípio de que a construção de modelos 3D de moléculas é realizada sem que haja a necessidade de se utilizar uma estrutura molde (Koehl e Levitt, 1999). Trata-se da categoria mais complicada de se obter sucesso em predição de modelos proteicos (Fetrow *et al.*, 2002).

Assume-se que, no caso de modelagem *ab initio* de proteínas, dada uma sequência dessas biomoléculas, sua conformação tende a se aproximar do seu estado nativo ou ainda, um conjunto de conformações que se aproximam ou alcançam o estado de energia mínima global (Bonneau e Baker, 2001). Porém, o método não é tão simples de ser executado. Isso porque a tentativa de se encontrar estruturas nativas ou que se aproximem delas, a partir de uma dada sequência, é dividida em dois problemas: 1º) desenvolvimento de um potencial acurado e 2º) desenvolvimento de um protocolo eficiente, a fim de que se alcance o valor da energia resultante.

As aplicações da predição de estruturas por modelagem *ab initio* são bastante significativas. Três áreas principais possuem aplicações dessa técnica: anotação de janelas abertas de leitura (ORFs), do inglês *Open Reading Frames*, ou de genes com função e estrutura desconhecidos; elaboração e extensão de modelos baseados em homologia e a rápida geração de estruturas construídas a partir de dados estruturais de baixa resolução.

Um dos servidores mais utilizados na predição de estruturas secundárias de proteínas pelo método *ab initio* é o I-TASSER (ou *Zhang-Server*). Este servidor prediz modelos proteicos, por meio de um algoritmo computacional, que revela o enovelamento correto das moléculas, chamado de PPA (do inglês, *Profile-Profile Alignment*), além da implementação da iteratividade do programa TASSER (do inglês, *Threading Assembly Refinement*) (Zhang, 2008).

### 3.1.3 Construção do modelo de TLR1

A proteína TLR1 é uma molécula de difícil cristalização pelas técnicas atuais. Isso porque trata-se de uma proteína integral de membrana. Desse modo, sua estrutura teve de ser elaborada através de técnicas de modelagem molecular. Sua porção extracelular foi obtida por meio do depósito da estrutura no banco de dados PDB, cujo código é 2Z7X. O domínio intracelular, conhecido por conter proteínas do tipo TIR, foi encontrado também no PDB, com código 1FYV. Já a porção transmembranar não há depósitos incluídos no banco de dados PDB. Assim, seu modelo foi obtido usando a técnica de modelagem *ab initio*, através do uso do programa I-TASSER, segundo metodologia elucidada por Zhang, 2008, verificando a predição da estrutura secundária e a acessibilidade ao solvente. Os três domínios, que compõem a estrutura de TLR1, foram conectados, segundo a técnica de satisfação das restrições espaciais a partir de um alinhamento múltiplo global das sequências, com o auxílio do programa MODELLER 9.12.

Foram analisadas, também, as predições das estruturas secundárias de TLR1, visando o domínio transmembranar, em diversos servidores *online* e foram comparadas as informações obtidas com os dados depositados no banco de domínio público UniProtKB, cujo código analisado é Q15399. Os servidores escolhidos para a predição da estrutura secundária de TLR1 foram os seguintes: JPRED3 e PSIPRED, além do resultado obtido com a ajuda do programa I-TASSER.

### 3.2 Dinâmica molecular

Os primeiros estudos com dinâmica molecular datam do século XX, mais precisamente em 1977 quando McCammon e colaboradores estudaram o inibidor de tripsina pancreática bovina (Mccammon *et al.*, 1977). A partir desse ponto, tornou-se possível um maior aprofundamento por parte de pesquisadores em sistemas que representavam maior complexidade. Isso se deu graças ao advento da tecnologia de novos computadores, muito mais potentes e velozes, que, então, compilavam algoritmos mais facilmente.

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica de simulação computacional usada para estudar o comportamento de sistemas moleculares ao longo do tempo. O método utiliza-se de um campo de forças clássico, o qual descreve parâmetros ligados, não ligados e não físicos das moléculas, segundo resolução numérica das equações de mecânica clássica newtoniana (Leach, 2001).

O que se chama por campo de força, genericamente, pode ser atribuído à descrição de um sistema de muitas partículas pela sobreposição de termos simples. No caso do tratamento de sistemas que possuem centenas de milhares de átomos, como para proteínas ou ácidos nucleicos, são adotadas funções potenciais empíricas, as quais são determinadas e calibradas por meio de informações experimentais ou através de cálculos quânticos sobre pequenas moléculas (Leach, 2001).

No cálculo da função energia potencial para um sistema constituído por  $N$  átomos, o método procede calculando, entre os pares de átomos, a partir de somatórios de termos como o potencial de Hooke, termos harmônicos, torcionais, eletrostáticos e de van der Waals, sendo que vários campos de forças usados em DM (GROMOS, AMBER, CHARMM etc) adotam a mesma forma funcional, segundo a equação abaixo:

### Equação 1:

$$V(\{r_i\}) = \sum_{n=1}^{Nb} \frac{1}{2} K_{bn} (b_n - b_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N\theta} \frac{1}{2} K_{\theta n} (\theta_n - \theta_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N\xi} \frac{1}{2} K_{\xi n} (\xi_n - \xi_{0n})^2 + \\ + \sum_{n=1}^{N\varphi} \frac{1}{2} K_{\varphi n} [1 + \cos(n_n \varphi_n - \delta_n)] + \sum_{i < j}^{N_{at}} \left[ \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{C_{12}(i, j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i, j)}{r_{ij}^6} \right]$$

Desmembrando a equação 1, temos que os quatro primeiros termos se referem a parâmetros de interação entre átomos ligados, por exemplo, comprimento de ligação, ângulo de ligação e ângulos diedrais impróprios e próprios, respectivamente. Os dois últimos termos, correspondentes, respectivamente, aos potenciais de van der Waals e eletrostático de Coulomb, estão relacionados a interações de longo alcance, onde os átomos não estão ligados entre si. A constante dielétrica do meio é dada pelo valor do parâmetro  $\epsilon$ , a carga parcial atômica no átomo  $i$  é indicada pelo valor de  $q_i$  e a distância entre dois átomos  $i$  e  $j$  é dada por  $r_{ij}$ .

A solução numérica das equações de movimento de Newton em DM, obtida por meio das coordenadas e das velocidades iniciais, para o movimento de cada átomo submetido ao campo de força, é conseguida através de um algoritmo computacional. Esses programas se baseiam na resolução das equações newtonianas, através de uma expansão em série de potenciais da posição de cada partícula, considerando cada uma em relação a um incremento no tempo  $\delta t$  (Allen e Tildesley, 1987).

Os estudos com DM abrem a possibilidade de análises mais profundas em sistemas de macromoléculas complexadas com outras menores, que são os substratos. Assim, temos como saber mais a fundo as interações entre esses complexos em escala microscópica em ao decorrer do tempo em escalas de nanossegundos.

Desse modo, através de tal metodologia, simula-se o comportamento dinâmico de moléculas, com o acompanhamento de sua evolução temporal e a determinação de outras propriedades fundamentais, tais como os comportamentos estrutural e termodinâmico (Schlick, 2010).

As análises realizadas, neste trabalho, com DM foram obtidas por meio do uso do programa GROMACS, cuja eficiência já foi demonstrada (Van Der Spoel *et al.*, 2005) por vários artigos científicos internacionais.

### **3.2.1 Inserção de TLR1 (Domínios transmembranar e TIR) em membrana biológica e simulação do sistema**

Para análises de DM, foi utilizado o sistema composto pelos domínios transmembranar e TIR de TLR1, segundo orientação da alfa-hélice transmembranar em membrana biológica de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

O campo de força aplicado às moléculas foi o GROMOS96 53 A6, o qual inclui os parâmetros proteicos para a simulação, por exemplo, as interações ligadas e não ligadas. Desse modo, como há a presença de moléculas lipídicas no sistema em estudo, havia a necessidade da inclusão de outros parâmetros ao campo de força. Assim, eles são chamados de “Lipídios de Berger”, em alusão aos seus desenvolvedores (Berger *et al.*, 1997). Portanto, os parâmetros da simulação permanecem completos, envolvendo os proteicos e os lipídicos.

Inicialmente, foi ajustada a posição da alfa-hélice transmembranar em relação ao centro geométrico da membrana, em seguida, a proteína foi inserida nos lipídios componentes da membrana, de acordo com as ferramentas do pacote computacional GROMACS versão 4.6.5, entre elas o programa *g\_membed*. Por último, foram adicionados íons neutralizantes de carga da proteína e o sistema foi, então, solvatado.

Nas análises de DM, foi obtido o *setup* que correspondia ao sistema proteico com restrições de posições nos carbonos componentes das regiões polares dos lipídios da membrana. Para este *setup*, o sistema foi minimizado e equilibrado, a partir de curta fase com volume constante, seguido de longa fase com pressão constante e, então, a fase de produção da dinâmica foi iniciada ao longo de 50 ns de simulação.

Após esse período, foram produzidos dados inerentes à simulação, que foram posteriormente analisados.

### 3.3 Predição energética dos polimorfismos em TLR1

Foram determinados quatro polimorfismos (N248S, H305L, P315L e S602I) já citados na literatura, a fim de que se pudesse analisar seus efeitos em TLR1, a partir de sua estrutura primária, segundo alguns critérios, a saber: 1º) estabilidade, medida por meio do valor de  $\Delta\Delta G$ ; 2º) se a troca do aminoácido traria efeitos neutros ou deletérios à variante proteica.

Para tanto, foram selecionados três servidores *online* de predição dos efeitos energéticos das mutações em TLR1, a partir da sequência da proteína. Os programas escolhidos foram: DUET, MUPRO e PREDICTSNP. O último representa um consenso entre mais seis outros servidores. Cada programa se utiliza de algumas ferramentas computacionais específicas, a fim de que haja a produção do resultado desejado.

O primeiro servidor, DUET, prediz a mudança na estabilidade proteica ( $\Delta\Delta G$ ), através de duas ferramentas distintas: SDM e mCSM. SDM é uma função estatística de energia potencial (Topham *et al.*, 1997) que prevê a estabilidade proteica a partir de polimorfismos de base única e mCSM é um modelo preditivo construído baseado em desenhos gráficos, o qual representa regiões tridimensionais de uma proteína (Pires *et al.*, 2014).

O programa MUPRO consegue fazer a predição energética do efeito do polimorfismo, a partir de uma ferramenta computacional chamada, do inglês, de método *Machine Learning* (tradução livre, Aprendizado de Máquina), baseado em *Support-Vectors Machines* (SVMs). Esta técnica, que é uma subárea da Computação e da Estatística, concentra-se no estudo de sistemas que, a partir da análise de um conjunto de dados, ele consegue passar ao usuário um resultado específico, seguindo apenas algoritmos compilados (Cheng *et al.*, 2006).

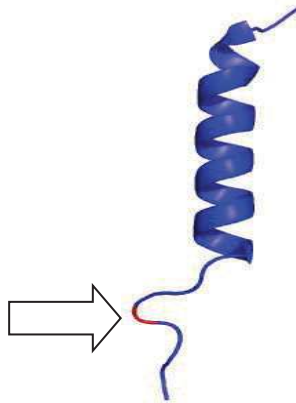
O último servidor, PREDICTSNP, o qual é um consenso obtido por meio dos resultados fornecidos por outros seis programas a saber: MAPP, PHD-SNP, POLYPHEN-1, POLYPHEN-2, SIFT e SNAP, baseia-se em parâmetros derivados de características evolutivas, físico-químicas e estruturais das moléculas, a fim de que o polimorfismo estudado seja classificado como neutro ou deletério à biomolécula (Bendl *et al.*, 2014). Mais uma vez, estes programas utilizam-se de métodos *Machine Learning* na divulgação de seus resultados.



O consenso da região transmembranar foi obtido segundo comparação com o banco de dados UniProtKB, com o código Q15399. Assim, a sequência definida ficou sendo a seguinte: LLIVTIVATMLVLA VTVSLC, compreendendo vinte e um aminoácidos.

Conclui-se que o domínio transmembranar de TLR1 é predominantemente formado por uma alfa-hélice curta, flanqueada, nas duas extremidades por estruturas de alças (figura 5). A superior se liga ao domínio extracelular e a inferior se liga ao domínio TIR ou intracelular. Esta conclusão é endossada pela estrutura modelada, a partir da técnica de modelagem *ab initio*, com a ajuda do programa I-TASSER, mostrada na figura abaixo:

**Figura 5** – Estrutura do domínio transmembranar de TLR1, obtida através do método de modelagem *ab initio*

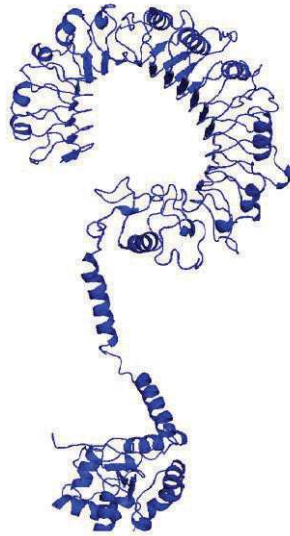


**Fonte:** Autor (elaborada por meio do programa *Pymol* – Versão 1.3.0.0).

Estrutura obtida no servidor I-TASSER. A seta indica a região do polimorfismo de base única S602I.

A montagem da estrutura final de TLR1, contemplando os três domínios, pode ser observada na imagem localizada abaixo, onde, com o auxílio do programa MODELLER 9.12, por meio da técnica de satisfação das restrições espaciais, foi possível modelá-la, a partir de um alinhamento múltiplo global entre as sequências das regiões extracelular (2Z7X), intracelular (1FYV) e a melhor estrutura obtida pelo I-TASSER, conforme mostra a figura 6:

**Figura 6** – Modelo tridimensional final de TLR1



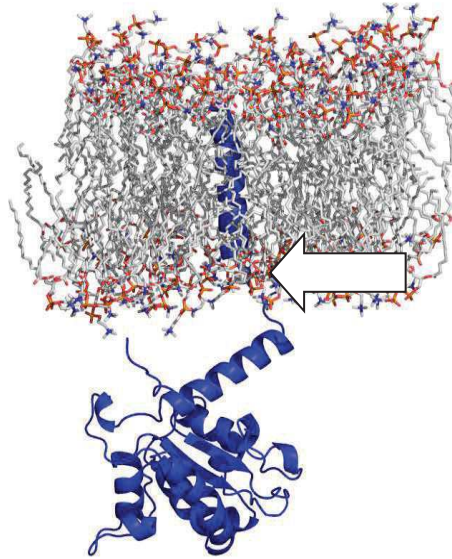
**Fonte:** Autor (elaborada por meio do programa *Pymol* – Versão 1.3.0.0).

Modelo montado no programa MODELLER 9.12.

O polimorfismo S602I presente em TLR1, já relatado na literatura, representa um dos focos de estudo deste trabalho, principalmente quando da avaliação do efeito da presença do aminoácido serina, na padronização do método de dinâmica molecular do sistema composto por TLR1 junto com membrana biológica de DPPC.

Estima-se, pela análise da estrutura acima, que a mutação se localiza na alça inferior da alfa-hélice transmembranar, já no primeiro aminoácido do domínio TIR (serina), onde há uma troca pelo aminoácido isoleucina. Esta região se encontra bem próxima à cabeça polar dos fosfolipídios componentes da membrana de DPPC. Este resultado pode ser confirmado verificando a figura 7, onde a seta indica, em localização razoável, a posição da serina 602. Nas análises realizadas após o processo de dinâmica molecular do sistema, poder-se-á observar com maior riqueza de detalhes outras características físico-químicas desta região específica do polimorfismo estudado.

**Figura 7** – Modelo dos domínios transmembranar e TIR de TLR1 em DPPC

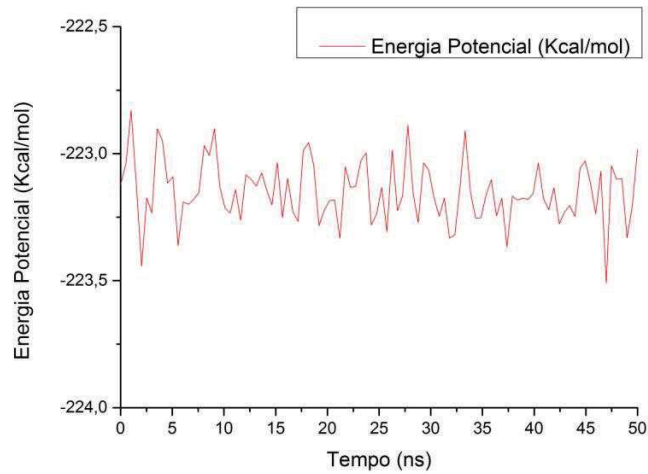


**Fonte:** Autor (elaborada por meio do programa *Pymol* – Versão 1.3.0.0)

## **4.2 Análises da dinâmica molecular de TLR1 (domínios transmembranar e TIR) em DPPC**

### **4.2.1 Energia potencial**

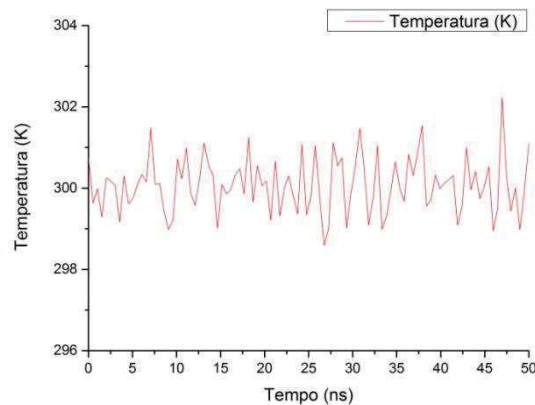
Na análise da energia potencial do sistema, observa-se, no gráfico 1, uma estabilização no valor próximo a -223 kcal/mol. Seu valor negativo indica um resultado esperado, já que as reações naturais convergem a um mínimo de energia, possibilitando um melhor arranjo geométrico entre os átomos componentes das moléculas e, desse modo, possibilitando a formação de ligações estáveis e sem impedimento estérico. Além disso, o gráfico interpolado mostrado abaixo, tende a variar muito pouco seu valor de energia potencial (-222,2 à -223,5 kcal/mol) e se manter relativamente constante, o que reflete a estabilidade do sistema em questão:

**Gráfico 1 – Energia potencial do sistema**

**Fonte:** Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

#### 4.2.2 Temperatura

A temperatura do sistema se manteve bastante estável ao longo da simulação e, após a equilibração NPT, isto é, fase designada por tratamentos com número de partículas constante, pressão constante e temperatura constante, seu valor tendeu a oscilar em torno de 300K (gráfico 2). Este número é condizente aos valores pretendidos, quando do processo de dinâmica molecular de sistemas biológicos:

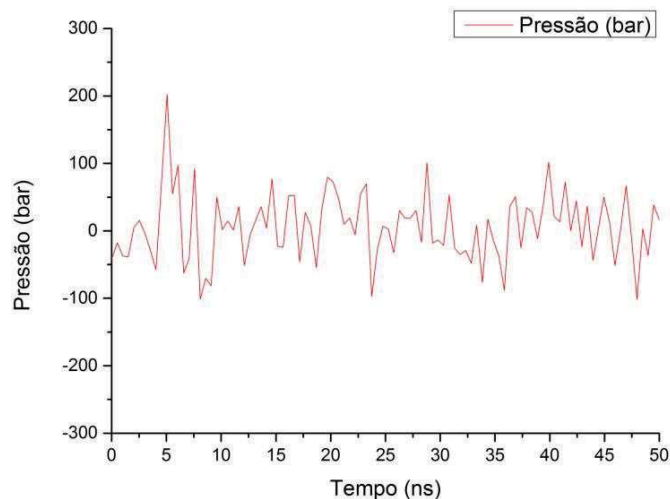
**Gráfico 2 – Temperatura do sistema**

**Fonte:** Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

### 4.2.3 Pressão

A pressão representa outro parâmetro fundamental, no que diz respeito à estabilidade dos sistemas biológicos. Mais uma vez, o sistema em estudo tende a apresentar valores constantes para a pressão, ao longo dos 50 ns de simulação (gráfico 3). Este valor oscila em torno de 1 bar, que corresponde à pressão de uma atmosfera (1 atm). O gráfico apresenta alguns poucos picos, demonstrando o aumento ou a diminuição da pressão pela alternância de valores na temperatura. Isto evidencia o mecanismo natural de compensação:

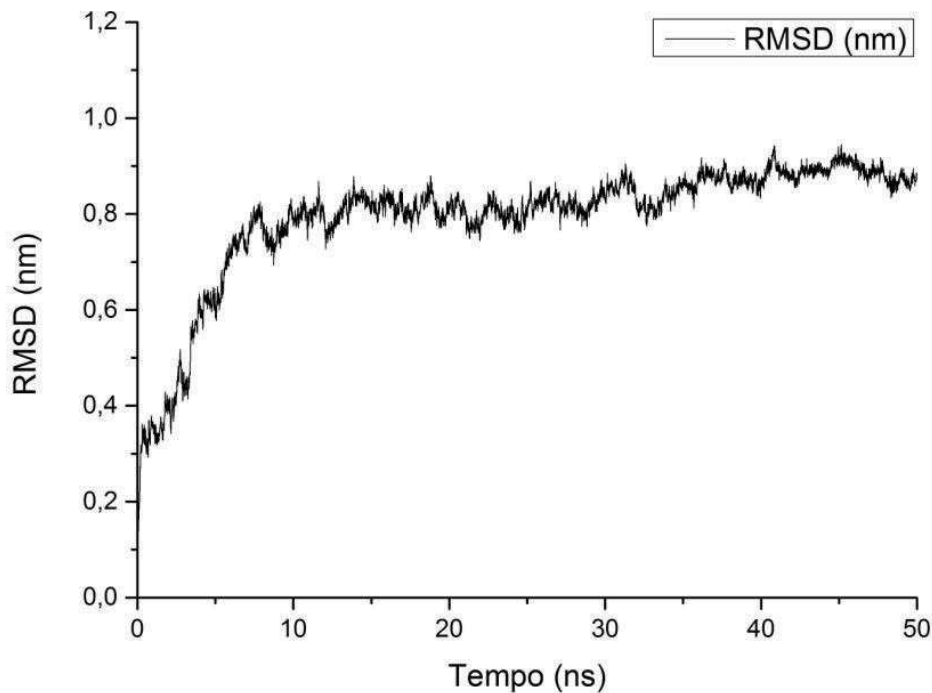
**Gráfico 3** – Pressão do sistema



**Fonte:** Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

### 4.2.4 RMSD

O RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*) designa o valor do desvio da raiz quadrada da média, sendo, portanto, um cálculo da variação do erro. Desse modo, o RMSD fornece o valor médio das distâncias entre os átomos, os quais, no caso deste trabalho, pertencem à cadeia peptídica de TLR1. O ideal é que este valor, ao longo da dinâmica, se estabilize, indicando a constância da distância entre os átomos ao longo da simulação e, logo, a estabilidade estrutural da molécula. No caso do sistema em estudo, o RMSD tendeu a se estabilizar em 0,8 nm (gráfico 4):

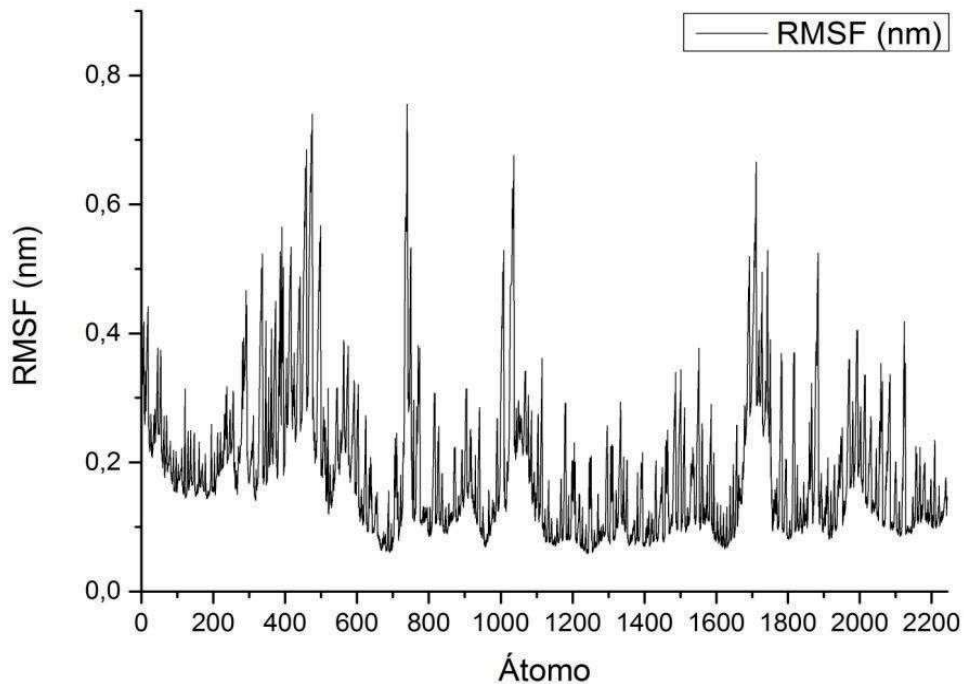
**Gráfico 4 – RMSD de TLR1**

Fonte: Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

#### 4.2.5 RMSF

O RMSF (do inglês, *Root Mean Square Fluctuation*) refere-se à flutuação da raiz quadrada da média. Diferentemente do RMSD, o RMSF designa valores que oscilam e apresentam picos em determinados átomos correspondentes a certos resíduos de aminoácidos da proteína em questão. Além disso, a média do valor de RMSF é tomada ao longo do tempo, e é designado um valor para cada partícula (átomo). Enquanto que o RMSD, a média é definida tomando por base as partículas, por meio de valores temporais bem definidos.

O RMSF é calculado, muitas vezes, para proteínas globulares as quais alternam sua estrutura frequentemente e, portanto, apresentam flutuações para valores da média da distância entre seus átomos. Neste trabalho, o RMSF apresenta picos expressivos em torno dos átomos 500, 700, 1000 e 1700. Os maiores números se aproximam de 0,8 nm, que designa o valor da média da distância entre os átomos da cadeia peptídica de TLR1, calculado através do RMSD (gráfico 5):

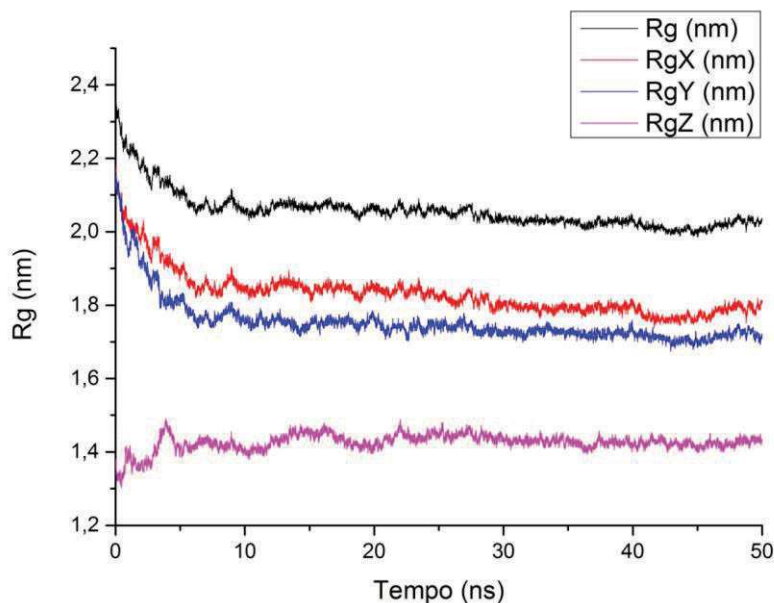
**Gráfico 5 – RMSF de TLR1**

**Fonte:** Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

#### 4.2.6 Raio de giro

O raio de giro de uma proteína define o quão compacta ela é, ou seja, se a cadeia polipeptídica está perdendo seu enovelamento natural (do inglês, *foldings*) ou não. O raio de giro de uma molécula é calculado através da distância da raiz quadrada da média entre seu centro de gravidade e suas terminações. Assim, o ideal é que proteínas estudadas por dinâmica molecular apresentem valores constantes de raio de giro, indicativos de que seu enovelamento está se mantendo.

O gráfico gerado apresenta os raios de giro global e aqueles dos eixos X, Y e Z (gráfico 6). Tomado por base os valores globais, a partir de 5 ns de simulação, percebe-se uma tendência à estabilidade numérica em torno de 2,1 nm, logo, a proteína em questão mantém seu *foldings* de 5 ns adiante. Como foram aplicadas restrições de posições aos átomos de carbono componentes das cabeças polares dos fosfolípídios de DPPC, percebe-se também um comportamento quase linear do raio de giro global, dado pela limitação ao movimento dos átomos:

**Gráfico 6** – Raio de giro de TLR1

**Fonte:** Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

#### 4.2.7 RDF

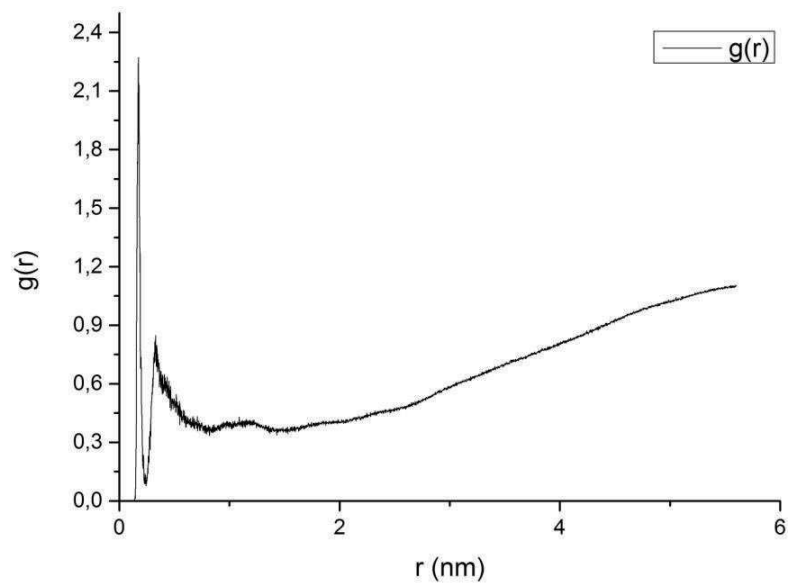
A RDF (do inglês, *Radial Distribution Function*) é uma fórmula matemática que indica o quanto a densidade da matéria circundante pode variar em torno de um ponto determinado. É uma medida das correlações existentes na distribuição das moléculas, relativamente a um ponto escolhido, tomando por base a força que elas exercem umas nas outras.

Nesta etapa, foram analisados dois gráficos de RDF: o primeiro, verificando a função do átomo de hidrogênio da hidroxila presente na cadeia lateral da serina 602 de TLR1 em relação a um dos átomos de oxigênio da água (gráfico 7) e o segundo, analisando um dos átomos de hidrogênio do grupamento amina do mesmo aminoácido, da mesma proteína, em relação ao mesmo referencial (gráfico 8). Assim, foi possível constatar a probabilidade da distribuição das moléculas de água, em torno da serina 602 e verificar em qual região o valor seria maior: se na cadeia lateral ou no grupamento amina.

A comparação entre os dois gráficos permite a conclusão de que há uma maior distribuição das moléculas de água em volta do hidrogênio pertencente à hidroxila da cadeia lateral, em relação ao do grupamento amina (maior pico verificado, a partir de um raio de corte mínimo). Isto se deve à maior capacidade da

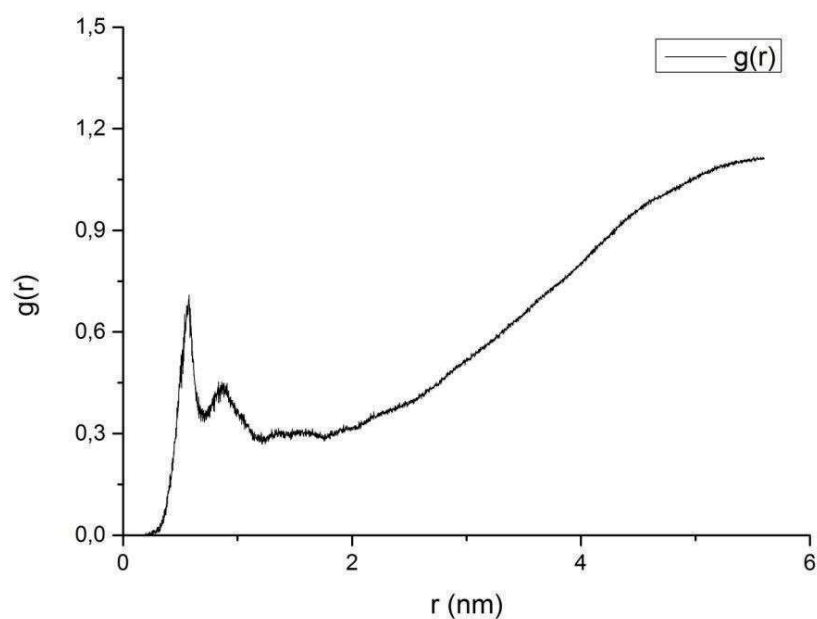
cadeia lateral de realizar ligações de hidrogênio, mesmo a serina 602 de TLR1 estando não tão exposta às moléculas do solvente, mas sim, próxima às regiões polares dos fosfolipídios de DPPC:

**Gráfico 7** – RDF de TLR1 (Cadeia lateral)



Fonte: Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

**Gráfico 8** – RDF de TLR1 (Grupamento amina)

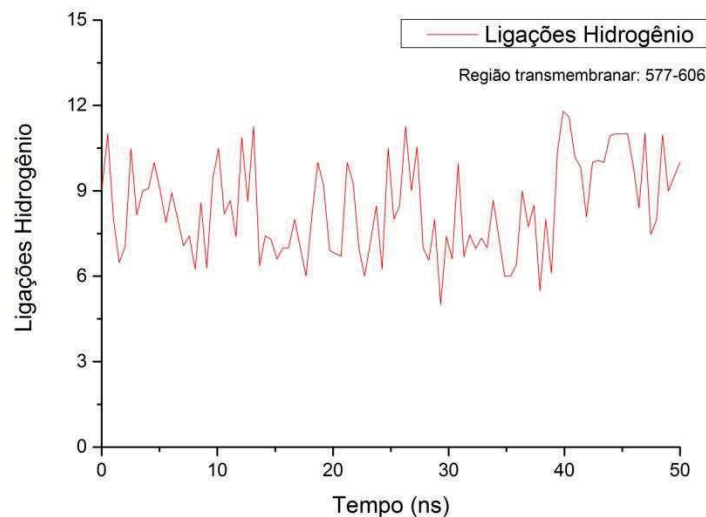


Fonte: Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

#### 4.2.8 Ligações de hidrogênio

As ligações de hidrogênio são interações que ocorrem, na mesma molécula ou entre moléculas, através de um átomo de hidrogênio e outros átomos eletronegativos, como oxigênio, nitrogênio e flúor. Em DM, o número de ligações de hidrogênio está efetivamente relacionado à interação com o solvente. Nesta etapa, foram verificadas as ligações de hidrogênio ao longo de 50 ns de simulação formadas pela região transmembranar de TLR1, compreendendo trinta aminoácidos. O resultado sugere um número relativamente baixo de interações, dada a quantidade de aminoácidos apolares presentes na região estudada:

**Gráfico 9** – Ligações de hidrogênio da região transmembranar de TLR1



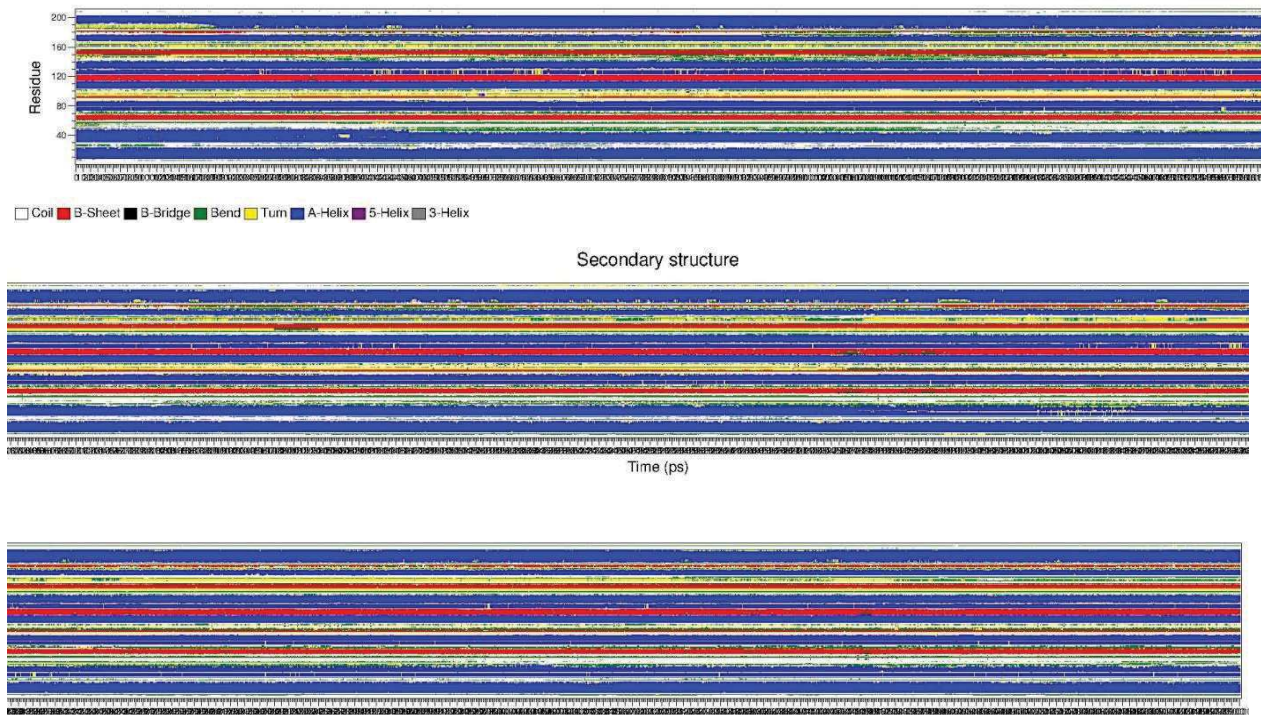
**Fonte:** Autor (produzido com o auxílio do programa ORIGIN).

#### 4.2.9 Estrutura secundária

Esta análise visa ao estudo do comportamento dos motivos tridimensionais equivalentes à estrutura secundária da proteína em questão, ao longo da simulação, a saber: alfa hélices e folhas beta, como os dois motivos principais. Desse modo, faz-se necessário observar a constância dessas estruturas durante o processo da dinâmica. É fundamental que alfa hélices não se convertam em folhas beta e vice-versa, durante a simulação, a fim de que a estrutura tridimensional da proteína se mantenha. Portanto, analisando o gráfico 10, pode-se

observar a manutenção da estrutura secundária de TLR1 ao longo dos 50 ns de simulação, principalmente quando se observa a não conversão dos dois motivos principais da proteína:

**Gráfico 10 – Estrutura secundária de TLR1**



**Fonte:** Autor (produzido com o auxílio do programa DSSP).

As figuras representam um gráfico só, sendo organizadas a partir do início da simulação, em ordem de cima para baixo.

### 4.3 Análises das predições dos efeitos dos polimorfismos de base única em TLR1

Abaixo, são mostrados quadros referentes a cada um dos polimorfismos citados neste trabalho, avaliando o resultado indicado pelos servidores de predição energética do efeito das mutações a partir da sequência fornecida de TLR1, segundo estabilidade, conferida por valores de  $\Delta\Delta G$ , e também conforme critérios de que estes polimorfismos possam ser neutros ou deletérios à estrutura:

**Quadro 1** – Predição dos efeitos do polimorfismo N248S em TLR1

SERVIDORES	ESTABILIZANTE	$\Delta\Delta G$	NEUTRA	DELETÉRIA
DUET	NÃO	-1,095 kcal/mol	-	-
MUPRO	SIM	>0	-	-
PREDICTSNP	-	-	SIM	NÃO

Fonte: Autor

**Quadro 2** – Predição dos efeitos do polimorfismo H305L em TLR1

SERVIDORES	ESTABILIZANTE	$\Delta\Delta G$	NEUTRA	DELETÉRIA
DUET	NÃO	-0,254 kcal/mol	-	-
MUPRO	SIM	>0	-	-
PREDICTSNP	-	-	SIM	NÃO

Fonte: Autor

**Quadro 3** – Predição dos efeitos do polimorfismo P315L em TLR1

SERVIDORES	ESTABILIZANTE	$\Delta\Delta G$	NEUTRA	DELETÉRIA
DUET	SIM	0,208 kcal/mol	-	-
MUPRO	SIM	>0	-	-
PREDICTSNP	-	-	SIM	NÃO

Fonte: Autor

**Quadro 4** – Predição dos efeitos do polimorfismo S602I em TLR1

SERVIDORES	ESTABILIZANTE	$\Delta\Delta G$	NEUTRA	DELETÉRIA
DUET	SIM	0,121 kcal/mol	-	-
MUPRO	SIM	>0	-	-
PREDICTSNP	-	-	SIM	NÃO

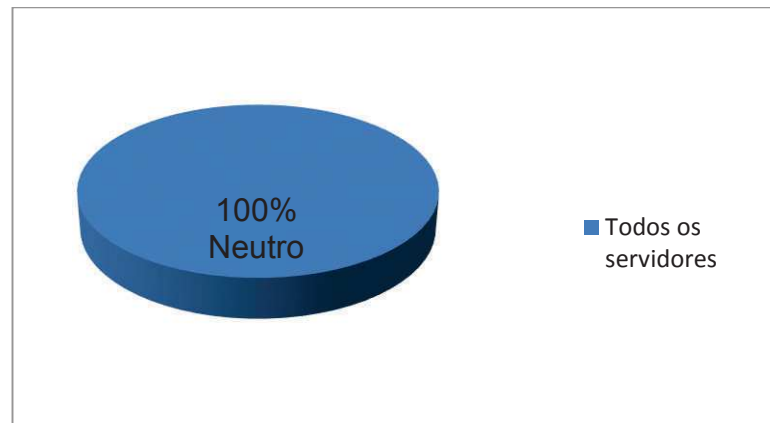
Fonte: Autor

Analisando os quadros 1, 2, 3 e 4, primeiramente, pode-se concluir que, em relação aos servidores DUET e MUPRO, o primeiro constata perda de estabilidade à TLR1 quando provido somente das mutações N248S e H305L. De fato, o polimorfismo N248S presente em TLR1 está associado ao aumento do risco para hanseníase, pois pacientes que possuem tal mutação são dotados de deficiência em suas respostas imunológicas na suscetibilidade à doença (Marques Cde *et al.*, 2013). Diferente do que ocorre para o servidor MUPRO, o qual constata

aumento da estabilidade proteica quando da presença de todos os polimorfismos estudados, porém, este programa não calcula o valor de  $\Delta\Delta G$  associado, o que nos provoca certa desconfiança quanto à sua eficácia.

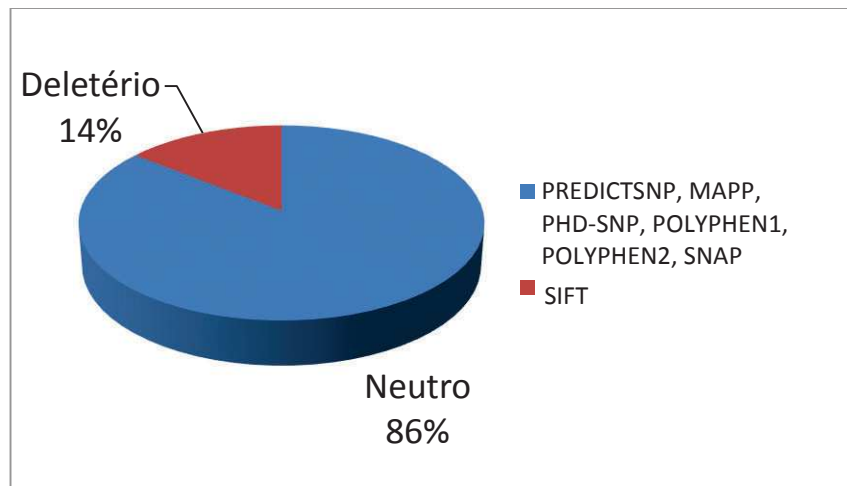
O servidor PREDICTSNP, que designa se a mutação é neutra ou deletéria à molécula, é um consenso entre outros seis servidores. Assim, abaixo, são mostrados os gráficos os quais representam a percentagem de servidores, compilados pelo PREDICTSNP, que avaliam os polimorfismos estudados em neutros, daqueles que dizem serem deletérios:

**Gráfico 11** – Análise do PREDICTSNP para o polimorfismo N248S



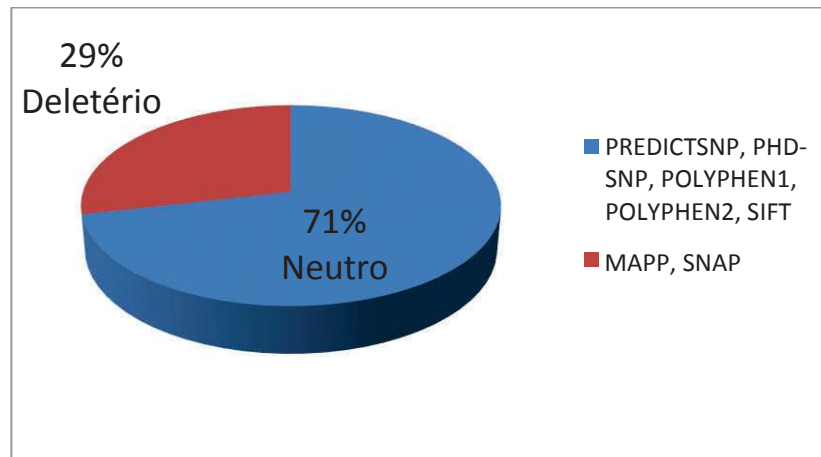
Fonte: Autor

**Gráfico 12** – Análise do PREDICTSNP para os polimorfismos H305L e S602I



Fonte: Autor

**Gráfico 13** – Análise do PREDICTSNP para o polimorfismo P315L



Fonte: Autor

Os gráficos 11, 12 e 13 apresentam um resultado de que a maioria dos servidores componentes do consenso PREDICTSNP apontam, para os polimorfismos estudados, suas neutralidades, mediante estrutura primária de TLR1 fornecida. A mutação com maior probabilidade de ser deletéria seria a P315L, com dois servidores (MAPP e SNAP) indicando este resultado, confirmando com o que foi relatado por Omuetti *et al.*, 2007, os quais afirmaram que a mutação prejudica a sensibilidade do sistema imune inato, quanto ao reconhecimento de componentes presentes na parede celular bacteriana. O fato do polimorfismo em TLR1 ser deletério sugere um dano à molécula, no que diz respeito à interação com os lipopeptídios de *M. leprae* ou à interação com o TLR2, componente do heterodímero, o que levaria ao aumento da suscetibilidade à hanseníase. Esta conclusão é sugerida pelo fato de que a neutralidade de uma mutação em TLR1 não provocaria mudanças na função da proteína, já que a troca do aminoácido causaria efeito neutro.

Em relação ao polimorfismo S602I, um dos focos de estudo deste trabalho, estima-se por análises dos servidores que, provavelmente, seja uma mutação “benéfica” a TLR1, pois os programas DUET e MUPRO indicaram um efeito estabilizante na proteína, enquanto que o consenso PREDICTSNP indicou um efeito neutro na molécula. Apenas um servidor (SIFT) classificou como deletéria a mutação. Porém, segundo Hawn *et al.*, 2007, o alelo 602S confere proteção à hanseníase e que a presença da variante 602I, isto é, o aminoácido mutado, faz com que haja o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, indicando aumento da suscetibilidade a infecções, a partir do reconhecimento de

lipopeptídios por TLR1. Isto refuta o que foi previsto pelos servidores escolhidos, em relação ao polimorfismo S602I.

O fato é que são necessárias outras análises mais profundas, na verificação de quais SNPs são realmente cruciais na suscetibilidade de pacientes com hanseníase. Assim, poder-se-á entender melhor as vias metabólicas intracelulares que levam a uma sinalização anormal e, conseqüentemente, ao aumento da suscetibilidade à doença e, deste modo, alavancar estudos para o desenvolvimento de novos fármacos, que ajudariam no processo de tratamento da hanseníase.

## 5 CONCLUSÃO

Os estudos desenvolvidos neste trabalho objetivaram elucidar alguns pontos envolvidos no processo que desencadeia a hanseníase. As análises realizadas por modelagem molecular, através das técnicas da satisfação das restrições espaciais e da modelagem *ab initio*, permitiram a construção de um modelo estrutural da proteína TLR1, a qual juntamente com TLR2, constituintes de um complexo heterodimérico, estão fundamentalmente relacionadas ao reconhecimento de moléculas associadas a patógenos, principalmente a lipopeptídios localizados na parede celular de *M. leprae*. Além disso, uma metodologia de inserção de TLR1 (domínios transmembranar e TIR) em membrana biológica de DPPC foi padronizada, juntamente com o processo de dinâmica molecular do sistema, ao longo de 50 ns de simulação. Por último, o efeito dos polimorfismos (N248S, H305L, P315L e S602I) associados a TLR1 foi avaliado, sugerindo, através de análises simples, a consequência dessas mutações na suscetibilidade a pacientes com hanseníase. Os critérios analisados permitiram a classificação dos polimorfismos como estabilizantes ou não da estrutura de TLR1, conforme valores de  $\Delta\Delta G$ , e se neutros ou deletérios à proteína.

As perspectivas são de que novos estudos sejam realizados, no sentido da obtenção de resultados mais profundos da interação do heterodímero TLR1/TLR2 com *M. leprae* e dos polimorfismos associados ao complexo, na suscetibilidade de indivíduos portadores de hanseníase.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 7th. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012. x, 545 p.
- ALCAIS, A. et al. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 1, p. 44-8, Feb 2005.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. Oxford England New York: Clarendon Press ;Oxford University Press, 1987. xix, 385 p.
- ALTER, A. et al. Leprosy as a genetic disease. **Mamm Genome**, v. 22, n. 1-2, p. 19-31, Feb 2011.
- BAKER, D.; SALI, A. Protein structure prediction and structural genomics. **Science**, v. 294, n. 5540, p. 93-6, Oct 5 2001.
- BENDL, J. et al. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. **PLoS Comput Biol**, v. 10, n. 1, p. e1003440, Jan 2014.
- BERGER, O.; EDHOLM, O.; JAHNIG, F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. **Biophys J**, v. 72, n. 5, p. 2002-13, May 1997.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 235-42, Jan 1 2000.
- BONNEAU, R.; BAKER, D. Ab initio protein structure prediction: progress and prospects. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 30, p. 173-89, 2001.
- CARDOSO, C. C. et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiol**, v. 6, n. 5, p. 533-49, May 2011.
- CHENG, J.; RANDALL, A.; BALDI, P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. **Proteins**, v. 62, n. 4, p. 1125-32, Mar 1 2006.
- COHEN, S. S. A strategy for the chemotherapy of infectious disease. **Science**, v. 197, n. 4302, p. 431-2, Jul 29 1977.
- COOKE, G. S.; HILL, A. V. Genetics of susceptibility to human infectious disease. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 12, p. 967-77, Dec 2001.
- DELGADO, M. A. et al. Toll-like receptors control autophagy. **EMBO J**, v. 27, n. 7, p. 1110-21, Apr 9 2008.
- FETROW, J. S. et al. The protein folding problem: a biophysical enigma. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 3, n. 4, p. 329-47, Dec 2002.

FISER, A.; DO, R. K.; SALI, A. Modeling of loops in protein structures. **Protein Sci**, v. 9, n. 9, p. 1753-73, Sep 2000.

GRABOWSKI, H. G.; VERNON, J. M. Returns to R&D on new drug introductions in the 1980s. **J Health Econ**, v. 13, n. 4, p. 383-406, Dec 1994.

HAJDUK, P. J.; GALLOWAY, W. R.; SPRING, D. R. Drug discovery: A question of library design. **Nature**, v. 470, n. 7332, p. 42-3, Feb 3 2011.

HAWN, T. R. et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 8, p. 2280-9, Aug 2007.

HILL, A. V. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. **Annu Rev Genet**, v. 40, p. 469-86, 2006.

JOHNSON, C. M. et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **J Immunol**, v. 178, n. 12, p. 7520-4, Jun 15 2007.

KOEHL, P.; LEVITT, M. A brighter future for protein structure prediction. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 2, p. 108-111, Feb 1999.

KUNTZ, I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1078-82, Aug 21 1992.

LEACH, A. R. **Molecular modelling : principles and applications**. 2nd. Harlow, England ; New York: Prentice Hall, 2001. xxiv, 744 p., 16 p. of plates

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Curr Opin Struct Biol**, v. 6, n. 3, p. 402-6, Jun 1996.

LESK, A. M.; CHOTHIA, C. How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. **J Mol Biol**, v. 136, n. 3, p. 225-70, Jan 25 1980.

LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-3, Mar 24 2006.

LUO, Q. et al. Identification of biomarkers for tuberculosis susceptibility via integrated analysis of gene expression and longitudinal clinical data. **Front Genet**, v. 5, p. 240, 2014.

MARQUES CDE, S. et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. **J Infect Dis**, v. 208, n. 1, p. 120-9, Jul 2013.

MARTI-RENOM, M. A. et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 29, p. 291-325, 2000.

- MAVROMOUSTAKOS, T. Methodologies and applied strategies in the rational drug design. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 17, p. 2516, 2011.
- MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, v. 267, n. 5612, p. 585-90, Jun 16 1977.
- MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040-2, May 13 2005.
- MORAES, M. O. et al. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev**, v. 77, n. 3, p. 189-202, Sep 2006.
- OMUETI, K. O. et al. The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components. **J Immunol**, v. 178, n. 10, p. 6387-94, May 15 2007.
- PIRES, D. E.; ASCHER, D. B.; BLUNDELL, T. L. DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W314-9, Jul 2014.
- RAST, J. P.; BOOTH, J. W. D. **Immune receptors : methods and protocols**. New York: Humana ; Springer, 2011. xi, 301 p.
- ROY, S. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J Infect Dis**, v. 176, n. 2, p. 530-2, Aug 1997.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biol**, v. 234, n. 3, p. 779-815, Dec 5 1993.
- SANTOS, A. R. et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis**, v. 186, n. 11, p. 1687-91, Dec 1 2002.
- SATYANARAYANAJOIS, S. D. **Drug design and discovery : methods and protocols**. New York: Humana Press, 2011. xi, 284 p.
- SCHLICK, T. **Molecular modeling and simulation : an interdisciplinary guide**. 2nd. New York: Springer, 2010. xlv, 723 p.
- SHIN, D. M. et al. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 11, p. 1648-65, Nov 2010.
- SINGH, P.; COLE, S. T. Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 57-71, Jan 2011.
- SKOLNICK, J.; FETROW, J. S.; KOLINSKI, A. Structural genomics and its importance for gene function analysis. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 3, p. 283-7, Mar 2000.

TARI, L. W. **Structure-based drug discovery**. New York: Humana Press/Springer, 2012. ix, 385 p.

THOMA-USZYNSKI, S. et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v. 291, n. 5508, p. 1544-7, Feb 23 2001.

TOPHAM, C. M.; SRINIVASAN, N.; BLUNDELL, T. L. Prediction of the stability of protein mutants based on structural environment-dependent amino acid substitution and propensity tables. **Protein Eng**, v. 10, n. 1, p. 7-21, Jan 1997.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. **J Comput Chem**, v. 26, n. 16, p. 1701-18, Dec 2005.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 40, 2008.