

fusão dessas membranas, ainda existem muitas questões em aberto com respeito aos mecanismos da ligação do vírus às células. Neste projeto, experimentos são propostos para entender melhor os estados intermediários durante a ligação e a entrada do vírus da dengue (DV), correlacionando as estruturas tridimensionais com o mapeamento funcional das interações importantes. Os objetivos serão focados em medidas de interação entre a proteína do envelope do DV e o receptor DC-SIGNR, e em testes de mudanças conformacionais transmembrana, as quais levam à fusão de membranas. Além disso, o projeto prevê a implementação de um ensaio para testar receptores do DV e inibidores da entrada do vírus na célula. Finalmente, será determinada a cinética de fusão de membranas dos Flavivírus brasileiros ainda não caracterizados do grupo do vírus da encefalite japonesa JEV, visando correlacionar mutações naturais na proteína E dos JEV com pH e composição lipídica com a fusão.

092

Estudos estruturais de *docking* e de dinâmica molecular aplicados à inibição enzimática de cisteinoproteases por organocalcogênicos

Mauricio Angel Vega Teijido
Faculdade de Ciências de Bauru
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Processo 2006/56078-4
Vigência: 1/6/2007 a 31/5/2010

Este projeto visa à realização, em paralelo, de duas linhas de pesquisa que confluem em uma linha mais abrangente: 1) estudos químico-quânticos aplicados a compostos organocalcogênicos (principalmente S, Se e Te) com ênfase em derivados halogenados; e 2) a modelagem dos complexos de inibição de cisteinoprotease catepsina B por organocalcogênicos. Algumas doenças em que a inibição da catepsina B seria proveitosa são artrite reumatoide, osteoporose, distrofia muscular e metástase tumoral. Nos estudos teóricos serão usadas metodologias relativísticas e estudos teóricos da densidade eletrônica para tentar caracterizar as interações observadas (covalentes, iônicas, interações secundárias etc.). Essas propriedades de ligação dos calcogênicos são de grande interesse científico pelas suas aplicações à química supramolecular, ao desenho de novos materiais e, neste caso, ao estudo dos complexos de inibição da catepsina B. Nos estudos de modelagem dos complexos organocalcogênio-catepsina B (e, em paralelo, da catepsina K) serão usadas as metodologias de *docking* e dinâmica molecular, procurando-se ter uma visão mais geral dos fatores estruturais que influem no mecanismo de inibição e, dessa forma, ter informações fundamentais que orientem o desenho de inibidores de maior especificidade e atividade biológica em catepsina B.

093

Estudo das relações quantitativas entre a estrutura e a atividade de inibidores da purinanucleosídeo-fosforilase de *Schistosoma mansoni*, da gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase glicossomal de *Trypanosoma cruzi* e da adenina-fosforibosiltransferase de *Leishmania tarentolae*

Adriano Defini Andricopulo
Instituto de Física de São Carlos
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2002/03144-9
Vigência: 1/11/2002 a 31/10/2006

Os objetivos principais deste projeto são os estudos das relações quantitativas entre a estrutura e a atividade de inibidores da purinanucleosídeo-fosforilase de *Schistosoma mansoni*, da gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase glicossomal de *Trypanosoma cruzi* e da adenina-fosforibosiltransferase de *Leishmania tarentolae*, compostos candidatos a protótipos de novos fármacos no tratamento quimioterápico da esquistossomose, doença de Chagas e leishmaniose, respectivamente. Para a realização de nossos objetivos, planeja-se a criação de amplos conjuntos-padrões de dados para inibidores das enzimas-alvos. Esses conjuntos, contendo os dados de estrutura e atividade inibitória correspondentes, organizados e classificados, serão a base científica para os estudos de modelagem molecular e o desenvolvimento de modelos de QSAR/QSAR 3D, empregando diferentes abordagens e metodologias de QSAR. Os modelos preditivos de QSAR/QSAR 3D, uma vez criados, serão úteis para o planejamento e desenho estrutural de novas moléculas que possuam propriedades farmacoterapêuticas otimizadas, capazes de representar novas entidades químicas, candidatas a protótipos de novos fármacos na quimioterapia segura das doenças infecto-parasitárias de interesse neste projeto.

094

Modulação artificial da diferenciação neuronal e função de receptores por oligonucleotídeos sintéticos atuantes nos níveis gênico e proteico

Alexander Henning Ulrich
Instituto de Química
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2001/08827-4
Vigência: 1/3/2002 a 31/8/2007

A linhagem P19 derivada de teratocarcinoma murino será utilizada como modelo de diferenciação neuronal *in vitro*. Mediante tratamento com agentes químicos em protocolos bem estabelecidos, tais células expressam (com cinéticas definidas) uma variedade de marcadores moleculares de diferenciação neuronal e comportam-se como

neurônios em ensaios de eletrofisiologia. O estudo particularmente se interessa em caracterizar o mecanismo de ação de receptores purinérgicos de tipo P2X e P2Y, recentemente implicados no desenvolvimento neuronal e funcionamento normal do sistema nervoso. Técnicas de eletrofisiologia de cinética rápida serão utilizadas para determinarmos os passos de velocidade envolvidos na ativação dos receptores em presença de agonistas inertes ativáveis, e o uso de inibidores genéricos nos permitirá caracterizar os sítios regulatórios constituintes dos diferentes subtipos de receptor purinérgico. Tais informações nos permitirão estabelecer protocolos para a seleção de aptâmeros de RNA a partir de bibliotecas combinatórias capazes de estabilizar formas ativadas e inibidas dos receptores. Além disso, o potencial da técnica de interferência de RNA (RNAi) como forma de silenciar especificamente os genes de receptores purinérgicos será testado nessa linhagem e, caso o mecanismo de degradação de mensageiros, conservado em uma série de sistemas, esteja presente nas células P19, tal estratégia será usada para produzir *knockouts* funcionais dos receptores purinérgicos. Em um segundo momento, aptâmeros selecionados capazes de interferir com a atividade de receptores no nível proteico e RNAs dupla-fita capazes de interferir no nível gênico serão ministrados a células em cultura em diferentes tempos do processo de diferenciação neuronal. De tal forma, poderemos avaliar o papel dos receptores purinérgicos em tal processo. O caráter embrionário de células P19 garante que as mesmas possam seguir diferentes destinos fenotípicos mediante tratamento experimental adequado, podendo assim ser diferenciadas em células musculares lisas e esqueléticas, além de neurônios e células gliais. Estudos sobre o estabelecimento de programas específicos de transcrição em modelos de transição fenotípica (diferenciação, transformação, senescência), utilizando células de eucariotos superiores em cultura, não são muito comuns. As células P19 constituem um modelo particularmente interessante para o estudo de controles epigenéticos associados à diferenciação celular, pois os diferentes estágios fenotípicos – isto é, células não diferenciadas, mioblastos e neurônios – podem ser comparados de forma sistemática quanto a múltiplos parâmetros. O presente projeto visa principalmente investigar alterações da organização da cromatina no núcleo celular associadas às diferentes transições fenotípicas. Para tanto, pretende-se examinar marcadores moleculares, como a acetilação de histonas e a metilação de determinados promotores gênicos; e marcadores estruturais, tais como a localização espacial de sequências intensamente transcritas, ou não, em núcleos interfásicos e os padrões espaço-temporais de replicação e transcrição nos diferentes estágios de diferenciação.

Fernando Luis Barroso da Silva

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo (USP)

Processo 2001/03363-0

Vigência: 1/1/2002 a 28/2/2007

Interações eletrostáticas em biomoléculas é o tema comum deste projeto. Mais especificamente, nós pretendemos estudar o efeito da força iônica e do equilíbrio ácido-base na estabilidade, estrutura e função da calbindina D9K e da hemoglobina, aspectos eletrostáticos da interação proteína-peptídeo (por exemplo, interação calmodulina-peptídeo). Nossa ferramenta básica de trabalho será a mecânica estatística (simulações moleculares), complementada com investigações em colaboração com grupos experimentais. Programas de simulação numérica para esse propósito vêm sendo desenvolvidos por nós durante os últimos dez anos, permitindo que os refinamentos necessários para esta proposta sejam possíveis. Simulações de proteínas, considerando explicitamente todos os átomos do sistema, tornaram-se bastante populares na década de 1980, ajudando a decifrar mecanismos moleculares. Vários pacotes de dinâmica molecular foram construídos (exemplo: Gromos, Amber, CHARMM). Porém, embora exista um grande potencial para essa abordagem (nível de Born-Oppenheimer), ela sofre da falta de campos de força confiáveis e de alguns problemas técnicos, como a truncagem das interações de longo alcance. Uma estratégia mais promissora é tratar o sistema em um nível mais grosseiro, conhecido como “modelo primitivo”. Porém, em vez de adotar a aproximação de campo médio, como feito nas abordagens por Poisson-Boltzmann, essa hamiltoniana efetiva do sistema deve ser solucionada por meio do emprego de simulações Monte Carlo Metropolis. Isto é o que propomos aqui. O uso da aproximação do dielétrico contínuo para descrever a solução aquosa, como proposto no modelo primitivo, provou ser extremamente eficaz em ciência coloidal e também em contexto biológico, por exemplo, na abordagem de Tanford-Kirkwood para descrever interações eletrostáticas em proteínas. Estratégias semelhantes podem ser hoje aplicadas de maneira ainda muito mais refinada e precisa, graças à performance dos computadores modernos, como demonstrado em nossos trabalhos anteriores. Pretendemos aqui revisar alguns aspectos metodológicos, aprimorar e desenvolver novas ferramentas computacionais para obtenção de resultados mais “exatos”, juntamente com o estudo de sistemas de maior interesse, tanto científico, como tecnológico. O principal aspecto novo nesta proposta é o uso do modelo contínuo para uma descrição detalhada das interações eletrostáticas, considerando todos os átomos da proteína, dos contra e coíons e de possíveis ligantes, para estudarmos os problemas mencionados acima. Se necessário, as interações eletrostáticas serão acrescentadas com um termo de Van der Waals mais um de atração hidrofóbica.

095

Interações eletrostáticas em biomoléculas: aspectos metodológicos, aplicações e implicações no genoma estrutural