

5 Metodologia

5.1. Resumo da metodologia.

As dinâmicas moleculares que foram realizadas podem ser separadas em três classes de simulações facilmente distinguíveis. As simulações planejadas apenas para obter dados qualitativos e o comportamento dos HPAs em grande concentração na fase aquosa através da utilização de um modelo de membrana celular composta unicamente por DPPC e os HPAs na fase aquosa. O segundo grupo de dinâmicas moleculares foi realizado para obter dados qualitativos sobre a validação da dinâmica e a difusão simples dos HPAs utilizando um modelo simples: o modelo de membrana celular unicamente com DPPC e os HPAs na fase fosfolipídica. Finalmente, o terceiro grupo de simulações foi proposto para observar o comportamento dos HPAs utilizando um modelo mais próximo de um surfactante pulmonar disponível: a membrana celular formada por DPPC, DPPG e colesterol com os HPAs na fase fosfolipídica. Para todas as dinâmicas moleculares usou-se o pacote de programas de computador GROMACS.

5.2. Parâmetros

Os parâmetros de interação dos PAHs, seus metabólitos e DPPG foram obtidos usando o Automated Topology Builder (ATB) versão 1.2 (MALDE et al., 2011). As cargas dos compostos e seus grupos foram ajustadas manualmente para manter os grupos de carga com cargas totais. Isso é importante especialmente porque a simetria dos HPAs aumenta a dificuldade na atribuição automática dos grupos de carga. Na versão 1.2 do ATB, os grupos de carga não são separados resultando em valores errados de carga.

Os parâmetros do DPPC e do colesterol foram obtidos das publicações de Kukol disponíveis no site lipidbook (lipidbook.bioch.ox.ac.uk). Os parâmetros padrões foram utilizados para do modelo de água de carga pontual simples (SPC) e do cátion sódio (Na^+) parametrizados para o campo de força Gromos53A6.

As estruturas são apresentadas no seguinte quadro:

Molécula ou íon	Estrutura	Referencia da topologia
DPPC:		(KUKOL, 2009)
DPPG:		(MALDE et al., 2011)
COL:		(MALDE et al., 2011)
DBaH		(MALDE et al., 2011)
mDBaH		(MALDE et al., 2011)
SPC	$\text{H}-\text{O}-\text{H}$	(BERENDSEN et al., 1981)
Na^+	Na^{\oplus}	(OOSTENBRINK et al., 2004)

Quadro 6 Estruturas das moléculas usadas nas simulações com as fontes da topologia. Significado das siglas: DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPG: dipalmitoilfosfatidilglicerol, COL: colesterol, BaP: benzo[a]pireno, mBaP: metabolito do benzo[a]pireno, DBaH: Dibenzo[a,h]antraceno, mDBaH: metabolito do Dibenzo[a,h]antraceno, SPC: modelo de água de pontos de carga simples, Na: cátion padrão de sódio para o campo de força gromos53a6.

5.3.

Formação dos sistemas.

5.3.1.

Modelo de DPPC com DBaH e metabólito inicialmente na fase aquosa.

A estrutura da bicamada formada somente por DPPC foi obtida do site lipidbook(KUKOL, 2009), a bicamada consta de 128 moléculas de DPPC, 64 por

camada, a orientação das camadas foi feita de tal forma que as cabeças polares ficassem orientadas para a parte externa da bicamada. O plano da bicamada foi posicionado paralelamente ao plano XY do sistema. A bicamada foi previamente equilibrada por Kukol com um tempo de simulação de 40ns, e posteriormente, inserida no centro da caixa com dimensão 6,4 x 6,4 x 8 nm nas dimensões X, Y e Z respectivamente.

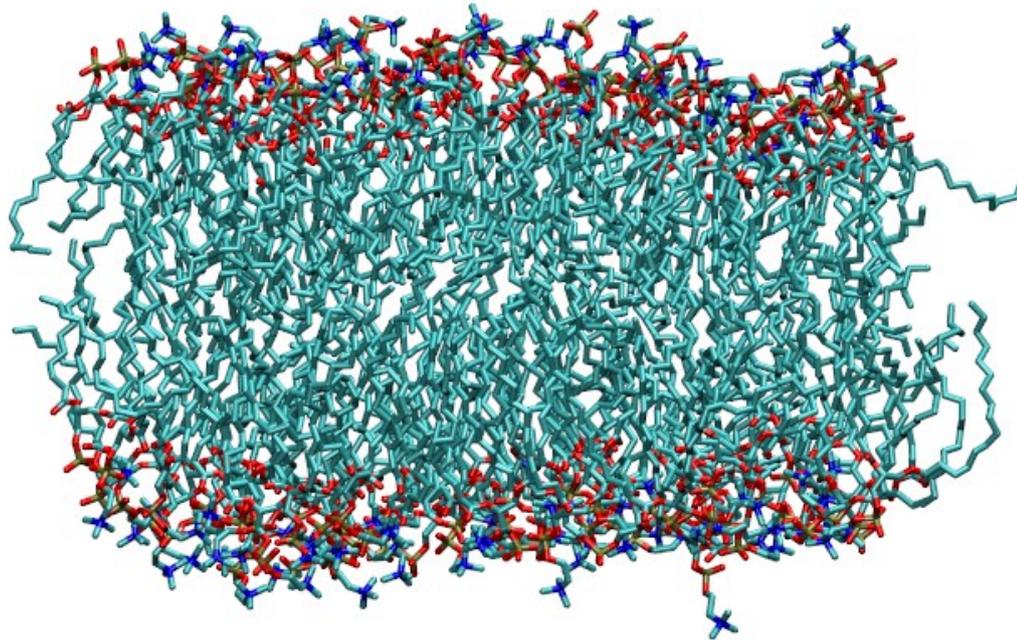
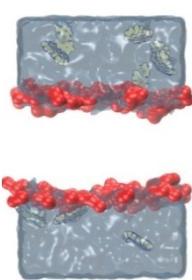
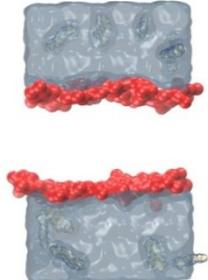
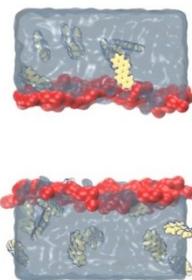
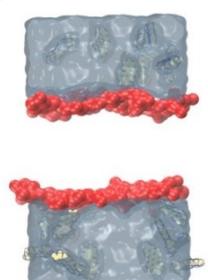
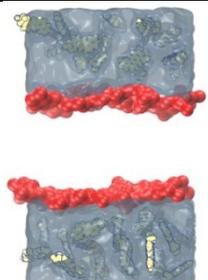


Ilustração 4 Bicamada de DPPC previamente equilibrada.

Em cada extremo separado pela bicamada, foram introduzidos aleatoriamente 10, 20 e 40 moléculas de HPA ou metabólito, note-se que pela periodicidade usada os HPAs não estavam em fases diferentes, ou seja, não estavam separados pela bicamada e devem considerar-se somente duas fases, a fase aquosa e a membrana celular. Posteriormente, utilizando o modelo SPC implementado no programa Gromacs, moléculas de água foram adicionadas aleatoriamente até não poder adicionar mais moléculas depois de n tentativas usando raios de van der Waals padrões no espaço delimitado pelas dimensões de cada sistema.

Número de HPAs	DBahA	mDBahA
10		
20		
40		

Quadro 7 Estruturas iniciais do modelo de DPPC com DBahA e mDBahA inicialmente na fase aquosa. Em vermelho os átomos de nitrogênio e fósforo delimitando a membranas, em azul a fase aquosa e em amarelo os HPAs.

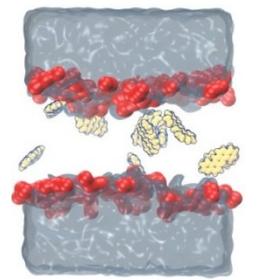
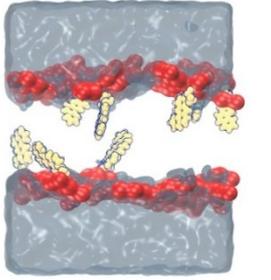
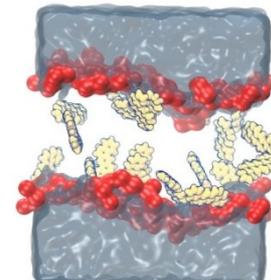
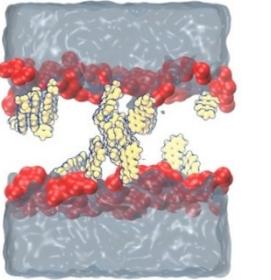
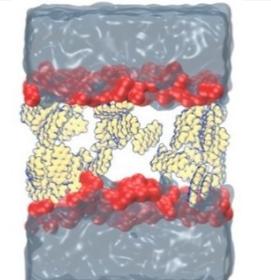
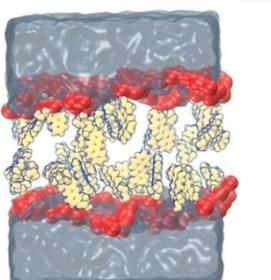
5.3.2.

Modelos de DPPC e DPPC/DPPG/Colesterol DBahA e metabólito inicialmente na fase lipídica.

Para incluir os HPAs ou seus metabolitos e para construir as bicamadas de DPPC e DPPC/DPPG/Colesterol, utilizou-se o programa de computador CELLmicrocosmos 2.2.2 membrane editor package (CM2)(SOMMER et al., 2011). A bicamada foi construída usando o algoritmo para distribuir as moléculas de forma aleatória sobre um plano de 6,5 nm x 6,5 nm, constituindo cada camada de 32 moléculas de DPPC, 32 moléculas de DPPG, 1 molécula de colesterol. Para cada sistema, 5, 10 e 20 moléculas do HPA ou metabólito, a distribuição foi feita de forma que as partes polares das moléculas de HPA ou metabólito (átomos de oxigênio perto do setor polar da membrana) ficassem

expostas na parte exterior da bicamada. Consequentemente, construiu-se 6 sistemas para o modelo de DPPC e 2 sistemas para o modelo de DPPC/DPPG/Colesterol

Usando também o modelo SPC implementado no programa Gromacs, as moléculas de água foram adicionadas aleatoriamente até não poder adicionar mais moléculas depois de 100 tentativas usando raios de van der Waals padrões no espaço delimitado pelas dimensões de cada sistema.

Número de HPAs	DBahA	mDBahA
10		
20		
40		

Quadro 8 Estruturas iniciais do modelo de Modelos de DPPC com DBahA e mDBahA inicialmente na fase lipídica. Em vermelho os átomos de nitrogênio e fósforo delimitando a membranas, em azul a fase aquosa e em amarelo os HPAs.

5.4. Etapa de minimização de energia

Para todos os sistemas foi feita uma etapa de minimização de energia para evitar que o sistema colapsasse no início da dinâmica molecular. A minimização

de energia foi feita utilizando o algoritmo *steep descent* até alcançar uma tolerância de energia de interações de 250 KJ mol⁻¹ utilizando condições de contorno periódicas em todas as dimensões do sistema.

Como as moléculas de HPAs possuem tamanho muito menor em comparação com as proteínas e com grande liberdade de movimento, não foi considerado necessário o uso de outros algoritmos de minimização de energia como o de gradiente conjugado.

Parâmetros importantes	Valor
Integrator	Steep
Emtol	250,0
Nsteps	5000
pbc	Xyz

Quadro 9 Parâmetros importantes da etapa de minimização de energia.

5.4.1. Modelo de DPPC com DBahA e metabólito inicialmente na fase aquosa.

Foram usados 200 *ps* de dinâmica molecular com o algoritmo *leap frog* para relaxar o sistema. Foram geradas velocidades para todas as partículas do sistema para uma temperatura de 310 K utilizando uma distribuição de Maxwell-Boltzman. Também, condições de contorno periódicas foram usadas em todas as dimensões com acoplamento de temperatura (ensemble NVT). Os parâmetros usados estão descritos na seguinte tabela.

Parâmetro importantes	Valor
Integrator	Md
nsteps	1000000
dt	0,002
Constraint algorithm	lincs
Coulombtype	PME
tcoupl	v-rescale
Tc groups	SOL nonSOL
Tau-t	0,1 0,1
Ref-t	310 310
pbc	xyz
Gen_vel	Yes
Gen_temp	310

Quadro 10 Parâmetros importantes da etapa de equilíbrio.

5.4.2. Modelos de DPPC e DPPC/DPPG/Colesterol DBahA e metabólito inicialmente na fase lipídica.

Após a minimização de energia a dinâmica molecular de 1000 ps² foi feita com condições de contorno periódicas em todas as dimensões, gerando aleatoriamente as velocidades seguindo uma distribuição de Maxwell-Boltzman para uma temperatura de 310 K e utilizando acoplamentos de temperatura e pressão (ensemble NPT). Os parâmetros usados para este equilíbrio do sistema são:

Parâmetro importantes	Valor
Integrator	md
Nsteps	5000000
Dt	0,002
Constraint algorithm	lincs
Coulombtype	PME
Tcoupl	v-rescale
Tc groups	DPP DA SOL
Tau-t	0,5 0,5 0,5
Ref-t	310 310 310
Pcoupl	Parrinello-Rahman
Pcoupltype	semiisotropic
Taup_p	2
Ref_p	1 1
Compressibility	4,5e-5 4,5e-5
Pbc	xyz
Gen_vel	Yes
Gen_temp	310

Quadro 11 Parâmetros importantes da etapa de equilíbrio dos modelos de DPPC e DPPC/DPPG/Colesterol DBahA e mDBahA inicialmente na fase lipídica.

5.5. Dinâmica Molecular

Depois de comprovar que os sistemas simulados estavam equilibrados, com as velocidades distribuídas em concordância com o acoplamento de temperatura e sem grandes mudanças nas dimensões da célula unitária do sistema, a etapa de dinâmica molecular foi feita.

Foram efetuadas dinâmicas moleculares usando emseble NPT com Δt de 0,2 fs, termostato de acoplamento fraco “weak thermal coupling” com temperatura de acoplamento de 310 K de 0,1 ps, barostato de Parrinello-Rahman com pressão de referência de 1 bar e tempo de relaxação de 5 ps²

implementando-se de forma semi-isotrópica, onde as coordenadas x^2 e y^2 ajustavam-se em igual magnitude e independente da coordenada z^2 , como é recomendado para membranas pela independência de suas propriedades não isotrópicas. Os cortes entre curto e longo alcance para as interações não ligantes foram de 1 *nm* para as interações de van der Waals e 1,2 *nm* para as interações de Coulomb. Correções de dispersão de energia e atualizações da lista de vizinhança foram feitas a cada 10 passos (2 ps²). Para as interações eletrostáticas de longo alcance foi usado o algoritmo PME e foi utilizado o algoritmo de restrição LINCS para poder utilizar um Δt de 0,2 fs². Os valores da energia e posição foram salvos a cada *N* e *M* passos, respectivamente.

As dinâmicas molecular foram feitas com tempo de simulação de 50 *ns*. Não obstante, para poder apreciar qualitativamente a dinâmica do processo de introdução dos DBahA e dos metabólitos desde a fase aquosa para fase fosfolipídica, as simulações com DBahA e metabólitos inicialmente na fase aquosa foi estendido com um tempo de simulação até 200 *ns*². Posteriormente, foram unidas as trajetórias e os arquivos de energia com o pacote de programa de computador GROMACS.

No total foram simulados 14 sistemas, 6 sistemas com tempo de simulação de 200 *ns* pertencentes ao modelo de membrana de DPPC com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase aquosa, 6 sistemas com tempo de simulação de 50 *ns* , pertencentes ao modelo de membrana de DPPC com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase lipídica, e 2 sistemas com tempo de simulação de 50 *ns* pertencentes ao grupo de simulações com o modelo de membrana de DPPC/DPPG/Colesterol com o DBahA e seu metabólito inicialmente na fase lipídica.

Parâmetro importantes	Valor
Integrator	md
Nsteps	100000000 ^A , 25000000 ^B
Dt	0,002
Constraint algorithm	lincs
Coulombtype	PME
Tcoupl	Nose-Hoover
Tc groups	LIPID PAH SOL
Tau-t	0,5 0,5 0,5
Ref-t	310 310 310
Pcoupl	Parrinello-Rahman
Pcoupltype	semiisotropic
Taup_p	2
Ref_p	1 1
Compressibility	4,5e-5 4,5e-5
Pbc	xyz
Gen_vel	no

Quadro 12 Parâmetros importantes da etapa de equilíbrio. **A=** Modelo de DPPC com DBahA e DBahA inicialmente na fase aquosa. **B=** Modelos de DPPC e DPPC/DPPG/Colesterol DBahA e mDBahA inicialmente na fase lipídica.

Metodologia

Grupo de simulação	Caraterísticas comuns antes da dinâmica	Modelo de membrana celular	HPA ou metabólito	Número de HPAs ou metabólitos		
				10	20	40
Modelo de DPPC com DBahA e metabólito inicialmente na fase aquosa.	Tempo 200ns HPAs na fase aquosa	Modelo de membrana celular DPPC 128 moléculas de DPPC	DBahA	n SPC=7890 x,y,z=6,39, 6,41, 11,00 HPA=1,2% (massa)	n SPC=7825 x,y,z=6,39, 6,41, 11,00 HPA=2,3% (massa)	n SPC=6437 x,y,z=6,39, 6,41, 11,00 HPA=5,0% (massa)
			mDBahA	n SPC=7870 x,y,z=6,39, 6,41, 11,00 HPA=1,4% (massa)	n SPC=7460 x,y,z=6,39, 6,41, 11,00 HPA=2,8% (massa)	n SPC=6267 x,y,z=6,39, 6,41, 11,00 HPA=5,9% (massa)
DBahA	n SPC=7564 x,y,z=7,12, 7,11, 10,00 HPA=1,2% (massa)		n SPC=7021 x,y,z=8,76, 8,77, 10,10 HPA=2,5% (massa)	n SPC=6676 x,y,z=7,13, 7,12, 10,00 HPA=4,9% (massa)		
mDBahA	n SPC=7562 x,y,z=8,81, 874, 10,10 HPA=1,4 % (massa)		n SPC=7049 x,y,z=8,77, 8,77, 10,10 HPA=2,8% (massa)	n SPC=6403 x,y,z=7,131, 7,08, 10,10 HPA=5,8% (massa)		
Modelos de DPPC/DPG/Colesterol DBahA e metabólito inicialmente na fase lipídica.	Tempo 50ns HPAs na fase lipídica	Modelo de membrana celular DPPC, DPG Colesterol 64 mol. de DPPC 64 mol. de DPG 2 mol. de COLI 64 átomos de Na+	DBahA	NR	NR	n SPC=19266 x,y,z=6,4, 6,60, 19,42 HPA=2,5% (massa)
			mDBahA	NR	NR	n SPC=18518 x,y,z=6,54, 6,55, 19,34 HPA=2,9% (massa)

Quadro 13 Características iniciais dos sistemas simulados. NR significa que não foi realizado.