



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

YURI RAMOS MENEZES SANTOS SOEIRO

**Aplicação de métodos de Dinâmica Molecular e QM/MM no
estudo reacional da enzima lisina metiltransferase G9a**

São Luís – MA

2023

YURI RAMOS MENEZES SANTOS SOEIRO

**Aplicação de métodos de Dinâmica Molecular e QM/MM no
estudo reacional da enzima lisina metiltransferase G9a**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão

Orientador: Prof. Dr. Jaldyr de Jesus
Gomes Varela Junior.

São Luís – MA

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ramos Menezes Santos Soeiro, Yuri.

Aplicação de métodos de Dinâmica Molecular e QM/MM no estudo do mecanismo catalítico da enzima lisina metiltransferase G9a / Yuri Ramos Menezes Santos Soeiro. - 2023.

52 f.

Orientador(a): Jaldyr de Jesus Gomes Varela Junior.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, CCET-PPGQUIM/UFMA, 2023.

1. Dinâmica Molecular. 2. Histona 9. 3. Metiltransferase. I. de Jesus Gomes Varela Junior, Jaldyr. II. Título.

YURI RAMOS MENEZES SANTOS SOEIRO

**Aplicação de métodos de Dinâmica Molecular e QM/MM no estudo do
mecanismo catalítico da enzima lisina metiltransferase G9a**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jaldyr de Jesus Gomes Varela Junior (orientador/UFMA)

Prof. Dr. Alberto Monteiro dos Santos (UNICAMP)

Prof. Dr. Roberto Batista de Lima (UFMA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda força, sabedoria, persistência e garra que me fez ter diante de todas as dificuldades ao longo do curso de mestrado. Agradeço também todas as bênçãos, oportunidades e conquistas que me propiciou durante esse período.

Agradeço também a minha família e em especial aos meus pais, Jorge e Rosaly, por sempre apoiarem minhas decisões e sempre estarem presentes na minha educação desde o começo até a carreira acadêmica. Sem dúvida são as pessoas mais importantes da minha vida e que são meu porto seguro, onde a influência deles foi de suma importância para tudo isso acontecer.

Gostaria de prestar agradecimento também ao professor Dr. Jaldyr Varela por ter me aceito como orientando e por toda ajuda durante esse período. Sempre solicito quando o procurei e paciente diante os contratempos que surgiram durante o percurso.

Ao professor Alberto que foi o meu coorientador no trabalho e que se dispôs a me ensinar um método novo o qual ainda não tinha trabalhado e que foi utilizado na minha pesquisa. Gratidão pela paciência e também por sempre estar à disposição quando surgia alguma dúvida.

Sou grato ao LQQC, laboratório de química quântica computacional, do professor Jaldyr onde desenvolvi parte da minha pesquisa e também agradeço a professora Silvette Guerini por permitir que eu desenvolvesse uma outra parte da pesquisa no LSIM (laboratório de simulação).

Não podia deixar de agradecer a professora Cláudia Quintino Rocha por ser uma excelente coordenadora do Programa de Pós Graduação em Química da UFMA e por sempre se dispor em auxiliar os alunos.

Ao PPGQuim-UFMA meus sinceros agradecimentos por ser o programa de pós graduação que é. Desde a graduação já era um objetivo entrar nesse programa e a partir do momento de aprovação na seleção foi de muita satisfação.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão por ser o local onde fiz grande parte da minha formação que foi desde o ensino médio até agora no curso de mestrado, a Fundação de Amparo e Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) e ao servidor CABANO pela possibilidade de realização de parte dos cálculos.

Em síntese agradeço a todas pessoas que me apoiaram desde o começo do mestrado e que sempre estiveram na torcida para que eu pudesse alcançar cada vez mais meus objetivos na vida profissional e pessoal.

Por mais difícil que a vida possa parecer, existe sempre algo que você pode fazer e alcançar.

Stephen Hawking

RESUMO

A epigenética é a área de conhecimento responsável por examinar o comportamento dos genes e como eles reagem diante de inúmeros fatores que estão presentes ao longo da vida do indivíduo. Uma das maneiras de realizar esse tipo de estudo é por meio do método de dinâmica molecular (DM) o qual é muito utilizado em sistemas com características biológicas permitindo que os sistemas replicados computacionalmente se assemelhem a situação biológica real. Neste trabalho foi investigado os mecanismos de reação e atividade da enzima lisina metiltransferase (MT) G9a por meio de simulações de dinâmica molecular. Foram analisadas mutações que a histona 3 lisina 9 (H3K9) pode sofrer por conta dos mecanismos epigenéticos, e calculados os valores de energia livre referente a cada uma dessas mutações, também foi verificada a distância média da H3K9 e suas mutações em complexo com a MT G9a e o comportamento reacional dos sistemas mutantes. Para o desenvolvimento do trabalho foram usadas estruturas obtidas do Protein Data Bank para utilização das estruturas utilizadas ao longo da pesquisa onde essas estruturas/sistemas foram tratadas com o campo de força CHARMM32 e simulados no software AMBER. Cinco sistemas foram construídos: H3K9 nativo e mutantes: H3K9M, H3K9A, H3K9I e H3K9Nle. Foram realizadas diferentes análises com o intuito de verificar qual desses mutantes se destacaria quando em complexo com a enzima G9a e conseqüentemente a inibição do processo de metiltransferase relacionado ao processo de neoplasia. Os resultados dos primeiros 150ns de dinâmica molecular mostram que os mutantes H3K9M e H3K9I apresentaram complexos mais estáveis, cálculos de energia livre usando MM/PBSA e MM/GBSA apontaram novamente as mutações H3K9M e H3K9I como as mais energeticamente favoráveis. Esses resultados estão de acordo com as observações experimentais disponíveis na literatura. Sendo assim a lisina 9 com a mutação da metionina e da isoleucina podem atuar como inibidores eficientes da enzima G9a, posteriormente podendo ocasionar problemas como o câncer.

Palavras Chaves: Dinâmica Molecular, Histona 9, Metiltransferase.

ABSTRACT

Epigenetics is the area of knowledge responsible for examining the behavior of genes and how they react to numerous factors that are present throughout the individual's life. One way to perform this kind of study is through the molecular dynamics (MD) method, which is widely used in systems with biological characteristics, allowing computationally replicated systems to resemble the real biological situation. In this work we investigated the reaction mechanisms and activity of the enzyme lysine methyltransferase (MT) G9a by means of molecular dynamics simulations. The mutations that histone 3 lysine 9 (H3K9) can suffer due to epigenetic mechanisms were analyzed, and the free energy values for each one of these mutations were calculated. The average distance of H3K9 and its mutations in complex with the MT G9a and the reaction behavior of the mutant systems were also verified. For the development of the work, structures obtained from the Protein Data Bank were used to utilize the structures used throughout the research where these structures/systems were treated with the CHARMM32 force field and simulated in AMBER software. Five systems were constructed: H3K9 native and mutants: H3K9M, H3K9A, H3K9I and H3K9Nle. Different analyses were performed in order to verify which of these mutants would stand out when in complex with the G9a enzyme and consequently the inhibition of the methyltransferase process related to the neoplasm process. The first 150ns molecular dynamics results show that the H3K9M and H3K9I mutants showed more stable complexes, free energy calculations using MM/PBSA and MM/GBSA again pointed out the H3K9M and H3K9I mutations as the most energetically favorable. These results are in agreement with experimental observations available in the literature. Thus lysine 9 with the methionine and isoleucine mutation can act as efficient inhibitors of the G9a enzyme, subsequently leading to problems such as cancer.

Keywords: Molecular Dynamics, Histone 9, Methyltransferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metilação da cauda da histona catalisada pela enzima histona metiltransferase.....	16
Figura 2. Estrutura com fitas de DNA circundando um octâmero de histonas.....	21
Figura 3. Reação de obtenção do SAM por meio da Adenosina Trifosfato (ATP) e metionina catalisada pela Adenosina metiltransferase (MAT).....	23
Figura 4. Representação do processo de cooperação SAM-G9a em relação a lisina 9. As setas vermelhas fazem referência ao grupamento metil.....	24
Figura 5. Exemplo de sistema biológico usado em dinâmica molecular.....	26
Figura 6. Curva de RMSD em relação a tempo de 20ns de dinâmica molecular.....	30
Figura 7. Modelo proteico para o preparo dos sistemas utilizados durante dinâmica molecular. Em laranja o peptídeo, em verde o SAM e em azul o sobrepujante da proteína.....	32
Figura 8. Estruturas dos sistemas estudados: H3K9, H3K9I, H3K9M, H3K9A e H3K9Nle respectivamente.....	33
Figura 9. Gráfico com comportamento da distância do sistema nativo (H3K9) durante os 150nanossegundos de dinâmica molecular.....	35
Figura 10. Gráficos com comportamento das distâncias dos mutantes H3K9M e H3K9I, respectivamente, durante os 150ns de dinâmica molecular.....	36
Figura 11. Paralelo entre RMSDs do complexo (a) e da G9a (b) durante a dinâmica molecular.	38
Figura 12. Paralelo entre os RMSDs das histonas mutantes (a) e do cofator SAM (b) presente em cada um dos processos de metiltransferase envolvendo esses mutantes.....	39
Figura 13. RMSD do sistema H3K9M (a) e H3K9I (b) durante dinâmica molecular de 150ns.....	40

Figura 14. Sítio de interação peptídeo-SAM: H3K9M-SAM (a), H3K9I-SAM(b), H3K9A-SAM(c) e H3K9Nle(d). Em cinza cada um dos mutantes investigados e o SAM em predominância verde.....43

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Tabela com sistemas estudados e mutações na posição 9.....	32
Tabela 2. Distância média resultante de 150ns de dinâmica molecular da interação lisina-SAM.....	34
Tabela 3. Tabela com resumo dos valores de IC ₅₀ e ΔG_{exp} determinados para os peptídeos da lisina.....	41
Tabela 4. Tabela com valores de energia calculados computacionalmente (ΔG_{cp}) e STD. Deviation.....	42

ABREVIACOES

DM – Dinâmica Molecular

MT – Metiltransferase

HFT – Histona Fosfotransferase

DNMTs – DNA Metiltransferase

HAT – Histona Acetiltransferase

HMT – Histona Metiltransferase

DNMT3B – DNA Metiltransferase 3 Beta

SAM – S-adenosilmetionina

MEP – Mecanismo Epigenéticos

ΔG_{exp} – Valor de energia livre experimental

ΔG_{cp} – Valor de energia livre computacional

IC50 – Concentrao media inibitória da substância

H3K9 – Histona 3 lisina 9

H3K9A – Mutao da alanina na lisina 9

H3K9M – Mutao da metionina na lisina 9

H3K9Nle – Mutao da norleucina na lisina 9

H3K9I – Mutao da isoleucine na lisina 9

RMSD – Root Mean Square Deviation

NS – Nanosegundos

MM/GBSA – Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area

MM/PBSA – Molecular Mechanics/Poisson–Boltzmann Surface Area

STD. DEV – Standard Deviation (Desvio Padrão)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1.Mecanismo Epigenéticos.....	17
2.2.Histonas.....	19
2.3.SAM e G9a.....	22
2.4.Simulação Computacional.....	24
3.OBJETIVOS.....	27
3.1.Objetivo Geral.....	27
3.2.Objetivo Específico.....	28
METODOLOGIA.....	28
4.1.Modelo Molecular.....	28
4.2.Root Mean Square Deviation.....	29
4.3.Energia por MM/BPSA e MM/GBSA.....	30
4.4.Inibidores.....	31
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
5.1.Modelos Analisados.....	32
5.2.Dinâmica Molecular.....	34
5.3.Calculo de energia.....	41
6.CONCLUSÃO.....	44
7.REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

A epigenética é um dos ramos da ciência que gera grandes discussões na comunidade científica. As características individuais de cada ser vivo estão relacionadas aos fenótipos que irão expressar o comportamento dos genes (OLIVEIRA et al, 2010). Contudo muitas características desenvolvidas no decorrer da vida do ser humano podem ser explicadas pela forma como determinados genes funcionam e como vão influenciar na ocorrência de mecanismos particulares de cada indivíduo (OLIVEIRA et al,2010).

Os mecanismos epigenéticos tem chamado cada vez mais atenção por conta do entendimento de como alterações químicas no DNA, porém sem afetar seu sequenciamento, e proteínas histonas podem descaracterizar a expressão comportamental dos genes (SARTORI; FRASSON,2015; OLIVEIRA et al,2010). Essas reações são influenciadas de acordo com os hábitos de vida de cada indivíduo e são modulados ao decorrer da vida de cada um (COSTA; PACHECO,2013).

Os mecanismos epigenéticos podem ser vistos como os responsáveis por afetar a cromatina e os responsáveis pela modificação química do DNA (KRAUSE et al.,2016), onde essas modificações são reguladas por padrões epigenéticos e por modificações químicas na histona. Entre as modificações epigenéticas destacam-se a metilação, acetilação e fosforilação na cauda da histona como um dos exemplos fundamentais no processo de sinalização atingindo as histonas (KRAUSE et al.,2016).

A ativação e inibição dos genes é algo que faz parte da estrutura envolvendo mecanismos epigenéticos. O desenvolvimento desses processos é coordenado por uma espécie de marcação genética a qual vai decidir como e onde acontecerá a aplicação desses marcadores (FONTES et al.,2015)

As histonas que já chegaram a ser consideradas apenas como constituintes da estrutura do DNA, hoje já são vistas como peças importantíssimas para regulação de processos naturais de equilíbrio do corpo humano que envolvem a cromatina (MENDITI; HYE.,2007) onde as histonas H2A e H2B, H3, H4 se fazem presentes nos nucleossomos e uma histona H1/H5 é responsável pela interação entre o nucleossomo e a fita de DNA (MENDITI; HYE.,2007). As modificações que as histonas sofrem as deixam suscetíveis a afetar o desempenho habitual de suas capacidades em relação as atividades realizadas pela cromatina (MULLER; PRADO., 2008).

Enzimas responsáveis pela modificação na cauda da histona influenciam diretamente nas alterações químicas das histonas. Dentre essas enzimas tem-se a histona

fosfotransferase (HFT), DNA metiltransferase (DNMTs), histona acetiltransferase (HAT) e a histona metiltransferase (HMT) (COSTA; PACHECO,2013). A HMT tem como função adicionar os grupos metil na estrutura da cauda histona completando a metiltransferase (COSTA; PACHECO, 2013; OLIVEIRA, 2012). Na figura 1 é possível observar o resultado do processo de HMT onde ocorre essa adição na posição 9 da lisina na cauda da histona H3.

Figura 1: Metilação da cauda da histona catalisada pela enzima histona metiltransferase



Fonte: Figura adaptada (DORNELES; PERES.,2017).

O estudo em torno desses mecanismos requer a observação a respeito de um ponto importante: a reação de metilação envolvendo a G9a e o S-adenosilmetionina (SAM). A reação envolvendo tanto o SAM como a G9a são de grande valia para a compreensão a respeito do comportamento gênico e os efeitos decorrentes desse processo (SZYF.,2007; TACHIBANA et al.,2008; KARMODIYA et al.,2012).

O grupo metil do processo de transferência da metiltransferase é adicionado ao carbono C5 em um mecanismo natural de regulação (COSTA; PACHECO,2013). Contudo o surgimento de mudanças no processo de metiltransferase levam a problemas iniciais ligados a carcinogênese. Esses problemas estão ligados a enzimas como a DNMT3B que fazem parte do processo de transferência do grupo metil e estão ligados a casos de neoplasmas como o câncer de bexiga e câncer de mama (ISSA, 2000).

Apesar das adversidades apresentadas pela metilação e que muito tem relação com o comportamento epigenético de cada indivíduo, esse mecanismo apresenta também seu lado positivo como regulação gênica e acessibilidade de um dos alelos também conhecido como *imprinting* genômico (COSTA; PACHECO,2013).

Diante deste cenário se faz necessário procurar métodos que ajudem a compreender como esses mecanismos ocorrem, e para isso pode-se utilizar da simulação

computacional a qual já foi provado em trabalhos anteriores que seus resultados demonstram segurança em relação ao experimental (BLASE et al.,1994). A dinâmica molecular (DM) consiste em um método computacional de análise que se baseia na movimentação dos sistemas de interesse em relação ao tempo de simulação (VERLI, H.,2014).

A epigenética tem se mostrado uma área de grande importância para a compreensão de processos biológicos e doenças humanas, incluindo o câncer. Nesse contexto, o objetivo desta dissertação é estudar a inibição da enzima lisina metil transferase G9a usando um tratamento de Dinâmica Molecular. É o método do qual pode ser utilizado para investigação de estruturas físicas e químicas e em principal sistemas biológicos com grandes conglomerados de átomos (VERLI, H.,2014; COUTINHO; MORGAN.,2007). Especificamente, buscou-se determinar a energia de interação entre os resíduos de aminoácidos e do grupo peptídicos selecionados, verificar o comportamento das histonas mutantes em relação ao SAM, realizar cálculos de energia livre, comparar energia livre de ativação calculada com dados experimentais, estudar mutações na enzima histona humana H3 para verificar a importância de cada resíduo na interação enzima-substrato e determinar a origem do poder catalítico enzimático (espacial ou eletrostático) das metiltransferase estudada.

Os resultados desta dissertação fornecem informações relevantes sobre o funcionamento da enzima G9a e sua relação com o processo de metilação de histonas, além de permitir a identificação de possíveis inibidores dessa enzima, que podem ser úteis no tratamento de doenças como o câncer. As simulações computacionais realizadas permitiram verificar o comportamento reacional da histona 3 lisinas 9 e seus mutantes no processo de metiltransferase ligado a G9a, permitindo determinar qual dos sistemas utilizados apresentou maior estabilidade. Portanto, esta dissertação pode contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares e para o desenvolvimento de terapias mais eficazes no tratamento de doenças humanas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mecanismos Epigenéticos

O interesse a respeito do funcionamento de como determinados mecanismos que fazem parte do corpo humano tem crescido cada vez mais. Por definição a epigenética é dita como alterações nos genes que são herdadas, porém que não modificam a sequência

genética do DNA (FANTAPPIE, M.,2013), em outras palavras o próprio corpo humano tem sua maneira de usar ou não alguns de seus genes de acordo com as condições individuais de cada um sem ter que alterar a estrutura do DNA. Essas ativações e inibições de genes são influenciadas conforme a rotina que cada pessoa leva, no entanto, as consequências negativas desses hábitos podem ser suprimidas desde que o estilo de vida seja modificado (COSTA; PACHECO.,2013; MULLER; PRADO.,2008).

A epigenética tem sua ação iniciada desde o processo de mitose no qual será determinada as características que serão expressas ou não no sistema biológico do indivíduo (FANTAPPIE, M.,2013). Como dito anteriormente e baseado em estudos, muitas ativações e inibições podem ser decorrentes de fatores externos, porém há casos que biologicamente ocorrem de maneira natural como o caso dos hormônios sexuais no qual por meio de uma sinalização genética são ativados em certa idade e passam por ser responsáveis pelo aparecimento de novas características no corpo humano (FANTAPPIE, M.,2013).

Diante disso um ponto bem comentado na epigenética é em torno do funcionamento dos marcadores genéticos. A ativação de determinados genes vai depender de como esses marcadores vão decidir ou não na sua utilização (FONTES et al.,2015), tal como uma espécie de sinal. É bem verdade que a influência de fatores externos é algo que tem sido amplamente discutido na epigenética muito por conta dos apontamentos que diversos estudos tem feito em relação aos seres vivos e seus descendentes (FRANCO, M.,2017).

A memória epigenética é um dos traços de investigação científica em relação a capacidade de experiências vividas por um progenitor. Um estudo voltado para isso utilizou camundongos os quais passaram a ser estimulados a reagir de forma negativa quando sentissem um determinado odor (DIAS; RESSLER.,2014). Como resultado os seus descendentes passaram a reagir de forma desconfortável quando expostos ao mesmo cenário. Levando em conta esses fenômenos, fica evidente que a regulação gênica faz parte dos mecanismos que estão associados ao comportamento gênico de cada ser vivo (FRANCO, M.,2017).

O estudo envolvendo os mecanismos epigenéticos tem ganhado cada vez mais força por conta do quão surpreendente podem ser as alterações químicas no DNA e em proteínas histonas que podem manobrar a expressão comportamental dos genes

(SARTORI; FRASSON,2015; OLIVEIRA et al,2010). Esse tipo de processo acaba estando atrelado a causa responsável pela alteração da cromatina visto que estão associados a ativação ou inibição de genes que afetam diretamente os constituintes da própria cromatina (MULLER; PRADO., 2008).

A metilação é um dos processos mais investigados da epigenese onde normalmente o grupo metil, do processo de transferência da metiltransferase, é adicionado ao carbono C5(5-metilcitidina) (COSTA; PACHECO,2013), contudo o surgimento de mudanças no processo de metiltransferase levam a problemas iniciais ligados a carcinogêneses (SILVA et al.,2020).

Como é um mecanismo natural de cada ser humano, é comum que a metilação esteja associada a processos de regulação relacionados ao código genético do homem (DE OLIVEIRA et al.,2010). Sendo assim a relevância em torno do aspecto da metilação é necessária para evitar desarranjos genéticos que possam a vim propiciar o surgimento de patologias (DE OLIVEIRA et al.,2010).

O processo de metilação é caracterizado tanto pela hipometilação que acaba sendo marcada pelo desligamento dos genes supressores de tumor quanto pela hipermetilação com sua capacidade de promoção desses genes (SILVA et al.,2020). Contudo níveis anormais de hipometilação e hipermetilação podem acabar por exercer uma inconstância da regulação do código genético e por consequência influenciar um crescimento celular desordenado gerando o câncer (SILVA et al.,2020).

Além da metilação outros mecanismos epigenéticos se destacam em relação a sua atividade biológica associada a demais estruturas do DNA (KRAUSE et al.,2016). Entre eles vale enfatizar a acetilação, a fosforilação e também a metilação na cauda da histona como um dos cenários no processo de sinalização genética (KRAUSE et al.,2016). Portanto todo o processo de regulação do genoma humano está interligado a maneira como os MEP se desenvolvem nessas estruturas, como o caso da hipermetilação e da hipometilação em que ambas podem ser detectadas em momentos diferentes da doença desde o mecanismo de metilação sofra alguma modificação (DE OLIVEIRA et al.,2010).

2.2 Histonas

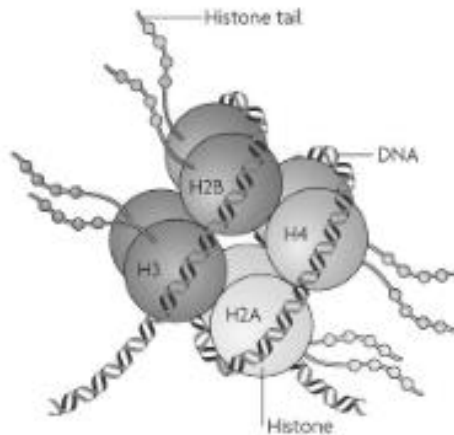
Duas estruturas relacionadas ao DNA são de fundamental importância e estão diretamente envolvidas na regulação da cromatina: as histonas e os nucleossomos

(MULLER; PRADO., 2008). Antes vistas apenas como constituintes sem muita expressão na estrutura do DNA, hoje as histonas já são vistas como partes de extremo valor para o bom desempenho de processos naturais de equilíbrio do corpo humano como um todo (MARGERON et al,2005).

As histonas são proteínas circundadas pelas fitas de DNA, figura 2, que atuam principalmente na regulação dos genes possibilitando que códigos genéticos fiquem armazenados no interior das células (FANTAPPIE, M.,2013). No total são 5 tipos de histonas onde cada uma delas tem sua localização e função definida no DNA (da CUNHA MENDITI; KANG.,2007). A H1/H5 tem a responsabilidade de organização e compactação do nucleossomo, já as histonas H2A, H2B, H3 e H4 fazem parte do octamero formador do nucleossomo (da CUNHA MENDITI; KANG.,2007). Contudo essas proteínas estão suscetíveis a mudanças em suas estruturas, e uma bastante acentuada são as modificações na cauda das histonas (PETERSON; LANIEL,2005). Essas modificações acabam por estarem ligadas a introdução de grupamentos químicos a estrutura da cauda, já que as caudas são sensíveis a mudanças e também apresentam seu teor de basicidade, e conseqüentemente ao desenvolvimento de novos processos epigenético que vão de acordo com o tipo de alterações que podem sofrer (PETERSON; LANIEL,2005; SOUZA-CÁCERES; DE ANDRADE MELO-STERZA.,2017).

Dentre as modificações químicas que as histonas podem sofrer ao longo de sua cauda tem-se a histona fosfotransferase (HFT) oriunda da fosforilação, histona acetiltransferase (HAT) por meio da acetilação e a histona metiltransferase (HMT) decorrente do processo de metilação (COSTA; PACHECO,2013). Como já é notável pela nomenclatura, a HMT adiciona o grupo metil aos resíduos de lisina da histona confirmando o processo de metiltransferase (COSTA; PACHECO, 2013; OLIVEIRA., 2012).

Figura 2: Estrutura com fitas de DNA circundando um octâmero de histonas



Fonte: (TSANKOVA et al., 2007)

A metilação nas histonas pode ocorrer tanto na lisina como também na arginina sendo que a histona H3 fica mais suscetível ao ataque tanto posição 4 como posição 9 (H3K4 e H3K9) (SOUZA-CARCÉRES; DE ANDRADE MELO-STERZA, 2017). Essas modificações químicas são responsáveis pela ativação de funções importantes em mamíferos onde as células eucariontes sofrem um tipo de compressão, ou condensação, antes de se dividir (SOUZA-CARCÉRES; DE ANDRADE MELO-STERZA, 2017).

O grupo metil decorrente do processo envolvendo a HMT é proveniente do SAM que cede esse grupamento a histona visando atingir condensação da cromatina (SZYF, 2007; SOUZA-CARCÉRES; DE ANDRADE MELO-STERZA, 2017). As funções executadas pela H3K9 são determinadas pelo tipo de mecanismo químico que a afeta: ativação de genes por acetilação e silenciamento por meio da metilação (KARMODIYA et al.,2012). É importante citar que o processo envolvendo lisina (K) e a metilação pode ser mono, di ou trimetilado sendo que essas características de repressão estão ligadas as modificações di e trimetiladas (SOUZA-CARCÉRES; DE ANDRADE MELO-STERZA, 2017).

De certa maneira os processos desenvolvidos na H3K9 estão relacionados a enzima G9a que é responsável pela catalise da metiltransferase na histona 3 em resíduos de lisina 9 e lisina 27 (TACHIBANA et al.,2008). Um outro fato ligado a H3K9 é a sua relação com a região condensada da cromatina: a heterocromatina. Essa região está

associada a H3K9 por haver também silenciamento de genes neste território (AUDERGON et al.,2015).

É por esse e outros motivos que o interesse pelo estudo envolvendo as histonas, em especial a H3, e também sua região específica, tem crescido cada vez mais tendo em vista não só compreender o papel como reguladoras de processos celulares, mas como se dão os mecanismos associados a essa proteína e a doenças relacionadas a problemas do processo epigenético (MELLOR, J.,2006).

2.3 SAM e G9a

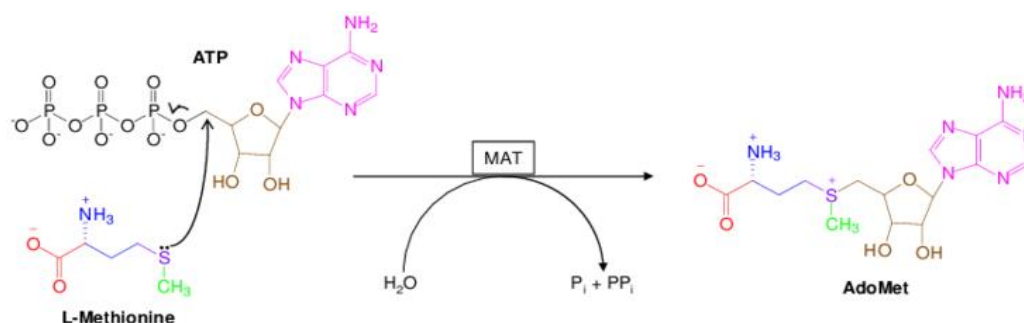
O S-adenosilmetionina (SAM) é uma molécula natural produzida no corpo humano por meio da reação envolvendo a adenosina trifosfato (ATP) e a metionina através de uma enzima denominada de metionina adenosiltransferase (MAT) visualizada na figura 3. O SAM tem como papel participar de inúmeros processos de regulação tanto metabólicos, como de síntese e também da metiltransferase no qual acaba sendo a principal doadora de grupamentos metil (JAYARAM et al.,2016; DUCE et al.,1998).

O ramo farmacêutico também conta produção laboratorial por essa molécula em razão do interesse que surge a partir da possibilidade de tratamento utilizando fármacos em doenças hepáticas, hepatotoxicidade e até vesiculares (FRIEDEL et al.,1998). Além disso há disponibilidade dessa molécula em fármacos voltados para a medicina veterinária para tratamento de hepatopatia e até distúrbios cognitivos em alguns casos de animais (PAPICH, M. G.,2012).

O trabalho desempenhado pelo SAM é basicamente voltado a transferência do grupo metil, contudo esse papel é o responsável pela normalização de atividades enzimáticas desenvolvidas (FRIEDEL et al.,1998; PAPICH, M.G.,2012). Em caso de alguma desordem afetando o processo metabólico natural do SAM, o aparecimento de doenças que atingem o fígado se torna bem comum já que é nesta região que a molécula é produzida (FRIEDEL et al.,1998).

A transferência do grupo metil é importante porque além da participação na condensação de células eucariotas, como apresentado no caso das histonas, há contribuição também em processos de desintoxicação do excesso de produtos químicos que podem vim ocasionar doenças hepáticas (FRIEDEL et al.,1998).

Figura 3: Reação de obtenção do SAM por meio da Adenosina Trifosfato (ATP) e metionina catalisada pela Adenosina metiltransferase (MAT).



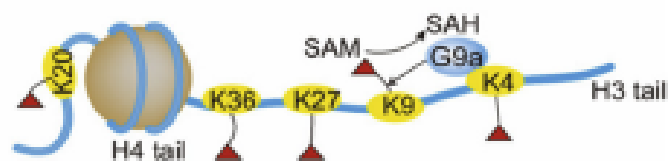
Fonte (SUFRIN et al.,2009)

Contudo chega a ser bem comum a cooperação entre diversos sistemas biológicos para que processos químicos que ocorrem em nosso corpo aconteçam de maneira correta. Entre essas relações podemos ver a do SAM-G9a o qual a cooperação entre eles ocorre de maneira que a G9a catalise a reação de forma a propiciar o processo de metilação feito pelo SAM (CAO et al.,2019).

Podendo ser conhecida também como EHMT2(Eucromática Histona Metiltransferase 2), a G9a é uma proteína de importante papel no desenvolvimento de vários processos biológicos os quais estão diretamente ligados a regulação do DNA e sem contar que sua participação nos processos de metilação na histona H3K9 é bastante acentuada quando se trata de mono e dimetilação (CAO et al.,2019). Além disso há indicação do papel da G9a em relação ao HIV-1 pro viral sendo silenciado por um então estado de latência celular (IMAI et al.,2010).

Estudos indicam o poder significativo da G9a como repressora da atividade de crescimento de células cancerosas (WANG et al.,2017) sendo notado principalmente em neoplasmas malignos afetando a bexiga, fígados e até associados a próstata (CAO et al.,2019). A cooperação da G9a em função ao SAM e H3K9, como visto na figura 4, permite a interação entre os dois sistemas a ponto de gerar uma estabilidade, ou seja, o processo de metilação em relação a histona é processada pela função catalítica expressa pela G9a juntamente ao SAM (CAO et al.,2019; JAYARAM et al.,2016).

Figura 4: Representação do processo de cooperação SAM-G9a em relação a lisina
9. As setas vermelhas fazem referência ao grupamento metil.



Fonte: Figura adaptada (CAO et al.,2019)

Fica nítido que notabilidade que coadjuvação entre o SAM e a G9a é significativo para evitar problemas como hipometilação onde existindo algum mutante que venha inibir a atividade catalítica da G9a propicie a ocorrência da formação de células cancerígenas. Contudo é importante salientar que o poder de atuação da G9a proporciona a metilação de H3K9 por todo código genético (FLESHER; FISCHER.,2021).

2.4 Simulação Computacional

Com o decorrer dos anos, a ciência foi necessitando cada vez mais de ferramentas com o intuito de aumentar seu alcance em busca dos resultados almejados. Químicos teóricos limitavam-se ao uso de exemplares analíticos para estudarem moléculas e suas formas estruturais e também como esses sistemas interagem entre si (HASE.,2013).

O surgimento da simulação computacional propiciou ainda mais possibilidades de análises em diversas áreas e quando refere-se a química, há um imenso leque de possibilidades de como pode ser aplicada (HASE.,2013). Basicamente o ponto principal da simulação computacional é utilizar de técnicas computacionais e modelos matemáticos no intuito de analisar e encontrar soluções tanto para problemas microscópicos como macroscópicos (CAROBIN; NETO., 2003).

A química computacional consiste em utilizar de modelos matemáticos aplicados a softwares, seguindo parâmetros químicos e abrangendo a mecânica quântica para então obter respostas para diversos processos (CAROBIN; NETO., 2003). Por meio dela é possível analisar diversos sistemas, entre eles: nanoestruturas, nanopartículas, moléculas, proteínas e entre outros sistemas (CAROBIN; NETO., 2003).

Um outro ponto envolvendo a química computacional é a sua confiabilidade. Grupos de pesquisadores já demonstraram essa confiabilidade por predizer determinadas propriedades físico-químicas de um material, através dos cálculos computacionais, antes mesmo dele ser sintetizado (BLASE et al.,1994). Contudo é de fundamental importância definir o método adequado para a realização dos cálculos, onde a escolha desse método é importante para a precisão da simulação (ATINKS et al.,2009).

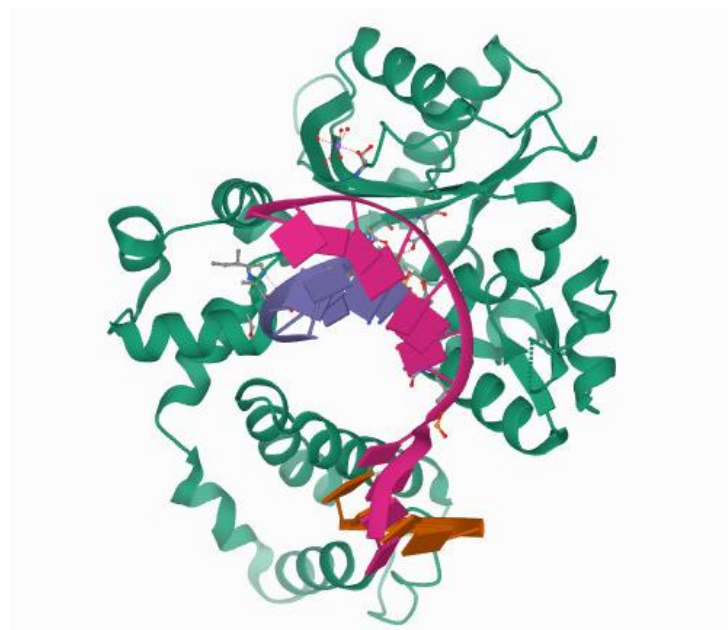
Dentre essas técnicas podemos citar: *AB initio*, Hartree-Fock, Semiempíricos, Teoria Funcional da Densidade (DFT) e a Dinâmica Molecular. Neste trabalho utiliza-se da dinâmica molecular para investigação do mecanismo catalítico da enzima lisina metiltransferase G9a. Estudar DM significa traçar estratégias de análises que variam de acordo com a necessidade do pesquisador, podendo ir de desde análises do comportamento de trajetória dos sistemas até verificação de energia desses sistemas com a realização da simulação (VERLI, H.,2014). Essa técnica baseia-se na análise do movimento dos sistemas em relação ao tempo, ou seja, o movimento dinâmico pelo tempo garante que a simulação seja ideal para investigação de sistemas biológicos (VERLI, H.,2014). O movimento molecular de cada sistema durante a realização da dinâmica é descrito pelo campo de força do qual utiliza de equações matemáticas para descrever alguns detalhes como comprimento de ligações e o comportamento dos ângulos no decorrer da dinâmica (VERLI, H.,2014).

A utilização do campo de força é fator importante na realização da simulação por DM pelo fato de que como os sistemas estudados não permanecem estáticos sempre haverá uma movimentação molecular de todo o sistema. Levando em conta as ligações entre os átomos presentes para a formação de moléculas e essas moléculas interagindo com outras durante a simulação, forças intermoleculares estarão presentes e o campo de força irá descrever essa condição (VERLI, H.,2014).

Realizar dinâmica molecular inclui levar alguns fatores em consideração antes do início da simulação até porque alguns sistemas levam conglomerados de átomos como na figura 5. Como o interesse é proporcionar simulações análogas a sistemas biológicos ou experimentais, é preciso levar em consideração a relação soluto-solvente do complexo (VERLI, H.,2014). Utiliza-se de uma caixa geométrica contendo solvente, na maioria dos casos é água, no qual ela segue as condições periódicas de contorno, ou seja, a caixa será reproduzida em todas as dimensões possíveis para evitar que exista interação do complexo estudado com sua própria imagem devido a constante movimentação durante a DM (VERLI, H.,2014). Os tipos de caixa que podem ser

utilizadas variam em relação ao seu formato geométrico onde geralmente são mais utilizadas as cúbicas e octaédricas (VERLI, H.,2014; NAMBA et al.,2008).

Figura 5: Modelo proteico usado em dinâmica molecular. DNA polimerase lambda(cod-5ijj).



Fonte: (BURAK et al.,2016)

Um outro ponto importante no processo de dinâmica molecular é a minimização de energia. Como a interação entre o soluto e o solvente acaba sendo fator natural da DM é necessário que exista uma concomitância entre ambos para evitar qualquer elevação significativa de energia oriunda naquele sistema (VERLI, H.,2014; NAMBA et al.,2008). Uma conformação equivocada presente no complexo estudado pode ocasionar um aumento significativo de energia e por consequência romper a simulação envolvendo os sistemas de interesse (VERLI, H.,2014; NAMBA et al.,2008). Diante dessa situação é importante a realização da otimização do sistema com o intuito de encontrar a melhor formação das estruturas para então chegar a um mínimo de energia e por consequência a forma mais estável dos objetos de estudo (NAMBA et al.,2008).

O comportamento do movimento dinâmico dessas estruturas progride com o decorrer do tempo. Manter as estruturas equilibradas torna-se importante para que o pesquisador tenha controle do seu objeto de estudo e não se defronte com movimentos que fujam o interesse da pesquisa (VERLI, H.,2014). Por conta disso o tempo de simulação deve ser proporcional ao tipo de material que está sendo trabalhado, ou seja,

um complexo de proteínas dependendo do seu tamanho não pode ser avaliado com um tempo de simulação considerado curto, entretanto não só basta determinar o tempo de simulação em relação ao sistema (SANT, C. M. R.,2009; VERLI, H.,2014). O custo computacional é algo que deve ser levado em consideração já que em alguns casos, dependendo o acervo computacional, dinâmicas extremamente longas se tornam inviáveis de serem executadas. Portanto materiais que cuja amostragem é bem expressiva acaba por exigir a utilização dos chamados clusters (VERLI, H.,2014; NAMBA et al.,2008).

O ponto inicial de uma dinâmica molecular envolve a utilização da proteína obtida por meio de um banco de dados recheado de estruturas alcançadas por diferentes métodos científicos: RMN, difração de raio X e procedimentos cristalográficos (BERMAN et al.,2000). Determinada a estrutura inicial é importante definir os parâmetros os quais esse complexo será inserido, sendo a pressão e o volume fatores presentes no período de equilíbrio (VERLI, H.,2014).

Fazer uso da DM é poder contar com uma ferramenta importantíssima para o estudo sistemas proteicos, desenvolvimento de fármacos e até mesmo a investigação de outras biomoléculas (VERLI, H.,2014). Contudo algumas de suas limitações fazem com que a dinâmica molecular possa vir a ser utilizada com métodos híbridos: o chamado QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics) (VERLI, H.,2014).

Por conta disso a qualidade dos resultados só vem crescendo no decorrer dos anos. Tudo isso em decorrência da evolução de programas de computadores utilizados para DM e na sofisticação das máquinas que desenvolvem esse cálculo. Sendo assim a dinâmica molecular acaba sendo um modelo confiável para a execução de grandes conjuntos atômicos que necessitam representar o comportamento biológico e de alto valor no auxílio de experimentos envolvendo esses tipos de sistemas (VERLI, H.,2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a reação da enzima lisina metil transferase G9a usando um tratamento de Dinâmica Molecular e cálculos de energia livre de ligação.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a energia de interação entre os resíduos de aminoácidos e do grupo peptídicos selecionados;
- Verificar o comportamento das histonas mutantes em relação ao SAM
- Realizar cálculos de energia livre;
- Comparar energia livre de ativação calculada com dados experimentais;
- Estudar mutações na enzima histona humana H3 para verificar a importância de cada resíduo na interação enzima-substrato.
- Determinar a origem dos mecanismos de inibição enzimático (espacial ou eletrostático) das metiltransferase estudada.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo Molecular

As simulações de Dinâmica Molecular (MD) foram realizadas no software AMBER com tempo de simulação de 150ns. A estrutura utilizada como ponto de partida para a montagem dos sistemas utilizados foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN et al.,2000). Os dados que resultam nessas estruturas obtidas por RMN e cristalografia de raio X demonstram o alto nível de confiabilidade dos modelos moleculares apresentados (PINTO et al.,2020).

Foram cinco sistemas analisados de complexos da enzima G9a-H3 sendo eles a H3 nativa H3K9 e mutações da H3K9 (H3K9A, H3K9M, H3K9I, H3K9Nle) todos em complexos com o coligante SAM. Os campos de força de todos os átomos CHARMM32m e CHARMM General Force Field (CGenFF) serviram como fonte de parametrização (PHILLIPS et al.,2004). As cargas de proteína foram calculadas em Gaussian 09 usando o método Hartree-Fock com base 6-31G. A solvatação se deu com um modelo explícito TIP3P em uma caixa de água octaédrica truncada.

Um valor de corte de 10,0 Å foi usado como distância entre a parede celular e os átomos solvatados do sistema. Para neutralizar as cargas do sistema foram adicionados contra-íons eletricamente neutros. Moléculas de água, hidrogênios, íons e toda a estrutura da proteína foram minimizados por cinco etapas de minimização usando a descida mais acentuada e gradiente conjugado com relaxamento progressivo das restrições.

Em seguida, todo o sistema foi aquecido através de 14 etapas de aquecimento. A 1ª etapa de aquecimento foi realizada a volume constante durante 5 ps (0 a 5K), depois da 2ª etapa até a 7ª etapa, utilizamos 50 ps para elevar a temperatura gradualmente de 5 a 300K. Por fim, a partir da 7ª etapa de aquecimento, a temperatura atinge 300 K, sendo mantida na 14ª. Realizamos 2 ns de simulação MD para equilibrar a densidade do sistema a pressão constante (1 bar) mantendo a temperatura em 300K.

Todas as ligações de hidrogênio foram mantidas em suas distâncias de equilíbrio pré-definidas durante a minimização com o algoritmo Shake para estabelecer o equilíbrio do sistema. Para verificar visualmente as estruturas estudadas foi usado o programa VMD (HSIN et al.,2008).

4.2 Root Mean Square Deviation (RMSD)

Amplamente utilizado no estudo de sistemas biológicos, o Root Mean Square Deviation ou abreviadamente RMSD garante a possibilidade da verificação do comportamento de uma proteína do início ao fim da dinâmica molecular (AIER et al.,2016).

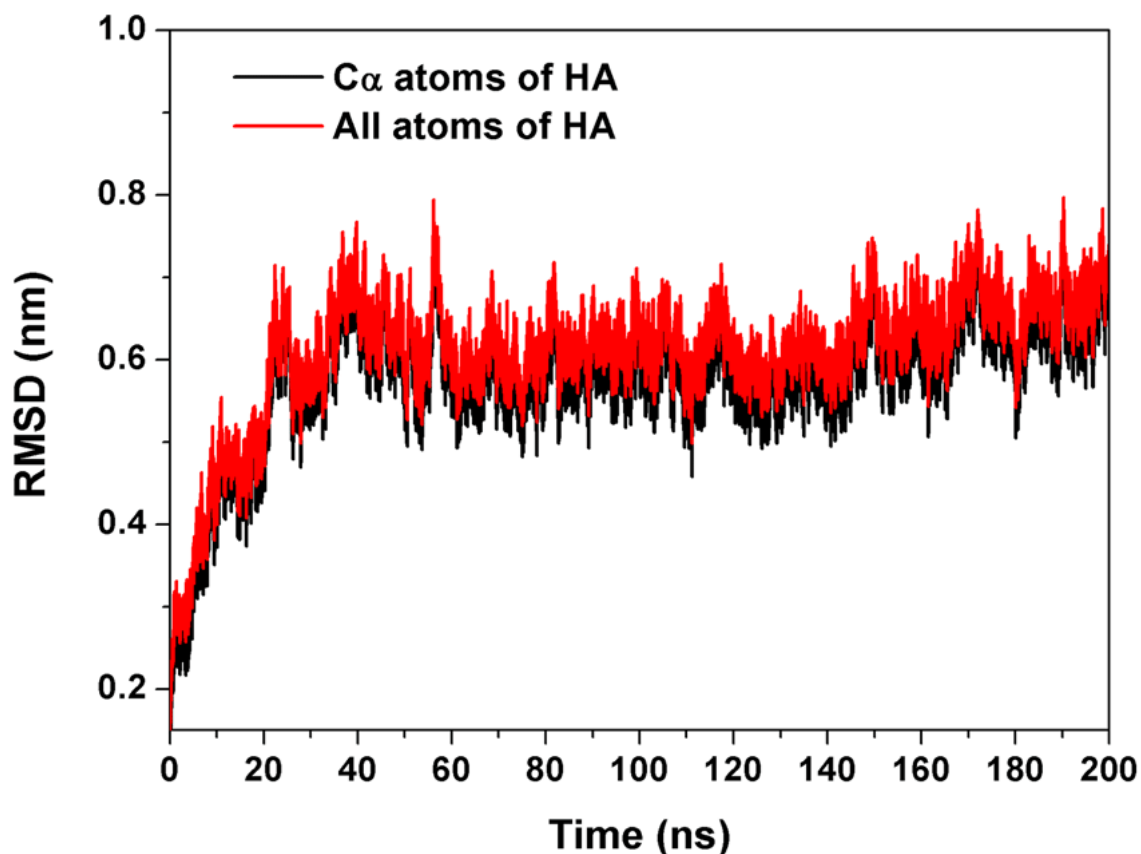
O cálculo via RMSD é descrito computacionalmente através da equação 1:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2} \quad (1)$$

no qual leva-se em consideração a distância (δ_i) entre o átomo (i) e um arranjo de referência da posição de N átomos correspondentes, geralmente da cadeia lateral da estrutura.

O RMSD permite a observação do comportamento de sistemas macromoleculares durante todo tempo de simulação. Os resultados vistos no RMSD são expressos por uma coordenada X remetente ao tempo de simulação e uma coordenada Y em jus a curva de RMSD como pode ser visto na figura 6.

Figura 6: Curva de RMSD em relação a tempo de 200ns de dinâmica molecular.



Fonte: (GUAN et al.,2017)

Curvas mais acentuadas no RMSD fazem referências as modificações sofridas pela proteína ao longo do tempo de dinâmica molecular no intuito de alcançar a melhor conformação e conseqüentemente atingir a estabilidade.

4.3 Energia por MM/PBSA e MM/GBSA

Cálculos de energia foram realizados como um dos objetivos a comparação com os valores experimentais fornecidos na literatura (JAYARAM,2016) além de observar a estabilidade desses sistemas por meio desses resultados.

Realizar cálculos de energia para ligantes e macromoléculas biológicas é um dos artifícios da dinâmica molecular. Utilizar o método de MM/PBSA e MM/GBSA é uma forma de aferir valores de energia livre de ligação para sistemas proteicos compostos por uma grande quantidade de átomos (GENHEDEN; RYDE.,2015).

Em MM/PBSA os valores de energia livre são calculados pela soma dos termos conformacionais de mecânica molecular (MM), contribuições polares e apolares para a energia livre de solvatação juntamente a temperatura absoluta (T) do sistema e a entropia (S) relacionada como visto na equação 2.

$$G = E_{bnd} + E_{el} + E_{VDW} + G_{pol} + G_{np} - TS \quad (2)$$

Onde os termos conformacionais (E) são de ligação, eletrostáticos e de Van der Walls, as contribuições polares e apolares (G_{pol} e G_{np}), sendo as contribuições polares podendo serem abordadas via MM/GBSA, da energia livre de solvatação.

Levando em consideração a utilização da estrutura inicial o método de MM/PBSA torna-se de grande valia para conformação de cálculos de ligação onde economizará esforço computacional (GENHEDEN; RYDE.,2015). Além disso método de MM/PBSA e MM/GBSA que se encontram disponíveis no pacote Amber. As duas vias do cálculo por *Poisson-Boltzman* e *Generalized Born Surface* permitem grande praticidade por seu poder de reprodutibilidade e além de apresentar correções que possibilitem trabalhar com simulações independentes do seu tempo (GENHEDEN; RYDE.,2015).

4.4 Inibidores

Investigar a capacidade de inibição de algumas substâncias é importante para determinação do poder de bloqueio de suas atividades enzimáticas no meio reacional. A histona 3 lisina 9 (H3K9) tem mutações responsáveis por complicações no poder catalítico da G9a, tendo em vista isso 4 mutantes relacionados ao sistema nativo (H3K9) foram utilizados.

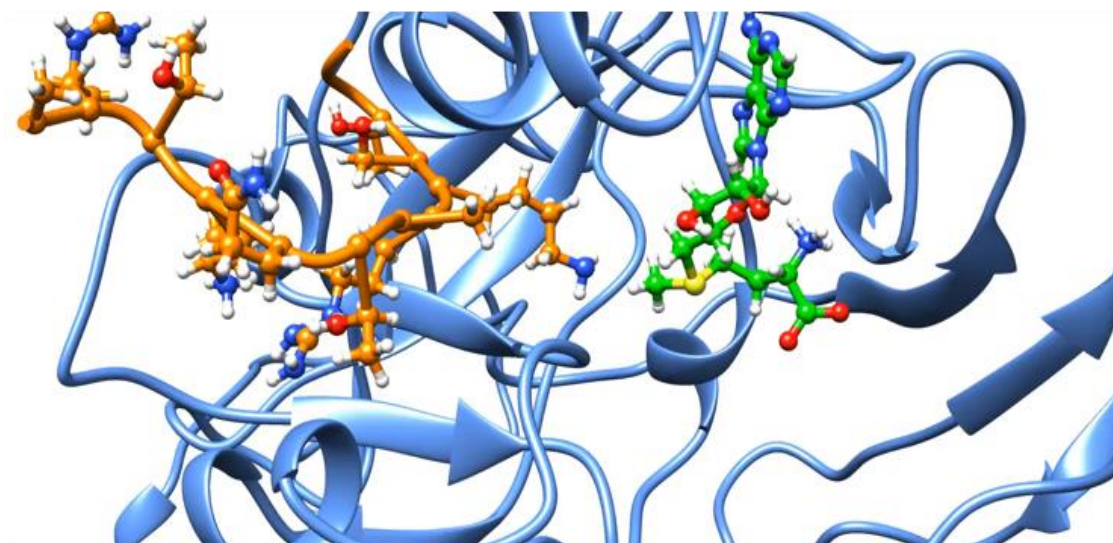
A verificação do desempenho de cada um dos mutantes da lisina 9 (K9) é um ponto deste trabalho. A partir do momento em que alguma dessas mutações tem o melhor desempenho durante a reação química envolvendo o SAM e a G9a há contratempos na metilação e por conseguinte ocasionando anomalias que podem vir gerar neoplasmas malignos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Modelos analisados

Para este trabalho foi utilizado a estrutura 5TTF (código PDB) obtida do *Protein Data Bank* como ponto inicial, figura 6, para o preparo dos sistemas mutantes que foram utilizados no decorrer deste trabalho.

Figura 7: Modelo proteico para o preparo dos sistemas utilizados durante dinâmica molecular. Em laranja o peptídeo, em verde o SAM e em azul o sobrepujante da proteína.



Fonte: (próprio autor.,2023)

Para a análise das mutações da histona H3K9 todas as modificações foram feitas a partir da mudança na cadeia lateral com base na estrutura nativa. No total foram 5 modelos investigados os quais um deles é o sistema nativo (H3K9) e os outros quatro são mutações que essa lisina sofreu na posição 9 por conta do mecanismo reacional estudado. Na tabela 1 estão listados os peptídeos estudados e as mutações os quais sofreram.

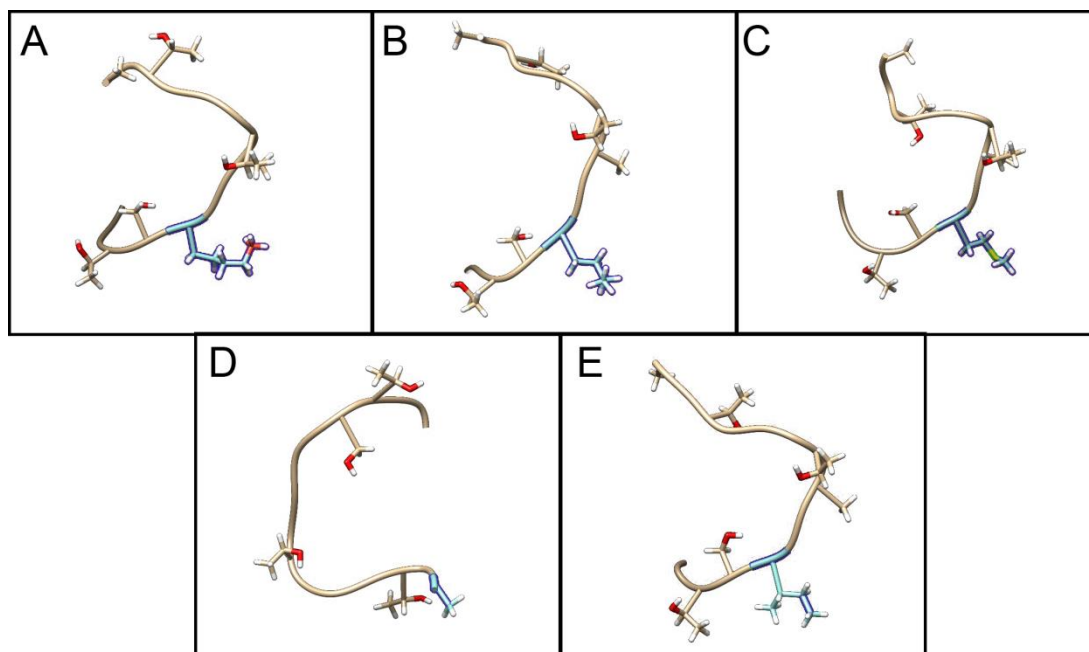
Tabela 1. Sistemas estudados e mutações na posição 9.

Peptídeos	Mutações
H3K9	nativo
H3K9I	K – I
H3K9M	K – M
H3K9A	K – A
H3K9Nle	K – Nle

Fonte: (Próprio autor.,2023)

Esses objetos de estudo são importantes para a verificação da possibilidade de ação inibitória desses mutantes em relação a enzima G9a. Na figura 8 é possível ver a imagem da estrutura tridimensional desses sistemas mencionados na tabela 1.

Figura 8: Estruturas dos sistemas estudados: H3K9, H3K9I, H3K9M, H3K9A e H3K9Nle em (a), (b), (c), (d), (e) respectivamente.



Fonte: (Próprio autor.,2023)

Sendo assim, por meio das estruturas apresentadas, este trabalho contempla a determinação de energia resultante da interação do mecanismo da G9a, a distância entre os sistemas que interagem e a curva de RMSD.

Como mencionado antes, em português conhecido como Desvio Quadrático Médio, o RMSD trata da análise do comportamento estrutural do sistema estudado em relação a trajetória da dinâmica (MAIOROV; CRIPPEN.,1994). O RMSD permite com que o usuário analise o comportamento do sistema e verifique a sua estabilidade de acordo com o tempo de dinâmica executado (COHEN; STERBERG.,1980).

Foi realizado o alinhamento do PDB base, figura 7, e os mutantes citados anteriormente a partir da estrutura nativa.

5.2 Dinâmica Molecular

A realização da dinâmica molecular permitiu a obtenção de dados que são interpretados em distância entre os sistemas de interesse, lisina e S-adenosilmetionina, e análise de trajetória por meio do RMSD e distâncias.

É importante ressaltar que a interação lisina-SAM é crucial para a atividade biológica da enzima que adiciona grupos metil à histona H3 na posição K9, e a alteração da lisina para outros aminoácidos pode afetar essa interação. A Tabela 2 mostra os valores de distâncias médias entre a Lisina (K9) e o SAM, obtidas a partir de dinâmica molecular, para cinco sistemas diferentes: H3K9 (nativo), H3K9M, H3K9I, H3K9Nle e H3K9A. As medidas foram tiradas do átomo mais pesado da cadeia lateral do peptídeo até o grupo metil ligado ao enxofre do SAM como resultado de uma DM com tempo de duração de 150 ns para todos os sistemas.

Tabela 2. Distâncias médias resultante de 150ns de dinâmica molecular da interação lisina-SAM.

Estruturas	H3K9	H3K9M	H3K9I	H3K9Nle	H3K9A
Distância Média (Å)	3,36±0,33	3,53±0,07	4,13±0,34	3,97±0,35	6,42±0,64

Fonte: (próprio autor.,2023)

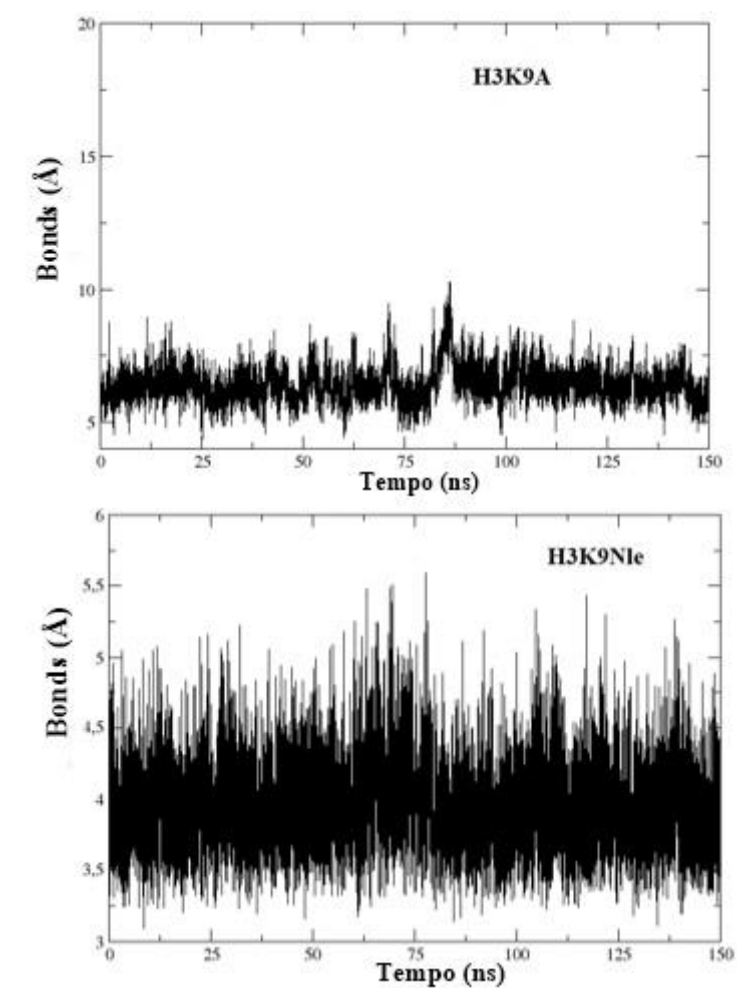
É possível observar que as mutações na lisina afetaram significativamente a interação com o SAM e, conseqüentemente, devem impactar na atividade biológica da enzima. Destaca-se a mutação H3K9M, a qual resultou em uma distância média menor entre a lisina e o SAM e também um desvio padrão menor em comparação com os outros mutantes, indicando uma interação mais próxima e mais estável entre esses dois grupos. Esse resultado é consistente com resultados experimentais (Tabela 3), que mostram um valor de IC50 mais baixo para o peptídeo H3K9M, indicando uma maior afinidade entre esse peptídeo e a enzima.

De maneira similar, a mutação H3K9Nle resultou no valor menor distância média entre a lisina e o SAM se comparando com H3K9I e H3K9A, porém valor de desvio padrão superior contrastando com o H3K9I indicando uma menor interação entre enzima e peptídeo. Isso é consistente com a Tabela 3, que mostra valores de IC50 mais baixos para esse peptídeo, indicando uma maior afinidade entre esses peptídeos e a enzima e uma distância razoável favorável à captação de SAM na interação.

A mutação H3K9I resultou em uma distância média maior entre a lisina e o SAM em comparação com a lisina nativa, indicando uma interação razoável entre esses dois grupos. Esse resultado é consistente com resultados experimentais, que mostram valores de IC50 muito altos ou que não impactaram nas concentrações de produto do meio, principalmente para o peptídeo H3K9A, indicando uma baixa afinidade entre esse peptídeo tanto pela enzima quanto pelo SAM. Na figura 14 é possível ver a interação entre esses quatro mutantes e o cofator enzimático SAM, onde é nítida a fraca interação entre o H3K9A e o SAM, como exposto na tabela 2.

A Figura 9 mostra os gráficos de distância dos mutantes H3K9A e H3K9Nle e o comportamento dos mesmos durante todo o tempo de dinâmica molecular.

Figura 9: Gráfico com comportamento de distância do H3K9A e H3K9Nle durante os 150nanossegundos de dinâmica molecular.

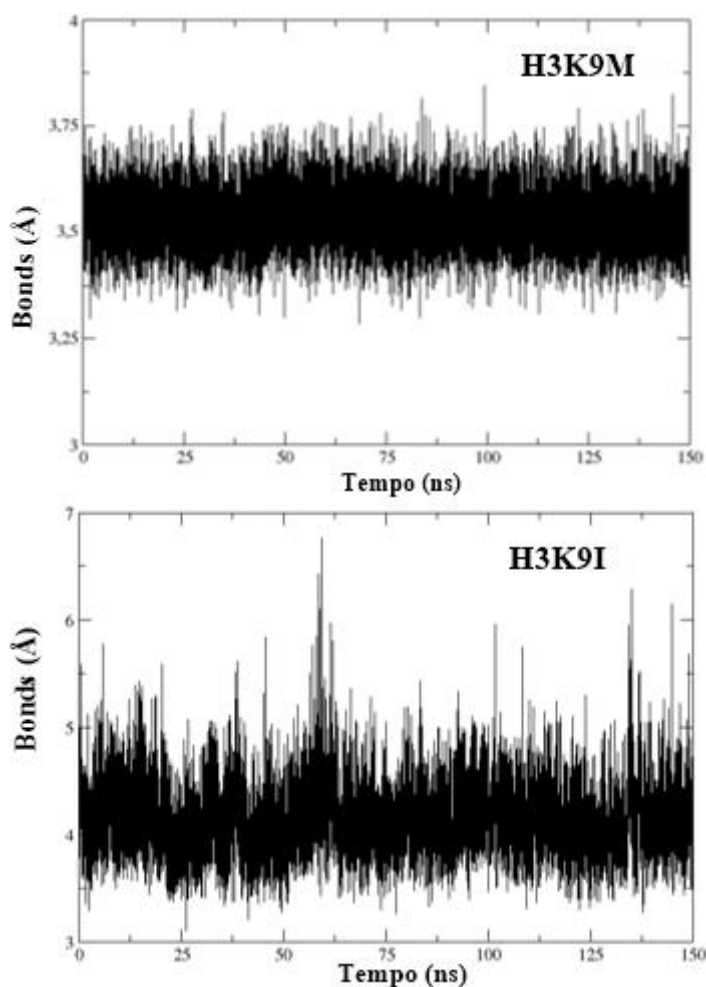


Fonte: (próprio autor.,2023)

Os gráficos acima transparecem as informações dispostas na tabela 2. O valor baixo de desvio padrão do mutante H3K9Nle vai de acordo com o que é mostrado no gráfico. Percebe-se que o maior ponto de distância que a interação entre o SAM e o peptídeo alcançou foi superior a $5,5\text{\AA}$ em torno de 75ns de simulação computacional. O H3K9A, como mencionado anteriormente, apresentou o maior valor de distância média do sítio reativo entre os objetos estudados no qual o maior valor de distância foi superior a 10\AA por volta de 87,5ns de dinâmica molecular, indicando uma baixa estabilidade do complexo e saída do sítio. Esses valores e análises mostram uma baixa estabilidade entre certas mutações e o SAM ao ponto de levar a uma interação temporária.

A figura 10 já apresenta os gráficos referentes aos dois sistemas que apresentaram os valores de distâncias que mais se destacaram entre os mutantes avaliados.

Figura 10: Gráficos com comportamento das distâncias dos mutantes H3K9M e H3K9I, respectivamente, durante os 150ns de dinâmica molecular.



Fonte: (próprio autor.,2023)

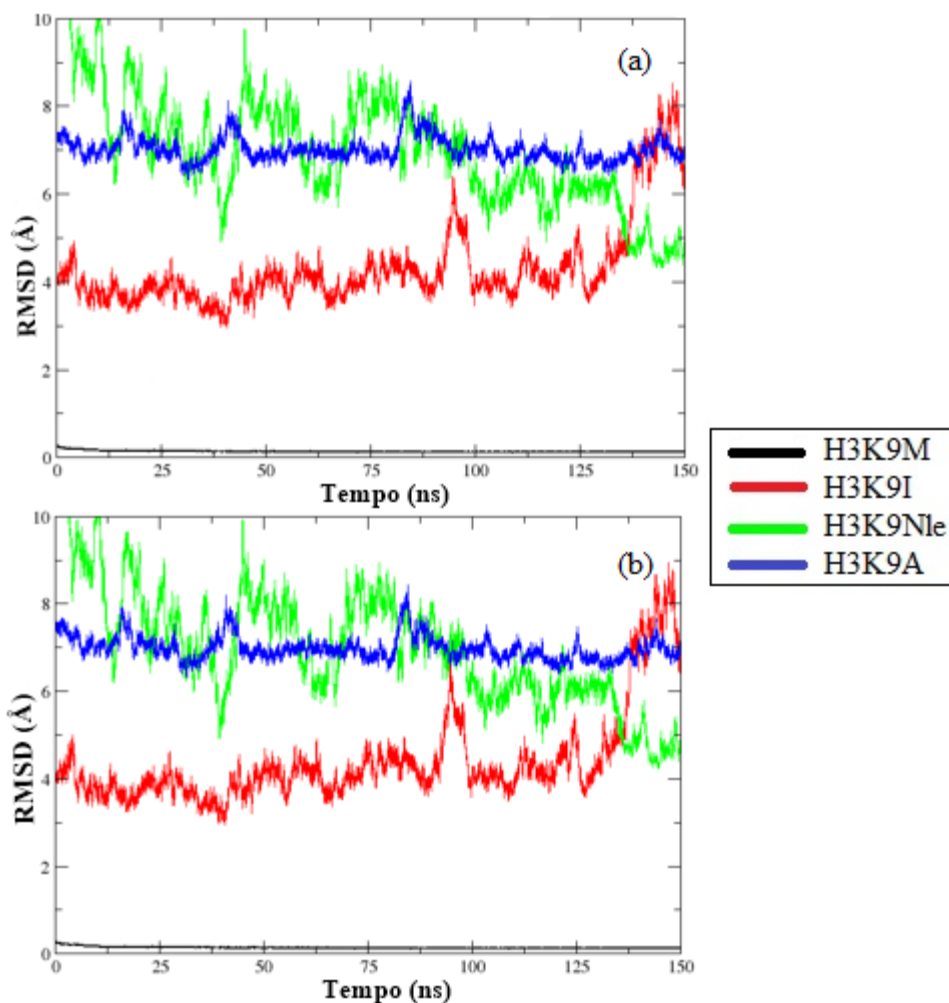
É evidente a uniformidade do mutante H3K9M durante todo o tempo de dinâmica molecular. O resultado exposto no gráfico reflete a confiabilidade mostrada na tabela 2 onde o sistema não sofreu nenhum salto discrepante nas distâncias medidas durante os 150ns de dinâmica molecular. Sendo assim, previamente por meio dessas análises, o mutante K9M apresentou a melhor estabilidade até aqui.

O mutante H3K9I já apresentou comportamento com baixa variação em alguns pontos do tempo de dinâmica molecular. Os intervalos os quais surgiram picos elevados reflete que o sistema procurou alcançar a melhor conformação possível para atingir estabilidade. Sendo assim os valores apresentados na tabela 2 e os gráficos acima confirmam o destaque que tanto o H3K9M e H3K9I obtiveram durante os 150ns de simulação.

Para observar o comportamento de todo sistema durante a trajetória de dinâmica molecular, foram gerados gráficos de RMSD. Sendo uma ótima ferramenta para estudos envolvendo proteínas, o RMSD permite ver de fato como o sistema se comportou com o intuito de alcançar sua melhor conformação e conseqüentemente sua forma mais estável (CARUGO, Oliviero.,2003).

Basicamente cada um dos cinco sistemas utilizados nesse trabalho pode ser analisado em 4 componentes: G9a, a histona (peptídeo), o SAM e o complexo do sistema que envolve os 3 componentes anteriores, porém sem contar com a caixa d'água usada na dinâmica molecular. A ideia de verificar o *Root Mean Square Deviation* de cada componente é saber como foi desempenho deles durante a simulação. Na figura 11 e 12 podemos ver o RMSD dessas partes e verificar como foi o comportamento durante os 150ns de DM. A figura 11 faz a comparação do RMSD do complexo (a) com a G9a (b). Nesse RMSD é possível observar a influência da grande participação da proteína G9a nos resultados do complexo. Dada anteriormente as características e notoriedade dessa proteína no que consiste o processo de metiltransferase e o complexo como o sistema de interação por completo (G9a, histona e SAM) é comum o resultado paralelo expresso nos RMSDs.

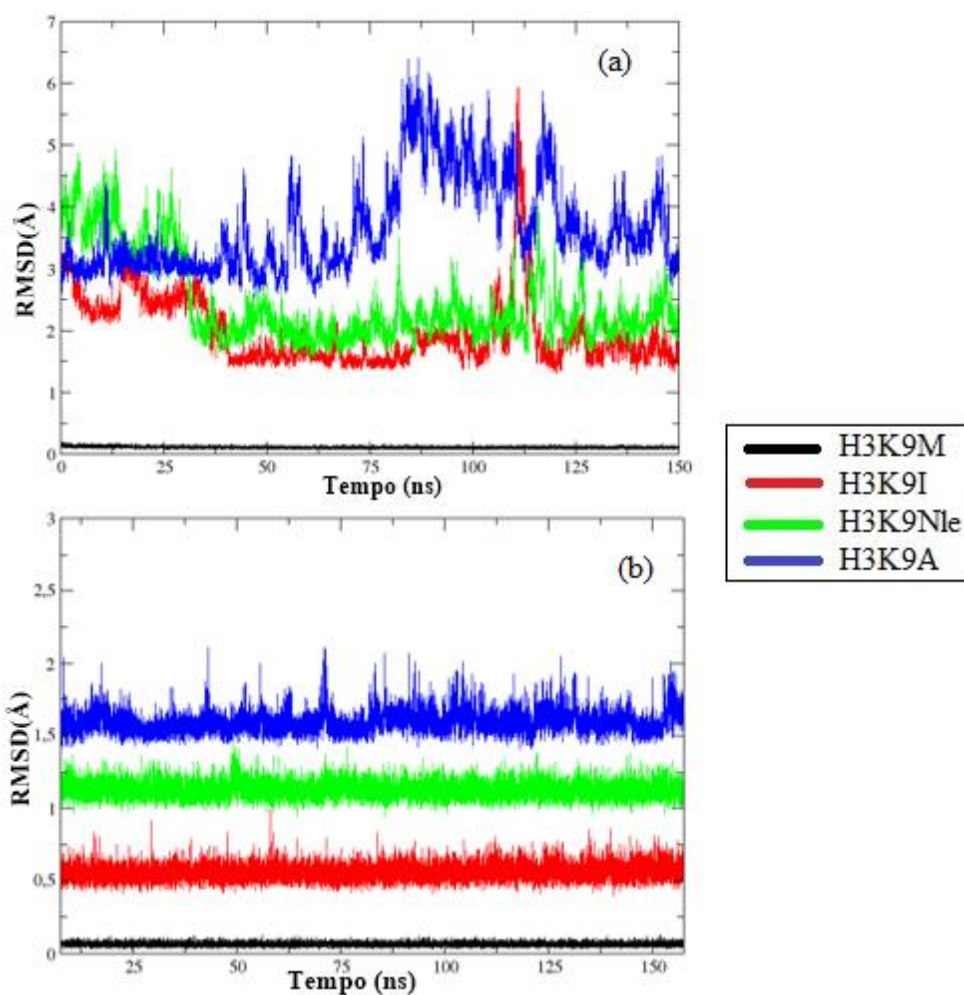
Figura 11: Paralelo entre RMSDs do complexo (a) e da G9a (b) durante a dinâmica molecular



Fonte: (próprio autor.,2023)

A figura 12 já mostra simultaneamente os RMSDs tanto da histona(a) como do SAM (b) de cada um dos sistemas. Analisando as histonas (a), o RMSD em preto, representando o H3K9M, é nitidamente o que mais chama atenção por conta de sua característica. A uniformidade desse sistema é decorrente da alta estabilidade que apresentou do qual a movimentação molecular ocorreu entre 0 e 0,5Å. O H3K9I é o segundo sistema com maior destaque, seguindo as análises anteriores, mantendo um certo padrão em boa parte da dinâmica molecular onde por volta de 112,5ns de trajetória o mesmo saiu acentuadamente do padrão que vinha seguindo. O H3K9Nle e H3K9A apresentaram comportamento de pouca estabilidade.

Figura 12: Paralelo entre os RMSDs das histonas mutantes (a) e do cofator SAM (b) presente em cada um dos processos de metiltransferase envolvendo esses mutantes

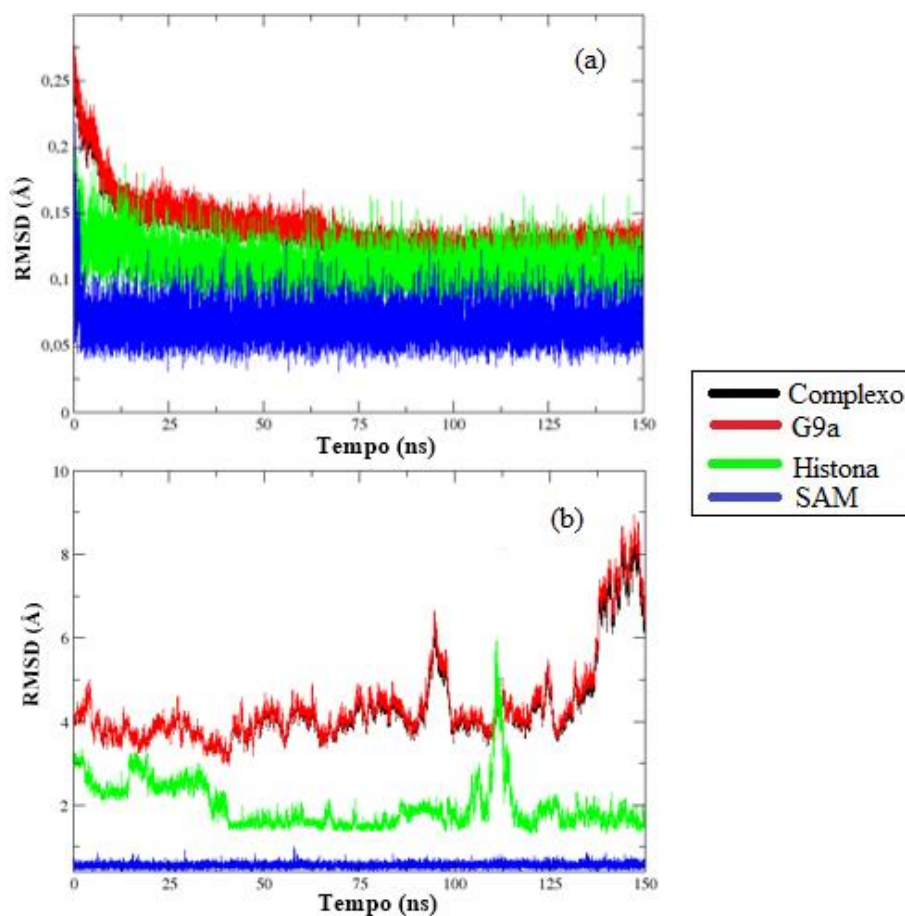


Fonte: (próprio autor.,2023)

Alguns dos resultados apresentados coincidem com o esperado onde o SAM e a G9A de cada sistema apresentaram desempenhos associados ao complexo, as histonas mutantes tiveram seu comportamento diferente como já esperado por conta da variação de átomos de uma histona para a outra. Como dito anteriormente o complexo é a soma da G9A, SAM e da histona, por conseguinte o gráfico irá expressar de forma unida o desempenho dos componentes da H3K9M, H3K9I, H3K9A e H3K9Nle.

Já na figura 13 é possível ver o RMSD dos dois mutantes que foram vistos como os mais promissores diante das primeiras análises.

Figura 13: RMSD do sistema H3K9M (a) e H3K9I (b) durante dinâmica molecular de 150ns



Fonte: (próprio autor.,2023)

Comparando ambos os gráficos podemos ver a diferença significativa entre os dois mutantes. O mutante H3K9M (a) já demonstrou melhor comportamento durante toda a dinâmica molecular. O sistema apresentou grande estabilidade durante todo tempo de dinâmica mostrando estado constante do início ao fim dos 150ns de simulação, além disso é de destaque a pouca variação no movimento dinâmico sendo no mínimo 0,05 angstroms até 0,25 angstroms. A histona, em verde, ficou bem uniforme o tempo todo tanto como a G9a (vermelho) e como o SAM (azul). Sendo assim é possível ver que o complexo desse modelo ficou bem estabilizado e tal avaliação está mais que em concordância com as análises feitas anteriormente.

O mutante H3K9I apresentou estágios de variação em alguns pontos de dinâmica molecular. De 0 a 100ns o peptídeo (verde) pouco variou apresentando um pico elevado entre 100ns a 125ns, em contrapartida o SAM (azul) mostrou comportamento esperado durante toda simulação. Analisando a trajetória do complexo (preto) é

perceptível que do início até 80ns e de 100ns até 125ns, respectivamente, a DM mostrou-se constante. As variações apresentando altos picos são decorrentes da busca do sistema em encontrar o melhor ajuste conformacional durante o tempo de dinâmica molecular. Levando em consideração os intervalos de tempo citados acima é possível ver que o RMSD variou o tempo todo, se comparado com o H3K9M, chegando ao seu ponto máximo um RMSD de 9 Å. Verificado o comportamento das distancias e o comportamento da trajetória destes sistemas (RMSD), foram realizados cálculos de energia por meio de MM/PBSA e MM/GBSA para então finalizar a verificação quanto qual mutante é o mais estável e assim tirar as conclusões a respeito dele.

5.3 Calculo de energia

Usar cálculos de energia no estudo de simulação computacional é um dos pontos mais importantes da investigação pela possibilidade da leitura de como os sistemas estão na sua melhor conformação para obter a menor energia possível (VERLI, H.,2014). Estudos experimentais também utilizam dos valores de energia para a determinação da estabilidade dos objetos de estudo. De acordo com Hariharan Jayaram (JAYARAM, Hariham.,2016) e seus colaboradores é possível determinar o poder catalítico desses sistemas por meio dos valores de energia experimental. A tabela 3 mostra os valores experimentais de energia dos diferentes mutantes da proteína histona H3 decorrentes da pesquisa do JAYARAM, onde os sistemas em destaques com menor energia, além do nativo, são o H3K9I e H3K9M.

Tabela 3. Tabela com resumo dos valores de IC₅₀ e ΔG_{exp} determinados para os peptídeos da lisina.

Peptídeos	IC ₅₀ (μM)	Referência
H3K9	13,0 ± 3	(JAYARAM.,2016)
H3K9I	9,3 ± 0,8	
H3K9M	2,3 ± 0,2	
H3K9Nle	0,54 ± 0,04	

FONTE: (JAYARAM.,2016).

Para a realização dos cálculos de energia foi utilizado do método de MM/PBSA e MM/GBSA onde sua utilização permite que os resultados sejam reprodutíveis e confiáveis. Os cálculos para a obtenção dos valores de energia foram

feitos para o sistema nativo e os 4 mutantes analisados nesse trabalho e podem ser vistos na tabela 4.

Tabela 4. Tabela com valores de energia calculados computacionalmente (ΔG_{cp}) e de Desvio Padrão.

Peptídeos	$\Delta G_{cp}(\text{kcal.mol}^{-1})$
H3K9	$-95,06 \pm 14,17$
H3K9Nle	$-105,43 \pm 18,88$
H3K9I	$-76,51 \pm 13,44$
H3K9M	$-66,17 \pm 2,76$
H3K9A	$-30,02 \pm 11,42$

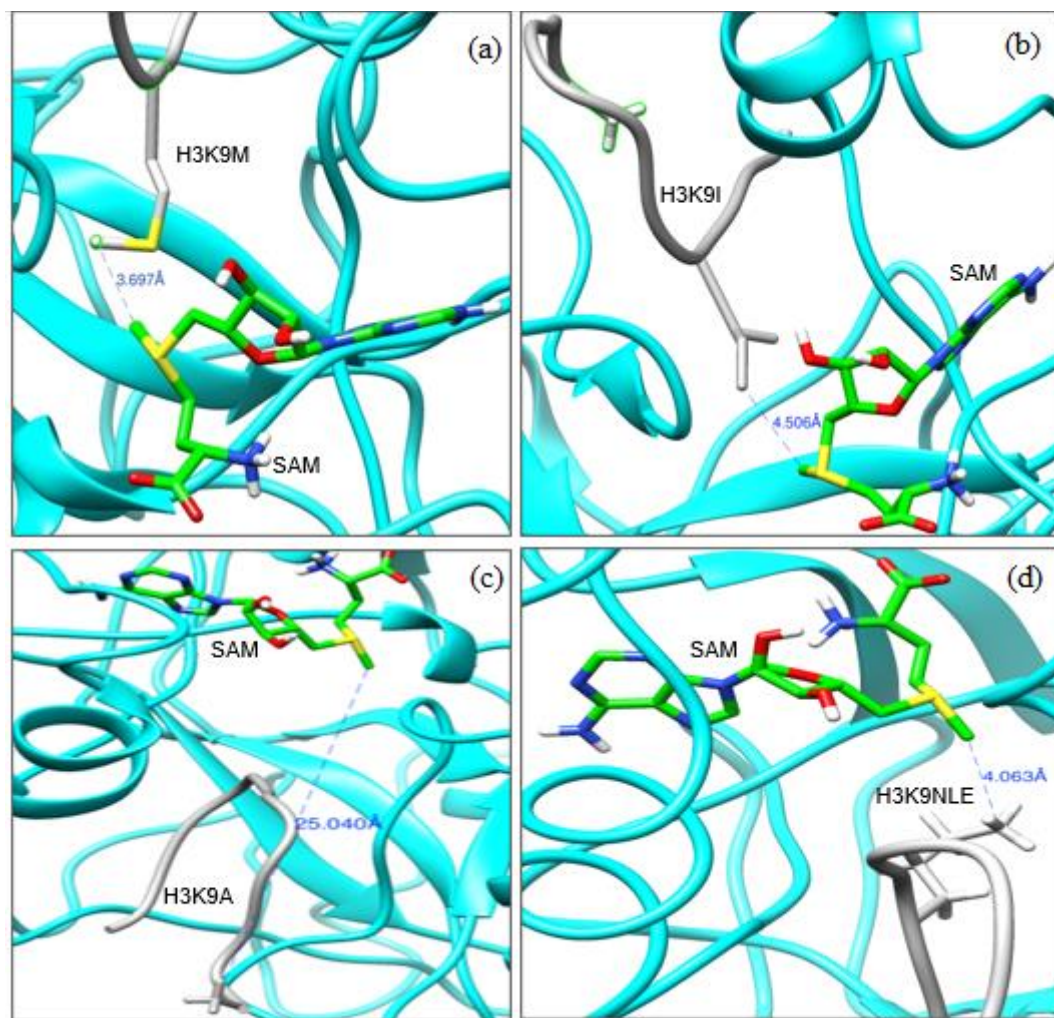
Fonte: (próprio autor.,2023).

Considerando os valores obtidos experimentalmente para o IC50 (Tabela 3), podemos observar que as mutações H3K9I, H3K9M e H3K9Nle apresentaram uma redução significativa na IC50 em relação ao peptídeo nativo H3K9, indicando um aumento na afinidade pelo receptor.

Ao compararmos com os resultados teóricos calculados com MM-PBSA, observamos que a mutação H3K9A apresentou um valor menos negativo em relação aos outros peptídeos, $-30,02 \text{ kcal.mol}^{-1}$, indicando uma menor afinidade pelo receptor. Já as mutações H3K9I e H3K9M apresentaram valores mais negativos em relação ao peptídeo nativo H3K9, indicando um aumento na afinidade pelo receptor, com valores de energia de $-76,51$ e $-66,17 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente, o que está em acordo com o aspecto de afinidade do receptor com os resultados experimentais (Tabela 3). Contudo mesmo apresentando valor de energia de $-105,43 \text{ kcal.mol}^{-1}$, o valor de desvio padrão ($\pm 18,88$) do H3K9Nle é bastante alto colocando de forma excludente a sua afinidade com o receptor.

A figura 14 apresenta as interações entre os peptídeos mutantes e o cofator enzimático SAM. É nítida a coerência entre os resultados expostos anteriormente com as interações apresentadas na figura 14 no qual o sistema H3K9A em todos os pontos de análise mostrou-se como o mutante mais apático a interação com o cofator enzimático. Em destaque o H3K9M que por meio das informações dispostas da tabela 2, curva de RMSD e calculo de energia por MM-PBSA junto ao acréscimo do valor de desvio padrão constatou ao lado do H3K9I como sistemas de maior afinidade na interação histona-SAM.

Figura 14: Sítio de interação peptídeo-SAM: H3K9M-SAM (a), H3K9I-SAM(b), H3K9A-SAM(c) e H3K9Nle(d). Em cinza cada um dos mutantes investigados e o SAM em predominância verde.



Fonte: (próprio autor.,2023)

Desta forma, os resultados experimentais de IC50 apresentam uma boa correlação com os resultados teóricos calculados com MM-PBSA, sugerindo que essa metodologia pode ser útil para prever a afinidade de peptídeos por receptores.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos por meio de simulações de dinâmica molecular, foi possível determinar que os mutantes H3K9I e H3K9M apresentaram maior estabilidade em relação aos demais peptídeos estudados. Esses resultados foram corroborados pelos cálculos de energia realizados com os métodos MM/PBSA, que também indicaram que os mutantes mencionados apresentaram melhores características como inibidores da atividade biológica da G9a. Ao analisar os resultados experimentais publicados por outros pesquisadores, verificamos que os valores teóricos obtidos em nosso estudo seguem uma tendência similar, reforçando a validade dos nossos resultados.

Com base nesses resultados, podemos concluir que o mutante H3K9M, que apresentou a melhor performance geral, é a lisina 9 com mutação de metionina mais promissora como inibidor da G9a. No entanto, o mutante H3K9I também apresentou destaque na inibição da atividade biológica da G9a. Vale ressaltar que este estudo ainda está em andamento e que esperamos refinar ainda mais os resultados. De qualquer forma, os resultados obtidos até o momento são bastante animadores e satisfatórios.

As simulações computacionais realizadas permitiram verificar o comportamento reacional da enzima metiltransferase G9a ligado a H3K9 e seus mutantes no processo de, permitindo determinar qual dos sistemas utilizados apresentou maior estabilidade. Portanto, este trabalho pode contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares e para o desenvolvimento de terapias mais eficazes no tratamento de doenças humanas.

7. REFERÊNCIAS

- ATKINS, P; PAULA, J. de; FRIEDMAN, R. *Quanta, Matter, and Change: A molecular approach to physical chemistry*. **New York: W. H. Freeman and Company**, 2009.
- AUDERGON, P.N.C.B; CATANIA, S; KAGANSKY, A; TONG, P; SHUKLA, M; PIDOUX, A.L; ALLSHIRE, R. C. Restricted epigenetic inheritance of H3K9 methylation. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 132-135, 2015.
- BERMAN, H. M; WESTBROOK, J; FENG, Z; GILLILAND, G; BHAT, T. M; WEISSIG, H; SHINDYALOV, N. N; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BLASE, X. et al. Stability and Band-gap Constancy of Boron Nitride nanotubes. **Europhysics Letters**, n.2, p. 334-340, 1994.
- BORN, M; OPPENHEIMER, J. R. Born-Oppenheimer approximation. **Ann Phys.** 84(may):457. 1927
- BURAK, M.J; GUJA, K.E; GARCIA-DIAZ, M. **SIJ-RCSB Protein Date Bank**, 2016.
- CÁCERES, M. B. S; STERZA, F. A. M. Methylation of histones in mammalian oocytes and embryos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.41, n.2, p.620-627. Junho de 2017.
- CAO, H; LI, L; YANG, D; ZENG, L; YEWEI, X; YU, B; CHEN, J. Recent progress in histone methyltransferase (G9a) inhibitors as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 537-546, 2019.
- CAROBIN, C.; NETO, A. A. Um exemplo do uso de simulações computacionais aplicados no ensino de equilíbrio químico para estudantes de ensino médio. **IV ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS**, p. 1–14,2003.Disponível:<http://fep.if.usp.br/~profis/arquivos/ivenpec/Arquivos/Orais/ORAL173.pdf>>.
- CARUGO, Oliviero. How root-mean-square distance (rmsd) values depend on the resolution of protein structures that are compared. **Journal of applied crystallography**, v. 36, n. 1, p. 125-128, 2003.

CASCIELLO, F. et al. Functional role of G9a histone methyltransferase in cancer. **Front. Immunol.** v.6, p.487. Setembro de 2015

CASTILLO, R; ANDRÉS, J; MOLINER, V. Catalytic mechanism of dihydrofolate reductase enzyme. A combined quantum-mechanical/molecular-mechanical characterization of transition state structure for the hydride transfer step. **J Am Chem Soc.** v. 121, p.12140-12147. 1999

CIANNI, L. dos REIS ROCHO, F. ROSINI, F et al. Optimization Strategy of single digit nanomolar cross-class inhibitors of mammalian and protozoa cysteine proteases. **Bioorg Chem.** Published online 1977.

COHEN, F. E.; STERNBERG, M. JE. On the prediction of protein structure: the significance of the root-mean-square deviation. **Journal of molecular biology**, v. 138, n. 2, p. 321-333, 1980.

COSTA, E.B., PACHECO, C. Epigenética: Regulação da Expressão Gênica em Nível Transcricional e Suas Implicações. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 125-136, jul./dez., 2013.

COUTINHO, K; MORGON, N. H. Métodos de química teórica e modelagem molecular. **Editora Livraria da Física**, 2007.

Da SILVA, V.; SILVA, C. H. T. P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, 2007.

De OLIVEIRA, N. F. P., PLANELLO, A. C., ANDIA, D. C., de SOUZA PARDO, A. P. Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 56(4), 493-499. (2010).

DIAS, B. G.; RESSLER, K. J. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. **Nature Neuroscience**, 17(1), p. 89-96. 2014.

DORNELES, G; PERES, A. Epigenetic in human obesity. (2017).

DUCE, A. M; ORTÍZ, P; CABRERO, C; MATO, J. M. S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. **Hepatology**, v. 8, p. 65-68. (1998)

FANTAPPIE, Marcelo. Epigenética e memória celular. **Revista carbono**, v. 3, 2013.

FIELD, M. J. Simulating enzyme reactions: Challenges and perspectives. **J Comput Chem.** v. 23(1):48-58. 2002

FIELD, M. J. The pDynamo program for molecular simulations using hybrid quantum chemical and molecular mechanical potentials. **J Chem Theory Comput.** 4(7):1151-1161. 2008

FLESHER, J. L.; FISHER, D. E. G9a: An Emerging Epigenetic Target for Melanoma Therapy. **Epigenomes**, v. 5, n. 4, p. 23, 2021.

FONTES, L. P; JIMENEZ, P. Q; IRIARTE, M. M. Epigenética y epilepsia. **Neurologia**, v. 30, n. 2, p. 111-118, 2015.

FRANCO, Maurício Machaim. Epigenética no melhoramento genético e reprodução animal. In: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em anais de congresso (ALICE). **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 24, n. 1-2, p. 75-80, 2017., 2017.

FRIEDEL, H. A; GOA, K. L; BENFIELD, P. S-adenosyl-L-methionine. **Drugs**, v. 38, n. 3, p. 389-416, 1989.

GENHEDEN, Samuel; RYDE, Ulf. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert opinion on drug discovery**, v. 10, n. 5, p. 449-461, 2015.

Guan, S., Wang, T., Kuai, Z. *et al.* Exploration of binding and inhibition mechanism of a small molecule inhibitor of influenza virus H1N1 hemagglutinin by molecular dynamics simulation. **Sci Rep** 7, 3786, 2017.

HASE, W. L. Computational Chemistry. **Computing in Science & Engineering**, p. 12–13, 2003.

HEGAZI, M. F. BORCHARDT, R.T SCHOWEN, R. L. α -Deuterium and carbon-13 isotope effects for methyl transfer catalyzed by catechol O-methyltransferase. SN2-like transition state. **J Am Chem Soc.** Published online 1979.

HSIN, J. ARKHIPOV, A. YIN, Y. STONE, J. E. SCHULTEN, K. Using VMD: An introductory tutorial. **Curr Protoc Bioinforma.** Published online 2008.

IMAI, K; TOGAMI, H; OKAMOTO, T. Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16538-16545, 2010

ISSA, J. P. CpG-island methylation in aging and cancer. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 249, p. 101-118, 2000

JAYARAM, H. et al. S-adenosyl methionine is necessary for inhibition of the methyltransferase G9a by the lysine 9 to methionine mutation on histone H3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 113, p.6182-6187. 2016

JAYARAM, H; HOELPER, D; JAIN, S. U; CANTONE, N; LUNDGREN, S. M; POY, F; LEWIS, P. W. S-adenosyl methionine is necessary for inhibition of the methyltransferase G9a by the lysine 9 to methionine mutation on histone H3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 22, p. 6182-6187, 2016.

JO, S; KIM, T; IYER, VG; IM, W. CHARMM-GUI: uma interface gráfica de usuário baseada na web para CHARMM. **Jornal de química computacional**, v. 29 (11), p. 1859-1865. 2008

KAHN, K; BRUICE, T. C. Transition-state and ground-state structures and their interaction with the active-site residues in catechol O-methyltransferase. **J Am Chem Soc**. Published online 2000.

KARMODIYA, Krishanpal et al. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-18, 2012.

KOLLMAN, P. A; KUHN, B; DONINI, O; PERAKYLA, M; STANTON, R; BAKOWIES, D. Elucidating the nature of enzyme catalysis utilizing a new twist on an old methodology: Quantum mechanical-free energy calculations on chemical reactions in enzymes and in aqueous solution. **Acc Chem Res**. Published online 2001.

KRAUSE, B. J; CASTRO-RODRIGUEZ, J. A; UAUY, R; CASANELLO, P. Conceptos generales de epigenética: proyecciones en pediatría. **Revista Chilena de Pediatría**. v.87. 2016

LAMEIRA, J; KUPCHENCKO, I; WARSHEL, A. Enhancing paradynamics for QM/MM sampling of enzymatic reactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 9, p. 2155-2164, 2016.

MAIOROV, V. N.; CRIPPEN, G. M. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. **Journal of molecular biology**, v. 235, n. 2, p. 625-634, 1994.

MARGERON, R; TROJER, P. REINBERG, D. The key to development: interpreting the histone code?. **Curr Opin Genet Dev**. v.151, p.63-76. 2005

MELLOR, J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. **Trends in Genetics: TIG**, v. 22, p. 320–329. (2006).

MENDITI, K. B. C; KANG, H. C. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 4, p. 453-460, 2007.

MULLER, H. R; PRADO, K. B. Epigenetics: A new genetic Field. **Rubs**, v.1, n.3, p.61-69, 2008

NAM, K; CUI, Q; GAO, J. Specific Reaction Parametrization of the AM1/d Hamiltonian for Phosphoryl Transfer Reactions: H, O and P Atoms. **York DM**. p.486-504, 2007.

NAMBA, A. et al. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**. v.33, n.4, p.13-24. 2008

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, p. 13-24, 2008.

NEESE, Frank. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73-78, 2012.

OLIVEIRA, J.Q. Epigenética e Doenças Humanas. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.33, n.1, p. 21-34, jan./jun., 2012.

OLIVEIRA, N. F. P. et al. DNA Methylation and Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 56, p.493-499. 2010.

ORTOLAN, Alexandre Osmar. Apostila de práticas de química computacional. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014. (Metodos de simulação computacional)

- PAPICH, M. G. Manual Saunders de terapia veterinária. **3^a ed. Elsevier**, Rio de Janeiro, 2012
- PETERSON, C. L; LANIEL, M. A. Histones and histone modifications. **Curr Biol.** v. 14(4), p. 546-51. 2005
- PHILLIPS, J. C, HARDY, D. J. MAIA, J. D. C et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. **J Chem Phys.** Published online 2020.
- PINTO, A. V; OLIVEIRA, A. N; JERVES, C; de MENDONÇA, F. L; COUTINHO, I. F; COIMBRA, J. T; RAMOS, M. J. Proteínas Virais no Protein Data Bank. **Revista de Ciência Elementar**, v. 8(2). (2020).
- REN, Wan-Sheng et al. Catalytic Mechanism and Product Specificity of protein Arginine Methyltransferase PRMT7: A Study from QM/MM Molecular Dynamics and Free Energy Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 8, p. 5301-5312, 2020.
- ROUX, B. The calculation of the potential of mean force using computer simulations. **Comput Phys Commun.** v. 91(1-3), p.275-282. 1995
- SANT, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.
- SARTORI, J; FRASSON, A. L. Epigenetic mechanisms in breast carcinogenesis - the role of sirtuins. **PERSPECTIVA**, Erechim. v.39, n.145, p.19-28. março de 2015
- SILVA, G. A; CASTRO, N. S; FIGUEIREDO, R. O. Mecanismos epigenéticos e a ação da expressão da proteína BRCA na carcinogênese mamária. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 82596-82613, 2020.
- SOARES, R. O. S. Dinâmica molecular de proteínas: estabilidade renaturação térmica. Universidade de São Paulo. **Dissertação**, p.1-87, Ribeirão Preto-2009
- SOUZA-CÁCERES, M. B.; DE ANDRADE MELO-STERZA, F. Metilação de histonas em oócitos e embriões mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 4, n. 2, p. 620-627, 2017.

- SOUZA-CÁCERES, Mirela Brochado; DE ANDRADE MELO-STERZA, Fabiana. Metilação de histonas em oócitos e embriões mamíferos. **R. bras. Reprod. Anim.**, p. 620-627, 2017.
- SUFRIN, J. R.; FINCKBEINER, S; OLIVER, C. M. Marine-derived metabolites of S-adenosylmethionine as templates for new anti-infectives. **Marine drugs**, v. 7, n. 3, p. 401-434, 2009.
- SZYF, Moshe. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 1, p. 7-23, 2007.
- TACHIBANA, M; MATSUMARA, Y; FUKUDA, M; KIMURA, H; SHINKAI, Y. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. **The EMBO Journal**. v. 27, p. 2681–2690. (2008)
- TORRIE, G. M, VALLEAU, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. **J Comput Phys**. Published online 1977.
- TSANKOVA, N. et al. Epigenetic Regulation in Psychiatric Disorders. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 355–367, 2007.
- VERLI, H. Dinâmica Molecular In: Verli, H. (Org). **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1a ed. São Paulo: SBBq, p. 173-187. 2014.
- VESSECCHI, R; GALEMBECK, S. E; LOPES, N. P; NASCIMENTO, P. G; CROTTI, A. E. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, 31, 840-853. (2008).
- WANG, Y. F; ZHANG, J; SU, Y; SHEN, Y. Y; JIANG, D. X; HOU, Y. Y; CHEN, Y. G9a regulates breast cancer growth by modulating iron homeostasis through the repression of ferroxidase hephaestin. **Nature communications**, v. 8(1), p. 1-14. 2017
- WARSHEL A. Energetics of enzyme catalysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 75(11), p. 5250-5254. 1978
- WARSHEL, Arieh; LEVITT, Michael. Estudos teóricos de reações enzimáticas: estabilização dielétrica, eletrostática e estérica do íon carbônio na reação da lisozima. **Revista de biologia molecular**, v. 103, n. 2, pág. 227-249, 1976.

WARSELL, A. et al. Q-Chem 2.0: a high-performance ab initio electronic structure program package. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 16, p. 1532-1548, 2000.

WIGLE, J. Accessing Protein Methyltransferase and Demethylase Enzymology Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. **Chem Biol**. 2010

ZWANZIG, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. **J. Chem. Phys.**v.22. 1954