

Rocha, LLS & Freire, JEC (2020). New insights into the physicochemical properties of the human VMAT₂ monoamine transporter and its mode of interaction with the neurotransmitter serotonin: An *in silico* analysis. *Research, Society and Development*, 9(7): 1-22, e530974491.

Novos *insights* sobre as propriedades físico-químicas do transportador de monoaminas VMAT₂ humano e seu modo de interação com o neurotransmissor serotonina: Uma análise *in silico*

New insights into the physicochemical properties of the human VMAT₂ monoamine transporter and its mode of interaction with the neurotransmitter serotonin: An *in silico* analysis

Nuevos *insights* sobre las propiedades fisicoquímicas del transportador de monoamina VMAT₂ humano y su modo de interacción con el neurotransmisor serotonina: Un análisis *in silico*

Recebido: 13/05/2020 | Revisado: 14/05/2020 | Aceito: 16/05/2020 | Publicado: 25/05/2020

Lara Lys Santos Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9875-8957>

Centro Universitário Unichristus, Brasil

E-mail: laralysrocha@hotmail.com

José Ednézio da Cruz Freire

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0660-0459>

Universidade Federal do Ceará, Brasil

E-mail: jednesio@gmail.com

Resumo

As VMAT₂ são glicoproteínas capazes de carrear monoaminas a partir de vesículas pré-sinápticas para as fendas sinápticas durante disparos neuronais. Presentes em muitas espécies de animais incluindo, mamíferos, répteis e aves, esta proteína tem sido estudada extensivamente, porém, pouco se sabe sobre suas características físico-químicas e modo de interação com ligantes nativos ou não. Com o intuito de melhor caracterizar a VMAT₂ humana, o presente estudo foi desenvolvido a fim de explorar vários parâmetros físico-químicos, bioquímicos e estruturais relacionados a esse neurotransportador por meio de ferramentas *in silico*. Neste trabalho, são apresentadas ideias novas e relevantes sobre a estrutura e o seu mecanismo de interação com a 5-HT.

Palavras-chave: Predição físico-química; Modelagem molecular; Transportadores de monoaminas; Serotonina; Docking molecular.

Abstract

VMAT₂ are glycoproteins capable of carrying monoamines from presynaptic vesicles to synaptic clefts during neuronal firing. Present in many species of animals including, mammals, reptiles and birds, this protein has been studied extensively, however, little is known about its physical-chemical characteristics and mode of interaction with native ligands or not. In order to better characterize human VMAT₂, the present study was developed in order to explore various physical-chemical, biochemical and structural parameters related to this neurotransmitter through *in silico* tools. In this work, new and relevant ideas about the structure and its mechanism of interaction with 5-HT are presented.

Keywords: Physicochemical prediction; Molecular modeling; Monoamine transporters; Serotonin; Molecular docking.

Resumen

VMAT₂ son glicoproteínas capaces de transportar monoaminas desde vesículas presinápticas a hendiduras sinápticas durante la activación neuronal. Presente en muchas especies de animales, incluidos mamíferos, reptiles y aves, esta proteína se ha estudiado ampliamente, sin embargo, se sabe poco sobre sus características fisicoquímicas y el modo de interacción con ligandos nativos o no. Para caracterizar mejor el VMAT₂ humano, el presente estudio se desarrolló para explorar diversos parámetros físico-químicos, bioquímicos y estructurales relacionados con este neurotransportador a través de herramientas *in silico*. En este trabajo, se presentan ideas nuevas y relevantes sobre la estructura y su mecanismo de interacción con 5-HT.

Palabras clave: Predicción fisicoquímica; Modelado molecular; Transportadores de monoaminas; Serotonina; Acoplamiento molecular.

1. Introdução

Transportadores de aminas vesiculares do tipo VAT₂ (ou VMAT₂) são membros da Superfamília dos Facilitadores Maioritários, conhecidos também como transportadores de soluto da família 18, membro 2 (SLC_{18A2}), Transportadores de amina de grânulos de cromafina ou, ainda, gene de Deus (Asadi et al., 2016; Dein, 2020). É uma glicoproteína

integral formada por 12 regiões transmembranas (Owens, 2019), expressa no sistema nervoso central e periférico, envolvida no transporte vesicular de neurotransmissores biogênicos como a dopamina (DA), a noradrenalina (NE), a serotonina (5-HT), a histamina, o glutamato (Glu) e o GABA das vesículas pré-sinápticas para as fendas sinápticas durante disparos neuronais (Huang et al., 2020). Para Asadi e colaboradores (2016), no campo religioso, a VMAT₂ é responsável pela predisposição de experiências espirituais ou místicas, incluindo a sensação da presença de Deus ou de outros seres.

Nos últimos anos, muitas pesquisas científicas têm demonstrado que o conhecimento inerente a glicoproteína VMAT₂ pode corroborar na elucidação de diferentes mecanismos fisiopatológicos, em especial, aqueles associados a distúrbios neuropsiquiátricos nas quais as monoaminas estão envolvidas (Eiden; Weihe, 2011; Barbosa et al., 2012; Narendran et al., 2012; Nickell et al., 2014; Jiang et al., 2020). Por essa razão, vários estudos têm usado a VMAT₂ como alvo terapêutico a fim de compreender o efeito de drogas para uso clínico (O'Brien et al., 2016; Pecic et al., 2019; Sreeram; Shagufta; Kagadkar, 2019).

Embora haja vários artigos científicos discorrendo sobre a VMAT₂, estes geralmente concentram informações sobre sua função como proteína transportadora ou vias metabólicas que participa. Todavia, a VMAT₂ carece de muitas informações sobre seus padrões estruturais, características físicas, químicas e modo de interação como ligantes nativos ou não. Desse modo, o presente trabalho tem por finalidade a investigação teórica das características físicas, químicas e estruturais da proteína VMAT₂, bem como entender o modo de interação entre esta e o ligante nativo serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) a partir de predições computacionais.

2. Metodologia

2.1 Obtenção da sequência e análise

A sequência de mRNA da VMAT₂ (Acesso: NM_003045.2) foi obtida em formato *.fasta* a partir do *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida, o servidor *ExpASY Translate* (<https://web.expasy.org/translate/>) foi utilizada para converter a sequência de mRNA em uma sequência de aminoácidos. De posse da sequência de aminoácidos da VMAT₂, o servidor *Signal-Blast Server* (Frank; Manfred, 2008), foi empregado para predizer a presença ou ausência de um peptídeo sinal na região *N-terminal*. Para esse propósito foram usados os

parâmetros – Grupo de organismos: *Eucariotos*; Modo de detecção: *Apenas um sítio de clivagem*. Para identificar a localização subcelular da VMAT₂ foi usado o servidor LocTree3 (Goldberg et al., 2014).

2.2 Análise físico-química

Predições dos parâmetros físico-químicos incluindo: ponto isoelétrico (pI), peso molecular (*Mr*), índice de instabilidade (II) e índice de hidropaticidade média (GRAVY) foram realizadas com auxílio do servidor *ExPASy's ProtParam Server* (Gasteiger et al., 2005), pontes dissulfeto foram previstas a partir dos servidores *DiANNA 1.1 web Server* (Ferrè; Clote, 2006) e *DISSULFIND* (Ceroni et al., 2006). Para determinar o domínio da proteína VMAT₂ foram usados os servidores CDD (Marchler-Bauer et al., 2015) e InterPro (Finn et al., 2016). E as características da estrutura secundária da proteína estudada, foram previstas a partir dos servidores Jpred 4 (Drozdetskiy et al., 2015) e PSIPRED (Buchan; Jones, 2019).

2.3 Predição de estrutura tridimensional

Predições de modelos teóricos para a VMAT₂ foram obtidas empregando o método de modelagem comparativa. Para esse propósito foram utilizados os servidores: *Swiss Model* (Waterhouse et al., 2018), sendo inicialmente, realizada uma pesquisa de *templates* adequados, seguido da seleção dos modelos com maior grau de similaridade e cobertura máxima; *Phyre²* (Kelley et al., 2015), a partir do modo intensivo; *M4T Server 3.0* (Fernandez-Fuentes et al., 2007) e *Lomets* (Wu; Zhang, 2007) empregando seus métodos *default* de busca; Para o *software Modeller* versão 9-22.1 (Eswar et al., 2003), uma busca avançada no banco de dados RCSB (Goodsell et al., 2020), foi realizada a fim de identificar modelos adequados, seguindo os passos: (I) - *Pesquisa avançada*; (II) - *Tipo de consulta* - Sequência (BLAST/FASTA/PSI-BLAST) e (III) - *valor de corte E* – 0,01. Somente os modelos com maior grau de identidade e cobertura máxima foram selecionados, conforme (Monteiro Júnior et al., 2017).

Em seguida, todos os modelos tridimensionais obtidos para a VMAT₂ foram avaliados pela ferramenta *online MolProbity* (Chen et al., 2010), a fim de averiguar as melhores combinações dos ângulos diédricos Ψ (*psi*) e ϕ (*phi*) nos aminoácidos presentes na proteína estudada, permitindo desse modo, determinar o melhor modelo para a VMAT₂. Após essa etapa, o melhor modelo obtido foi otimizado com auxílio do *software Coot 0.8.1* (Emsley et

al., 2010). A minimização das energias da estrutura otimizada para VMAT₂ foi realizada a partir do servidor *GalaxyWEB* (Ko et al., 2012). Finalmente, o modelo final da VMAT₂ foi validado pelas ferramentas: *MolProbity* (Chen et al., 2010), *ProSA web* (Wiederstein; Sippl, 2007), *ERRAT* (Colovos; Yeates, 1993) e *Verify 3D* (Eisenberg; Lüthy; Bowie, 1997).

2.4 Docking molecular

A molécula de serotonina em extensão *.sdf* (*Structure Data Format*) foi obtida a partir do banco de dados *PubChem* (Kim et al., 2018), considerando que este se trata do ligante nativo da proteína VMAT₂. Em seguida, a VMAT₂ e seu ligante foram submetidos ao servidor ROSIE (Lyskov et al., 2013), com o objetivo de entender o modo de interação entre essas duas moléculas por método de simulação de Docking molecular.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise da sequência de aminoácidos primária

Peptídeo sinal é uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 15 resíduos na porção *N*-terminal em muitas proteínas, cuja principal função envolve o endereçamento para o local alvo de sua função biológica (Nagano; Masuda, 2014). A análise realizada com o servidor *Signal-Blast Server* (Frank; Manfred, 2008), sugere a presença de um peptídeo sinal putativo na sequência primária da proteína VMAT₂, sendo este similar ao encontrado na proteína BLML_DICDI, uma β -lactamase do tipo 3 de *Dictyostelium discoideu*, apresentando valores de *Bitscore* igual a 25,0 e *E-value* igual a 100. Nesta análise foi possível determinar que a VMAT₂ possui 514 aminoácidos, sendo que 37 deles constituem um peptídeo sinal, a partir da região *N*-terminal com sítio de clivagem entre os resíduos Leu³⁷ e Thr³⁸.

Em 2014, foi realizado um estudo envolvendo a região *N*-terminal da VMAT₂ e neste conclui-se que a remoção dos primeiros 16 ou 19 aminoácidos dessa região resultava em uma proteína com capacidade reduzida de sequestrar 5-HT, por outro lado, as Ser¹⁵ e Ser¹⁸ quando fosforiladas não apresentaram nenhuma interferência cinética em sua atividade (Torres; Ruoho, 2014). Assim, é provável que a região *N*-terminal da VMAT₂, como em muitas outras proteínas, seja uma região regulada de atividade proteica, neste caso específico, um regulador do sequestro de monoaminas.

Considerando que a VMAT₂ humana madura possui somente 477 aminoácidos, ela detém massa molecular de 51,3 kDa e uma *N*-glicosilação com massa molecular variável (Figura 1, aminoácidos marcados em vermelho), podendo ser detectadas variantes dessa proteína com massas moleculares próximas de 75 kDa, 50-55 kDa e 45 kDa (Wang et al., 1997; Gainetdinov et al., 1998; Miller et al., 1999), todas elas, exceto a variante de com 45 kDa são *N*-glicosiladas (Jassen et al., 2005; Nyarko et al., 2018). Desse modo, se a VMAT₂ apresentar 514 resíduos em sua estrutura funcional, ela deverá ser uma proteína *N*-deglicosilada com massa molecular de 55,7 kDa e, isso seria contraditório aos achados sobre essas proteínas.

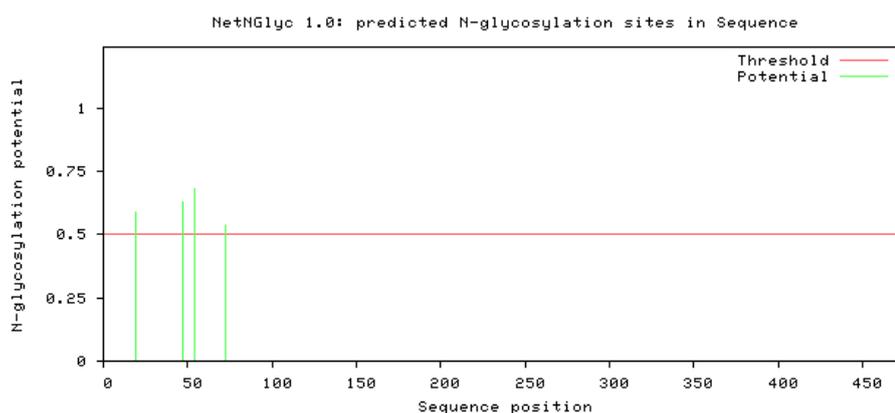
Figura 1 - Representação dos potenciais de *N*-glicosilações na proteína VMAT₂ humana.

Molécula: VMAT₂ Comprimento: 477

TVVVP IIPSYLYSIKHEK **NATE** IQTARPVHTASISDSFQSFYSYD **NSTMVTGN**ATRD LTLHQ TATQHMVT **N**ASAVPSDC 80
 PSEDKLLNENVQVGLLFASKATVQLITNPFIFGLLTNRIGYPIPIFAGFCIMFVSTIMFAFSSSYAFLLIARSLQGGISS 160
 CSSVAGMGLASVYTDDEERGNVMGIALGGLAMGVLVGPFFGSLVEFVGKTAPFLVLAALVLLDGAIQLFVLPQSRVQP 240
 ESQKGTPLTLLKDPYILIAAGSICFANMGIAMLEPALPIWMMETMCSRKWLGVAFLPASISYLGITNIFGILAHKMGR 320
 WLCALLGMIIVGVSVILCIPFAKNIYGLIAPNFGVGFALGMVDSSMMPINGYLVDLRHVSVYGVYAIADVAFCHGYAIGP 400
 SAGGAIKAIGFPWLMTIIGIIDILFAPLCFFLRSPPAKEEKMAILMDHNCPIKTKMYTQNNIQSYPIGEDEEESD

(Threshold=0.5)

| Proteína | Aminoácido | Potencial | Score | Resultado <i>N</i> -glicosilação |
|-------------------|------------|-----------|-------|----------------------------------|
| VMAT ₂ | 19 NATE | 0.5897 | (8/9) | + |
| | 47 NSTM | 0.6296 | (8/9) | + |
| | 54 NATR | 0.6824 | (8/9) | + |
| | 72 NASA | 0.5347 | (4/9) | + |



A linha vertical verde mostra o potencial de modificação dos resíduos Asn, enquanto a linha vermelha indica o limiar para o potencial de modificação. Informação gerada pelo *NetNGlyc 1.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Fonte: Própria pesquisa.

Para Jassen e colaboradores (2005), é possível que a variante de 45 kDa possa ser resultado de: (I) Um produto de proteólise da proteína de 55 kDa; (II) Uma variante funcional

produzida por iniciação da tradução no ATG¹ previsto no éxon 2, porém, é resultante de processamento pós-tradução produzindo a uma proteína de 45 kDa truncada; (III) Um codão de partida alternativo. Com base no servidor LocTree3, foi predito ainda que a membrana plasmática é a localização subcelular da proteína em estudo, apresentando *Score* de 19 e precisão igual a 83% (Goldberg et al., 2014).

3.2 Análise dos parâmetros físico-químicos

Predições sobre as propriedades físico-químicas obtidas a partir do servidor *ProtParam* com base na cadeia polipeptídica (Gasteiger, 2005), são capazes de fornecer importantes informações a respeito de uma estrutura proteica específica, colaborando para uma maior compreensão de suas funcionalidades, bem como de seus aspectos bioquímicos e celulares (Bezerra; Queiroz; Freire, 2018).

Conforme os dados obtidos na análise da VMAT₂, essa proteína madura possui meia-vida estimada em 7,2 horas em reticulócitos de mamíferos, cerca de 20 horas em leveduras e aproximadamente 10 horas em *Escherichia coli*. Apesar de o tempo de meia-vida ser menor em bactérias como a *E. coli*, esta representa um bom vetor para a obtenção da proteína VMAT₂ recombinante, considerando as facilidades de custo e cultivo da bactéria, bem como a quantidade de proteínas recombinantes obtidas.

Em relação ao pI, a VMAT₂ apresenta um valor de 5.38, indicando que em meio aquoso e pH próximo a este, a proteína estudada perderá sua solubilidade e, conseqüentemente, tenderá a precipitar-se. Já seu pI é de 44.74 indicando que a VMAT₂ é classificada como uma proteína instável. Ao avaliar seu pI, observou-se um valor de 105.53, indicando baixo poder de interação com meio aquoso, tal resultado corrobora com o índice GRAVY, cujo valor é 0.551, ou seja, a VMAT₂ é uma proteína hidrofóbica. O fato da VMAT₂ possuir baixo poder de interação com o meio aquoso e apresentar potencial hidrofóbico reforça a predição já realizada pelo servidor LocTree3 (Goldberg et al., 2014), demonstrando que esta proteína é transmembranar.

Ademais, a análise do número total de aminoácidos carregados negativamente (ácidos) revelou que VMAT₂ possui 33 resíduos, enquanto a quantidade de aminoácidos carregados positivamente (básicos) é de apenas 25 resíduos. Grupos R de aminoácidos mais hidrofílicos são aqueles carregados positivamente ou negativamente, portanto, a VMAT₂ apresenta baixa capacidade hidrofílica (55 resíduos) quando comparados aos 422 resíduos que apresentam potencial hidrofóbico. Por outro lado, a Leu e a Ile (apolares e hidrofóbicos) são os

aminoácidos mais abundantes na proteína estudada apresentando 47 resíduos cada um deles. Aminoácidos com grupos R apolares e hidrofóbicos tendem a se agrupar no interior de proteínas, estabilizando a estrutura proteica por meio de interações hidrofóbicas, razão pela qual a Leu e a Ile possui grande tendência de formar α -hélices (Wiradharma et al., 2011).

As predições de pontes dissulfeto foram obtidas com auxílio dos servidores DiANNA e DISULFIND, e revelaram a presença de dez cisteínas na VMAT₂. Após simulação foi observado a formação de cinco pontes dissulfeto entre: Cys⁸⁰ – Cys³⁹³; Cys¹³⁰ – Cys⁴³⁰; Cys¹⁶¹ – Cys³³⁷; Cys²⁶⁵ – Cys³²³; Cys²⁸⁷ – Cys⁴⁵¹ (Ceroni et al., 2006; Ferrè; Clote, 2005). A presença de pontes dissulfeto têm sido observada em muitas proteínas de membranas (Grazhdankin; Stepniewski; Xhaard, 2020), pois estas são capazes de estabilizar a conformação nativa das proteínas, além disso, a presença de ligações entre resíduos de Cys serve como estratégia importante para melhorar a estabilidade térmica da proteína (Imani, 2010; Robinson et al., 2020).

Domínios conservados podem ser compreendidos como unidades recorrentes em sequências ou estruturas de proteínas pertencentes a uma mesma família. A predição de domínio da proteína VMAT₂ realizada com auxílio do servidor CDD (Marchler-Bauer et al., 2015), indicou que esta proteína possui um domínio MFS - Superfamília dos Facilitadores Maioritários, com base no valor de *Bit Score* de 637.69 e *E-value* de $0e^{+00}$ e intervalo entre os aminoácidos Asp⁸⁶ - Arg⁴³⁴. Este dado corrobora com o resultado obtido pelo servidor InterPro (Finn et al., 2016), porém, com intervalo entre os aminoácidos Pro⁷⁷ - Try³⁸¹. Proteínas MFS, em geral constituem um amplo e diverso grupo de transportadores secundários incluindo os tipos uniportadores, simportadores e antiportadores (Wang et al., 2020). Neste contexto a VMAT₂ se enquadra como uma proteína antiportadora, e portanto, assim como outros tipos de VMATs, carregam monoaminas durante processos que envolvem troca de prótons H⁺ pelo substrato (Mulvihill, 2019).

Em termos gerais, uma proteína pode ou não apresentar padrões regulares repetidos como as α -hélices, as β -folhas e os *coils*. No presente estudo, as predições de estrutura secundária realizadas para a proteína VMAT₂ usando os servidores Jpred 4 e PSIPRED, não indicaram exata concordância nas porcentagens de α -hélices, β -folhas e *coils*, no entanto, essa diferença pode estar diretamente relacionada ao modo como estes servidores utilizam seus algoritmos para prever padrões de estruturas secundárias (Bezerra; Queiroz; Freire, 2018), bem como as informações inerentes as estruturas por eles selecionadas como *templates*. Entretanto, é possível identificar predominância de α -hélices (68,34% á 69,81%), seguido de *Coils* (28,09% á 29,77%) e β -folhas (1,89% á 2,10%), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Predições de estruturas secundárias da VMAT₂ (Acesso: NP_003045.2) usando diferentes servidores.

| Servidor | β -folhas | | α -hélices | | Coils | |
|----------------|-----------------|------|-------------------|-------|----------|-------|
| | Nº de aa | % | Nº de aa | % | Nº de aa | % |
| JPred | 9 | 1,89 | 326 | 68,34 | 142 | 29,77 |
| PSIPRED | 10 | 2,10 | 333 | 69,81 | 134 | 28,09 |

A previsão secundária da estrutura VMAT₂ utilizando os servidores JPred e PSIPRED, demonstraram que essa proteína possui aproximadamente 68% de estruturas do tipo α -hélice, cerca de 2% de estruturas do tipo β -folhas e aproximadamente 29% de estrutura do tipo *coils*. No entanto, essa precisão é alcançada com base na quantidade de estruturas homólogas detectadas no banco de dados de estruturas proteicas disponíveis. Fonte: Própria pesquisa.

A presença de α -hélices é muito frequente em proteínas pertencentes a Superfamília dos Facilitadores Maioritários, essa grande família é caracterizada por um motivo comum de 8 - 12 α -hélices transmembranares que, por sua vez, facilitam o transporte seletivo de uma vasta gama de substratos através da membrana (Harris et al., 2017; Lee; Sands; Biggin, 2016).

3.3 Modelagem comparativa da VMAT₂

A modelagem molecular *in silico* de proteínas baseia-se no conceito de proteínas homólogas, levando em consideração uma óptica evolutiva de moléculas relacionadas. Desse modo, é possível elucidar características estruturais de uma proteína desconhecida com base nas informações já conhecidas e disponíveis de proteínas similares (Savosina et al., 2020). Após uma busca intensiva no banco de dados RCSB (Goodsell et al., 2020), foi possível verificar que a proteína VMAT₂ não possui estrutura determinada, sendo necessário a obtenção de um modelo adequado para esta proteína. Para esse propósito foram utilizados os servidores: *Swiss Model*, *Phyre²*, *M4T Server*, *Lomets* e o software *Modeller* versão 9-22.1.

A partir do servidor *Swiss Model*, dois modelos foram obtidos, (I) com base em informações estruturais contidas na proteína 3WDO (transportado do tipo *YajR* de *E. coli*) com valor de cobertura final de 0.73; (II) com base em informações estruturais da proteína 2GFP (proteína de resistência multidrogas D de *E. coli*) com valor de cobertura final de 0.70 (Waterhouse et al., 2018). Usando o servidor *Phyre²* foi obtido um único modelo baseado nas informações estruturais existentes em cinco *templates* distintos: 3WDO, 4ZP0 (transportador multidrogas MdfA em complexo com desoxicolato de *E. coli*), 1PW4 (transportador de

glicerol-3-fosfato de *E. coli*), 4APS (família transportador POT de peptídeos de *Streptococcus thermophilus*) e 4LDS (Transportador de Glicose de *Staphylococcus epidermidis*) (Kelley et al., 2015). Empregando o servidor M4T, apenas um modelo para a VMAT₂ foi obtido, sendo este a partir das informações estruturais da proteína 3WDO, apresentando um valor de *Z-Score* de -2.93 (Fernandez-Fuentes et al., 2007; Rykunov, 2009). Utilizando o servidor LOMETS, três 3 modelos foram obtidos, (I) com base nas informações estruturais da proteína 3WDO apresentando valor de *Z-Score* igual a 1.51; (II) com base na estrutura da proteína 1PW4 com valor de *Z-Scores* de 1.87 e (III) com base na estrutura da proteína 6EXS (transportador do tipo POT de *S. hominis*) com *Z-Score* de 1.87 (Wu; Zhang, 2007).

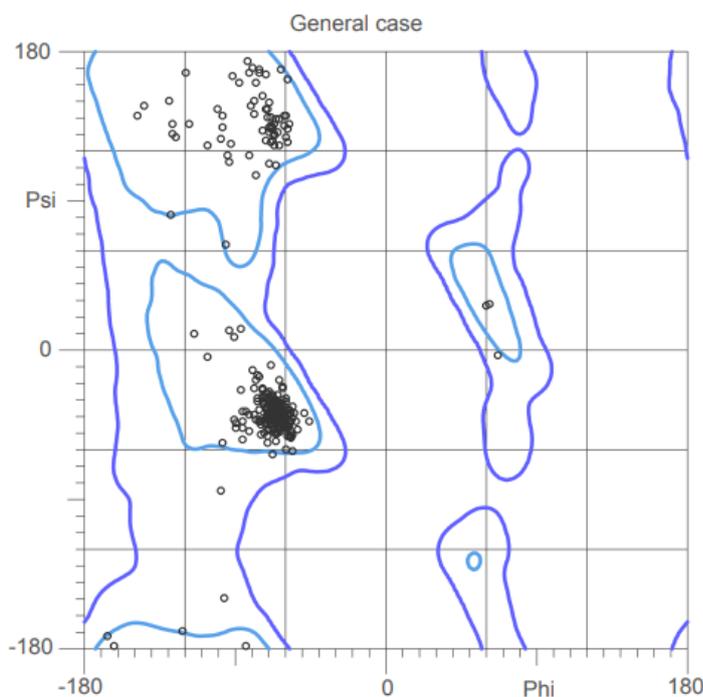
O *software* Modeller (Eswar et al., 2003), foi, também, utilizado para prever uma estrutura para a VMAT₂. Para este propósito, buscas avançadas no banco de dados RCSB (Goodsell et al., 2020), foram realizadas. Apenas os modelos 3WDO e 6EUQ (Transportado Multidrogas do tipo MdfA de *E. coli*), foram selecionados mediante parâmetros de cobertura, identidade de sequência, *E-value*, resolução estrutural e usados para obter um modelo teórico satisfatório para a VMAT₂. Cinquenta modelos foram obtidos a partir do *software Modeller* versão 9-22.1.

Todos os modelos teóricos obtidos (*Swiss Model* = dois modelos, *Phyre²* = um modelo, *M4T Server* = um modelo, *Lomets* = três modelos e o *software Modeller* versão 9-22.1 = 50 modelos, totalizando 57 modelos teóricos, respectivamente), foram analisados, usando as informações contidas nos pares de ângulos diédricos distribuídos em regiões favoráveis e/ou permitidas do gráfico de Ramachandran com auxílio do servidor *Molprobability* (CHEN et al., 2010). Após essa análise, um dos modelos (*model 3*) teóricos gerados pelo *software Modeller* versão 9-22.1, foi selecionado o como melhor com base nos critérios discorridos acima.

Em seguida, este modelo (*model 3*) foi otimizado no *software* Coot 0.8.1 (Emsley et al., 2010), pois os aminoácidos: Pro²⁸, Asn¹¹⁸, Arg¹⁵², Ser¹⁷², Pro²⁴⁰ e Ser⁴⁰¹, estavam localizados em regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran. Para tanto, foram realizados rearranjos manualmente de ângulos e/ou rotâmeros destes aminoácidos. De posse do modelo previamente otimizado pelo *software* Coot 0.8.1 (Emsley et al., 2010), este foi reavaliado no servidor *Molprobability* (Chen et al., 2010), e finalmente, minimizado suas energias usando o servidor *GalaxyWEB* (Ko et al., 2012), a partir da extinção de maus contatos entre os átomos do modelo teórico. Esse princípio consiste em direcionar o potencial permitindo a minimização de energia ao longo da superfície da molécula, de maneira que todo o sistema culmine em um mínimo de energia local próximo. Cinco modelos teóricos com sistemas minimizados foram obtidos a partir do servidor *GalaxyWEB* (Ko et al., 2012), e reavaliados

usando o servidor Molprobit (Chen et al., 2010), e destes selecionado o melhor (Figura 2).

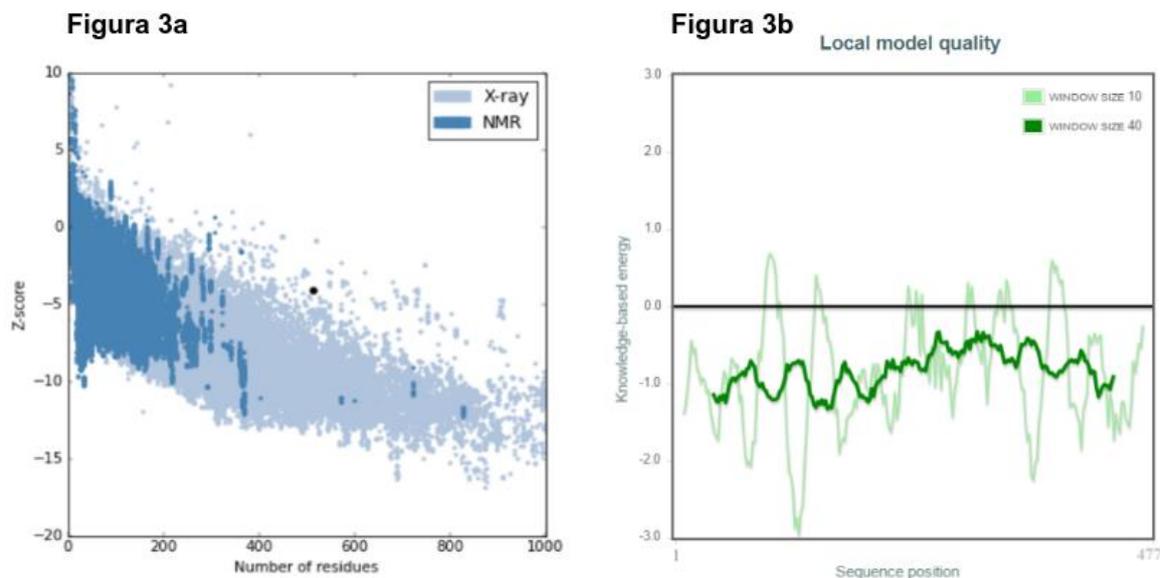
Figura 2 - Modelo final construído com o *software Modeller* versão 9-22.1, otimizado e refinado pelo *software* Coot 0.8.1 e o servidor GalaxyWEB, respectivamente.



Cada ponto circular negro corresponde a localização espacial de um dos aminoácidos presentes na proteína VMAT₂. Todos os aminoácidos devem estar localizados em uma das regiões: (I) *Regiões Permitidas* – Limitadas pelas linhas azuis escuras; (II) *Regiões Favoráveis* – Limitadas pelas linhas azuis claras. De forma canônica, exceto os aminoácidos Pro (muito rígido) e Gly (muito flexível), nenhum outro poderá estar fora dessas regiões. A presença de aminoácidos fora das regiões favoráveis ou permitidas indica erros na topologia espacial da proteína ou níveis de energias elevadas. Fonte: Própria pesquisa.

A qualidade global do modelo da VMAT₂ foi avaliada usando os servidores *ProSA-web*, *ERRAT* e *VERIFY_3D*. Segundo a avaliação realizada com o servidor *ProSA-web* (Wiederstein; Sippl, 2007), foi obtido um valor de *Z-Score* de -4.09 (Ponto negro – Figura 3a). Na segunda imagem, verifica-se a qualidade do modelo com base na energia geral da estrutura (Figura 3b). Em geral, valores positivos correspondem a partes problemáticas ou errôneas na estrutura enquanto valores predominantemente negativos sugerem uma boa qualidade do modelo (Wiederstein; Sippl, 2007). Os resultados desta ferramenta sugerem que o modelo avaliado mostra uma boa qualidade, visto que no gráfico de distribuição de energias, os valores se apresentaram negativos (Figura 3b, linha verde escura).

Figura 3 – Predição do servidor *Protein Structure Assessment (ProSA-web)* sobre o modelo da proteína VMAT₂. 3a. Valor de Z-score de -4.09 para VMAT₂.

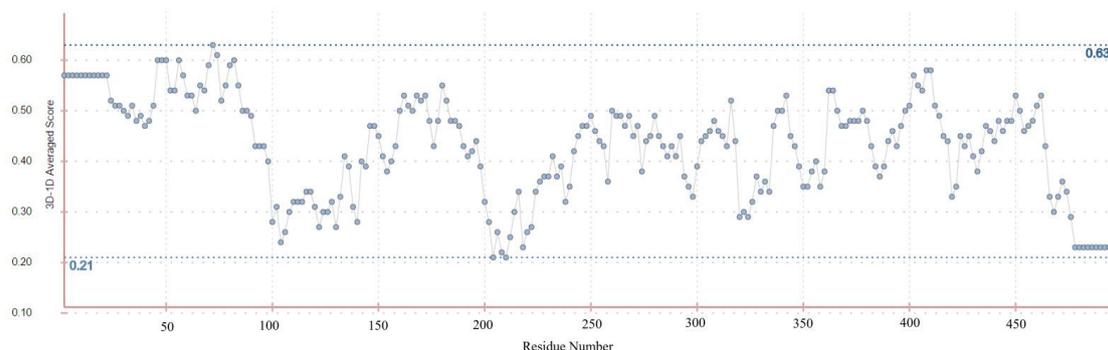


O ponto negro representa o modelo em análise enquanto a região azul escuro representa proteínas de estrutura resolvidas por ressonância magnética nuclear e a azul claro são as proteínas resolvidas por difração de Raios X. Figura 3b. Análise da distribuição de energia da VMAT₂. Nota-se que a maior parte da energia está distribuída na região negativa do gráfico, sugerindo que a estrutura da VMAT₂ apresenta boa qualidade. Fonte: Própria pesquisa.

Usando o servidor *ERRAT* (Colovos; Yeates, 1993), foram analisadas todas as interações não ligadas entre átomos. O resultado da análise apresentou um fator de qualidade global de: 95,816%. Esse valor sugere que o modelo previsto pode ser considerado de qualidade aceitável, de acordo com a escala de limite de confiança do *ERRAT* (<95%).

A avaliação realizada pelo servidor *Verify 3D* (Eisenberg; Lüthy; Bowie; 1997), tem a finalidade de verificar a qualidade da estrutura tridimensional do modelo previsto. Isto é possível mediante uma comparação de compatibilidade entre a estrutura testada, com seus próprios aminoácidos. Os resultados desta avaliação apresentaram pontuação 3D-1D de 100% (Figura 4). Justificando que o modelo teórico obtido para a VMAT₂ é de boa qualidade. Os pontos em cinza representam cada aminoácido distribuído de acordo com a pontuação bruta, enquanto os pontos azuis representam a distribuição dos mesmos aminoácidos de acordo com a pontuação média de *scores*. É possível notar o devido alinhamento na distribuição dos aminoácidos, evidenciando a qualidade do modelo avaliado.

Figura 4 - Avaliação do modelo tridimensional para a proteína VMAT₂ usando o *Verify 3D*. O eixo vertical representa a pontuação média do perfil 3D-1D de aminoácidos orientados em blocos de 25 resíduos.



O eixo horizontal representa o número de resíduos na sequência primária da proteína. O primeiros e o últimos 11 resíduos da sequência primária não são submetidos a análise. De acordo com o gráfico, a estrutura da VMAT₂ não mostra nenhum erro na distribuição de resíduos de aminoácidos ao longo do espaço tridimensional. Fonte: Própria pesquisa.

3.4 Docking molecular

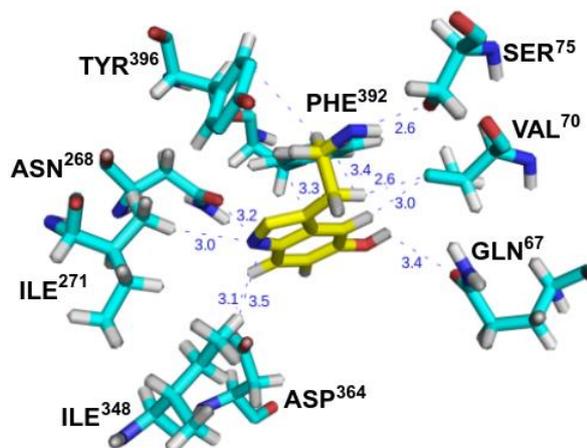
Para realizar a simulação de docking molecular entre a proteína VMAT₂ e seu ligante 5-HT, foi usado o servidor ROSIE (Lyskov et al., 2013), uma ferramenta interfaceada com o servidor Rosetta Server (<https://rosie.rosettacommons.org/>), para simulação de docking molecular. Após a simulação foi obtido um valor Total-Score de -854.662. Os resultados do docking demonstraram o modo de interação entre a 5-HT e os aminoácidos Gln⁶⁷, Val⁷⁰, Ser⁷⁵, Asn²⁶⁸, Ile²⁷¹, Ile³⁴⁸, Asp³⁶⁴, Phe³⁹² e Tyr³⁹⁶ da VMAT₂, com distâncias que variam de 2,6 a 3,5 Å (Figura 5a e 5b).

Figura 5 - Representação gráfica da interação molecular entre a 5-HT (serotonina) e a proteína VMAT₂ produzida através da ferramenta ROSIE.

Figura 5a



Figura 5b



(a) Posicionamento da molécula ligante no sítio ativo localizado mais ao centro no interior da proteína VMAT₂.
(b) Demonstração das interações entre os aminoácidos da VMAT₂ e a 5-HT, caracterizando um estado de ancoramento molecular. Fonte: Própria pesquisa.

Tendo em vista que este neurotransmissor é pertencente à classe das monoaminas, esta predição fornece uma representação e compreensão mais amplas do modo como ocorrem as interações moleculares que proporcionam a funcionalidade clássica da proteína em estudo.

4. Considerações Finais

Neste trabalho foi possível demonstrar por métodos *in silico* as principais características físicas e químicas da proteína VMAT₂, além dos aminoácidos envolvidos na interação com o neurotransmissor serotonina. As informações aqui apresentadas, podem contribuir de forma positiva para tomadas de novas decisões em diferentes pesquisas biomédicas que tenham a VMAT₂ como foco central da investigação. Os resultados obtidos aqui, culminam em um modelo tridimensional teórico da VMAT₂ humana, construído empregando o método de modelagem molecular comparativa baseado em duas estruturas proteicas de transportes (3WDO e 6EUQ) depositadas no banco de dados do PDB. A VMAT₂, um típico transportador de monoaminas, pertencente a Superfamília dos Facilitadores Maioritários apresenta na região *N*-terminal um putativo peptídeo sinal contendo 37 resíduos de aminoácidos. A presença de modificações pós-traducionais do tipo *N*-glicosilação contribui diretamente para a massa (~

55 kDa) conhecida da VMAT₂ biologicamente ativa. O motivo catalítico da VMAT₂, investigado sob a lógica do método de docking molecular revelou que os resíduos de aminoácidos de maior importância para a interação com a 5-HT são: Gln⁶⁷, Val⁷⁰, Ser⁷⁵, Asn²⁶⁸, Ile²⁷¹, Ile³⁴⁸, Asp³⁶⁴, Phe³⁹² e Tyr³⁹⁶, todos eles apresentando distância favoráveis de ligação com o ligante. O conjunto de informações inerentes a VMAT₂, apresentadas neste trabalho, constituem uma boa compreensão desta proteína transportadora, muito embora estudos posteriores sejam necessários, a fim de acurar os resultados aqui apresentados. Experimentos sob a óptica de cristalografia e difração de Raios X, podem corroborar com o modo de interação entre a proteína VMAT₂ humana e o neurotransmissor 5-HT.

Referências

- Asadi, S., Gholizadeh, Z., Jamali, M., Nazirzadeh, A., & Habibi, S. (2016). VMAT2 Gene molecular study of 2,000 peoples in the religious behavior and belief in God of the citizens of the city of Tabriz in Iran. *International Journal of Genetic Science*, 3(1), 1-6.
- Barbosa, A. R., Lima, M. M. S., Marques, C. M., & Ferraz, A. C. (2012). Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3 sobre a expressão de proteínas na substância cinzenta periaquidital de ratos wistar. *Cadernos da Escola de Saúde*, 8(1), 130-143.
- Bezerra, L. C. C., Queiroz, E. W. A., & Freire, J. E. C. (2018). Predição físico-química, modelagem e análise do mecanismo de interação da quitinase *Mo-chi₁* [*Moringa oleifera*, LAM.], com poli- β -(1-4)-*N*-acetil-*D*-glucosamina: uma abordagem *in silico*. *Desafios*, 5(1), 111-120.
- Buchan, D. W. A., & Jones, D. T. (2019). The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W402–W407.
- Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., & Frasconi, P. (2006). DISULFIND: A disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic acids research*, 34(suppl 2), W177-W181.

Chen, V. B., Arendall, W. B. 3rd., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), 12-21.

Colovos, C.; & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science*, 2(9), 1511-1519.

Dein, S. (2020). Transcendence, religion and social bonding. *Archive for the Psychology of Religion*, 42(1), 77-88.

Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W389-W394.

Eiden, L. E., & Weihe, E. (2011). VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216(1), 86-98.

Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U. (1997). VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 277, 396-404.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 486-501.

Eswar, N., John, B., Mirkovic, N., Fiser, A., Ilyin, V. A., Pieper, U., Stuart, A. C., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Yerkovich, B., & Sali, A. (2003). Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), 3375-3380.

Fernandez-Fuentes, N., Madrid-Aliste, C. J., Rai, B. K., Fajardo, J. E., & Fiser, A. (2007). M4T: A comparative protein structure modeling server. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2), W363-W368.

Ferrè, F., & Clote, P. (2005). DiANNA: A web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic acids research*, 33(suppl 2), W230-W232.

Finn, R D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A. J., Chang, H-Y., Dosztányi, Z., El-Gebali, S., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Holliday, G. L., Huang, H., Huang, X., Letunic, I., Lopez, R., Lu, S., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Mistry, J., Natale, D. A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C. A., Park, Y., Pesseat, S., Piovesan, D., Potter, S. C., Rawlings, N. D., Redaschi, N., Richardson, L., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C., Sillitoe, I., Smithers, B., Squizzato, S., Sutton, G., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S. C. E., Wu, C. H., Xenarios, I., Yeh, L-S., Young, S-Y., & Mitchell, A. L. (2016). InterPro in 2017 - Beyond protein family and domain annotations. *Nucleic acids research*, 45(D1), D190-D199.

Frank, K., & Manfred, J. (2008). High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. *Bioinformatics*, 24(19), 2172-2176.

Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Wang, Y. M., Jones, S. R., Levey, A. I., Miller, G. W., & Caron, M. G. (1998). Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *Journal of Neurochemistry*, 70(5), 1973-1978.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The proteomics protocols handbook*. Humana press, 571-607.

Goldberg, T., Hecht, M., Hamp, T., Karl, T., Yachdav, G., Ahmed, N., Altermann, U., Angerer, P., Ansorge, S., Balasz, K., Bernhofer, M., Betz, A., Cizmadija, L., Do, K. T., Gerke, J., Greil, R., Joerdens, V., Hastreiter, M., Hembach, K., Herzog, M., Kalemanov, M., Kluge, M., Meier, A., Nasir, H., Neumaier, U., Prade, V., Reeb, J., Sorokoumov, A., Troshani, I., Vorberg, S., Waldraff, S., Zierer, J., Nielsen, H., & Rost, B. (2014). LocTree3 prediction of localization. *Nucleic acids research*, 42(W1), W350-W355.

Goodsell, D. S., Zardecki, C., Di Costanzo, L., Duarte, J. M., Hudson, B. P., Persikova, I., Segura, J., Shao, C., Voigt, M., Westbrook, J. D., Young, J. Y., & Burley, S. K. (2020). RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. *Protein Science*, 29(1), 52-65.

Grazhdankin, E., Stepniewski, M., & Xhaard, H. (2020) Modeling membrane proteins: the importance of cysteine amino-acids. *Journal of Structural Biology*, 209(1), 107400.

Harris, N. J., Findlay, H. E., Sanders, M. R., Kedzierski, M., Santos, Á., & Booth, P. J. (2017). Comparative stability of major facilitator superfamily transport proteins. *European Biophysics Journal*, 46(7), 655-663.

Huang, M., He, W., Rajagopal, L., Kudwa, A., Grigoriadis, D. E., & Meltzer, H. Y. (2020). Effects of NBI-98782, a selective vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) inhibitor, on neurotransmitter efflux and phencyclidine-induced locomotor activity: Relevance to tardive dyskinesia and antipsychotic action. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 190, 172872.

Imani, M., Hosseinkhani, S., Ahmadian, A., & Nazari, M. (2010). Design and introduction of a disulfide bridge in firefly luciferase: increase of thermostability and decrease of pH sensitivity. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(8), 1167-1177.

Jassen, A. K., Brown, J. M., Panas, H. N., Miller, G. M., Xiao, D., & Madras, B. K. (2005). Variants of the primate vesicular monoamine transporter-2. *Molecular Brain Research*, 139(2), 251-257.

Jiang, D., Kong, Y., Ren, S., Cai, H., Zhang, Z., Huang, Z., Peng, F., Hua, F., Guan, Y., & Xie, F. (2020). Decreased striatal vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) expression in a type 1 diabetic rat model: A longitudinal study using micro-PET/CT. *Nuclear Medicine and Biology*, 82(83), 89-95.

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A.; He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. (2018). PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1102-D1109.

Ko, J., Park, H., Heo, L., & Seok, C. (2012). GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. *Nucleic acids research*, 40(W1), W294-W297.

Lee, J., Sands, Z. A., & Biggin, P. C. (2016). A Numbering System for MFS Transporter Proteins. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3(21), 1-13.

Lyskov, S., Chou, F-C., Conchúir, S. Ó., Der, B. S., Drew, K., Kuroda, D., Xu, J., Weitzner, B. D., Renfrew, P. D., Sripakdeevong, P., Borgo, B., Havranek, J. J., Kuhlman, B., Kortemme, T., Bonneau, R., Gray, J. J., & Das, R. (2013). Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE). *PloS one*, 8(5), e63906.

Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., & Bryant, S. H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research*, 43(D1), D222-D226.

Miller, G. W., Erickson, J. D., Perez, J. T., Penland, S. N., Mash, D. C., Rye, D. B., & Levey, A. I. (1999). Immunochemical analysis of vesicular monoamine transporter (VMAT2) protein in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 156(1), 138-148.

Monteiro-Júnior, J. E., Sousa, S. C. O, Silva, M. N., Medeiros, S. C., Freire, C. M. A. S., & Freire, J. E. C. (2017). New biochemical and physicochemical insights on a muskmelon [*Cucumis melo* (L.)] chitinase. *IOSR Journal Of Pharmacy*. 7(1), 46-57.

MULVIHILL, K. G. (2019). Presynaptic regulation of dopamine release: Role of the DAT and VMAT2 transporters. *Neurochemistry International*, 122, 94-105.

Nagano, R., & Masuda, K. (2014). Establishment of a signal peptide with cross-species compatibility for functional antibody expression in both *Escherichia coli* and chinese hamster ovary cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 447(4), 655-659.

Narendran, R., Lopresti, B. J., Martinez, D., Mason, N. S., Himes, M., May, M. A., Daley, D. C., Price, J. C., Mathis, C. A., & Frankle, W. G. (2012). *In vivo* evidence for reduced striatal vesicular monoamine transporter (VMAT2) availability in cocaine abusers. *The American Journal of Psychiatry*, 169(1), 55-63.

Nickell, J. R., Siripurapu, K. B., Vartak, A., Crooks, P. A., & Dwoskin, L. P. (2014). The Vesicular Monoamine Transporter-2: An important pharmacological target for the discovery of novel therapeutics to treat methamphetamine abuse. *Advances in Pharmacology*, 69, 71-106.

Nyarko, J. N. K., Quartey, M. O., Heistad, R. M., Pennington, P. R., Poon, L. J., Knudsen, K. J., Allonby, O., Zawily, A. M. E., Freywald, A., Rauw, G., Baker, G. B., & Mousseau, D. D. (2018). Glycosylation states of pre- and post-synaptic markers of 5-HT neurons differ with sex and 5-HTTLPR genotype in cortical autopsy samples. *Frontiers in Neuroscience*, 12(545), 1-17.

O'Brien, C., Liang, G., Farber, R., & Kurlan, R. (2016). Selective VMAT Inhibitors for Tourette Syndrome. *Austin Journal of Neurological Disorders & Epilepsy*, 3(2), 1019.

Owens, D. C. (2019). Tardive dyskinesia update: treatment and management. *BJPsych Advances*, 25, 78-89.

Pecic, S., Milosavic, N., Rayat, G., Maffei, A., & Harris, P. E. (2019). A novel optical tracer for VMAT2 applied to live cell measurements of vesicle maturation in cultured human β -cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13.

Robinson, P. J., Kanemura, S., Cao, X., & Bulleid, N. J. (2020). Protein secondary structure determines the temporal relationship between folding and disulfide formation. *Journal of Biological Chemistry*, 295(8), 2438-2448.

Rykunov, D., Steinberger, E., Madrid-Aliste, C. J., & Fiser, A. (2009). Improved scoring function for comparative modeling using the M4T method. *Journal of structural and functional genomics*, 10(1), 95-99.

Savosina, P., Karasev, D., Veselovsky, A., Miroshnichenko, Y., & Sobolev, B. (2020). Functional and structural features of proteins associated with alternative splicing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 513-520.

Sreeram, V., Shagufta, S., & Kagadkar, F. (2019). Role of vesicular monoamine transporter 2 inhibitors in tardive dyskinesia management. *Cureus*, 11(8), e5471.

Torres, B., & Ruoho, A. E. (2014). N-terminus regulation of VMAT2 mediates methamphetamine-stimulated efflux. *Neuroscience*, 259, 194-202.

Wang, Y. M., Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Xu, F., Jones, S. R., Bock, C. B., Miller, G. W., Wightman, R. M., & Caron, M. G. (1997). Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron*, 19(6), 1285-1296.

Wang, S. C., Davejan, P., Hendargo, K. J., Javadi-Razaz, I., Chou, A., Yee, D. C., Ghazi, F., Lam, K. J. K., Conn, A. M., Madrigal, A., Medrano-Soto, A., & Saier Jr., M. H. (2020). Expansion of the Major Facilitator Superfamily (MFS) to include novel transporters as well as transmembrane-acting enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 20, 183277.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, v. 46(W1), W296-W303.

Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl-2), W407-W410.

Wiradharma, N., Khoe, U., Hauser, C. A., Seow, S. V., Zhang, S., & Yang, Y. Y. (2011). Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. *Biomaterials*, 32(8), 2204-2212.

Wu, S., & Zhang, Y. (2007). LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic acids research*, 35(10), 3375-3382.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Lara Lys Santos Rocha – 50%

José Ednésio da Cruz Freire – 50%

Nome do segundo autor centralizado – 50%