

Análise da Estabilidade Térmica da Lisozima por Dinâmica Molecular

Rafael da Silva Braz¹; José Rafael Bordin³

¹Universidade Federal de Pelotas – braz.rafael@ufpel.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – jrbordin@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A desnaturação proteica é um fenômeno no qual proteínas perdem sua estrutura tridimensional inicial, resultando na perda de função biológica e alterações em suas propriedades físico-químicas LESNIEROWSKI (2007). Este processo, frequentemente desencadeado por estresses térmicos, pode ser reversível ou irreversível dependendo da intensidade do estímulo e das características intrínsecas da proteína. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na desnaturação térmica é crucial para diversas áreas, incluindo biotecnologia, desenvolvimento de fármacos e indústria alimentícia, onde a estabilidade proteica sob condições adversas é frequentemente um fator determinante.

Neste contexto, a lisozima destaca-se como um modelo biológico para estudos de estabilidade proteica. Esta enzima é encontrada na clara de ovo, exerce função antimicrobiana através da hidrólise de peptidoglicanos na parede celular bacteriana LESNIEROWSKI (2007). Sua estabilidade térmica e conformacional, associada à extensa caracterização experimental prévia, tornam-na um sistema ideal para investigações computacionais sobre desnaturação.

Neste trabalho, empregamos simulações de dinâmica molecular para investigar o comportamento estrutural da lisozima sob um gradiente térmico que varia de 273 K a 373 K, com incrementos de 10 K. Esta abordagem permite caracterizar em nível atômico as transições conformacionais associadas ao processo de desnaturação térmica, identificando temperaturas críticas para a perda de estrutura secundária e terciária.

Além de contribuir para a compreensão fundamental dos mecanismos de desnaturação, este estudo busca validar abordagens computacionais para prever a estabilidade térmica de proteínas. A concordância entre nossos resultados e dados disponíveis na literatura serviria como validação do protocolo computacional adotado, abrindo perspectivas para a aplicação dessas metodologias no estudo de outras proteínas de interesse.

2. METODOLOGIA

O estudo da desnaturação térmica da lisozima foi conduzido por meio de simulações de dinâmica molecular, utilizando a versão 2025.2 do software GROMACS (ABRAHAM, 2015). A estrutura inicial da proteína, obtida do Protein Data Bank (PDB), foi submetida à remoção de ligantes e moléculas de água cristalizada para assegurar um sistema inicial livre de interferências. Em seguida, a proteína foi inserida em uma caixa computacional periódica e solvatada com

água modelada explicitamente pelo modelo SPC216 (Simple Point Charge Model), garantindo um ambiente solvente biologicamente realista. Considerando a carga líquida positiva da proteína, o sistema foi neutralizado pela adição de íons, assegurando condições eletrostaticamente equilibradas e compatíveis com simulações de sistemas biológicos.

As interações interatômicas foram descritas por meio do campo de força OPLS-AA, que incorpora potenciais de ligação covalente, angulares, diedrais e termos não ligantes (Van der Waals e eletrostáticos), permitindo uma representação fisicamente consistente das forças moleculares. Após a montagem do sistema, realizou-se uma etapa de minimização de energia para eliminar conformações atômicas sobrepostas e atingir um estado inicial energeticamente estável. O sistema foi subsequentemente equilibrado em dois estágios termodinâmicos distintos: inicialmente sob condições de temperatura constante (ensemble NVT), visando estabilizar a energia cinética do sistema. Em seguida, o sistema foi equilibrado sob condições de temperatura e pressão constantes (ensemble NPT), mantendo a temperatura com o termostato V-rescale e a pressão isotermicamente em 1 bar com o barostato C-rescale, assim como em NNYIGIDE (2021). Esta etapa garantiu que o sistema atingisse a densidade e pressão adequadas ao ambiente fisiológico antes das simulações de produção.

Para investigar a resposta térmica da lisozima, simulações de produção foram realizadas em um intervalo de temperaturas entre 273 K e 373 K, com incrementos de 10 K. A análise estrutural concentrou-se em dois parâmetros fundamentais: o raio de giro, que quantifica a compactação global da proteína, e o desvio quadrático médio (RMSD), que avalia desvios conformacionais em relação à estrutura inicial. Essas métricas permitiram caracterizar termodinamicamente a transição entre os estados nativo e desnaturado, elucidando os mecanismos moleculares associados à perda de estrutura induzida por temperatura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

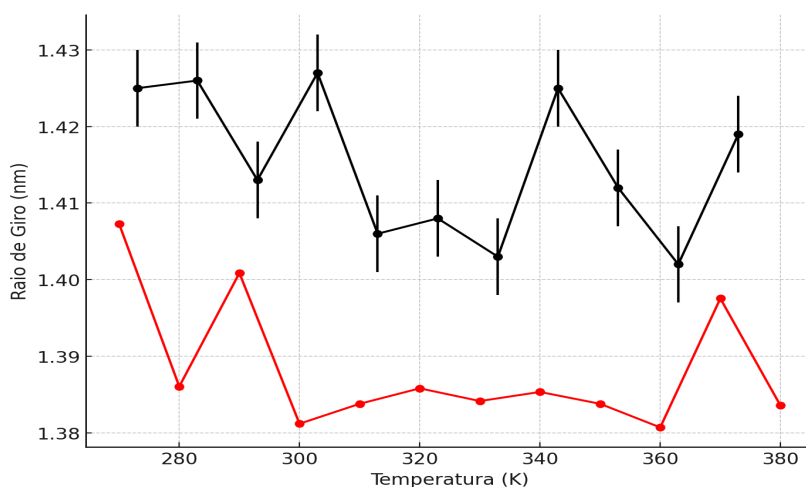


Figura 1: Raio de giro x Temperatura em Kelvin, em vermelho temos os dados obtidos a partir da Figura 8 na referência HUDA (2024), em preto temos os dados obtidos neste trabalho.

O raio de giro (R_g) médio da lisozima, calculado entre 2-5 ns de simulação, foi monitorado em função da temperatura (273–373 K). Os resultados, sumarizados na Figura 1, demonstram que o R_g permaneceu relativamente estável entre 1,400 nm e 1,430 nm, indicando uma notável resistência à desnaturação térmica mesmo em temperaturas elevadas. Esta estabilidade é particularmente evidente ao se observar que a diferença máxima observada no R_g ao longo de todo o intervalo térmico foi inferior a 0,02 nm, sugerindo que a proteína mantém sua integridade estrutural sob condições termicamente estressantes.

A estabilidade do raio de giro observada sugere que a lisozima mantém sua compactação estrutural ao longo de toda a faixa de temperaturas investigada. Este comportamento é consistente com a conhecida robustez térmica desta proteína. As pequenas variações ($< 0,02$ nm) registradas não indicam desnaturação significativa, mas podem refletir ajustes conformacionais locais em resposta ao estresse térmico, como pequenos rearranjos de cadeias laterais ou flexibilidade segmentar adaptativa.

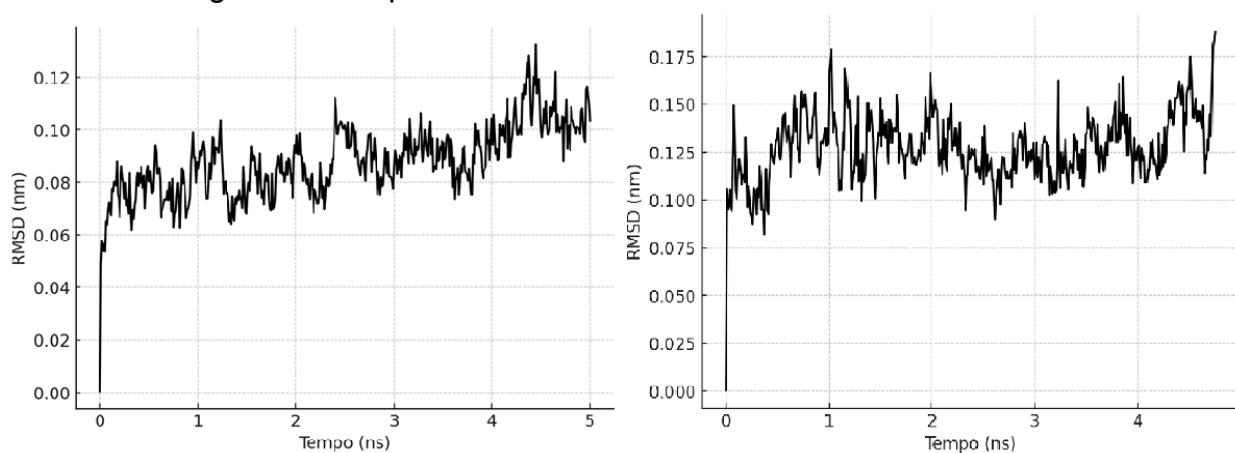


Figura 2: A esquerda temos o gráfico de RMSD x Temperatura a 273 K e a direita temos o mesmo gráfico agora a 373 K.

Optamos por utilizar o intervalo temporal de 2 a 5 ns de cada simulação, essa escolha foi feita por conta do comportamento do RMSD dos sistemas. Como evidenciado na Figura 2, ambos os sistemas – nas temperaturas de 273 K e 373 K – atingem um estado de equilíbrio após aproximadamente 2 ns de simulação. Até este ponto, observa-se uma fase inicial de ajuste conformacional, caracterizada por flutuações do RMSD, seguida por uma estabilização e a manutenção de um platô estável.

O período de 2 a 5 ns, portanto, assegura que as análises de propriedades termodinâmicas e estruturais, como Raio de giro, sejam realizadas sobre trajetórias equilibradas. Essa abordagem é amplamente adotada na literatura de simulações de DM NNYIGIDE (2021) para garantir a robustez e a confiabilidade estatística dos resultados obtidos.

Estudos experimentais reportam que a lisozima mantém sua estrutura nativa até aproximadamente 345-350 K em condições fisiológicas, com desnaturação completa ocorrendo geralmente acima de 350 K. A ausência de um aumento abrupto no R_g em nossas simulações, mesmo a 373 K, pode ser

atribuída à natureza dependente do tempo do processo de desnaturação. Vale ressaltar que o tempo de simulação (5 ns) pode ser insuficiente para observar a desnaturação completa, que é um processo cinematicamente complexo que pode requerer escalas de tempo mais longas para se manifestar completamente.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu a aplicação e consolidação de técnicas computacionais de dinâmica molecular para o estudo da estabilidade térmica de proteínas, utilizando a lisozima como sistema modelo. Através da análise do raio de giro em diferentes temperaturas, foi possível caracterizar a notável estabilidade estrutural desta proteína, consistentemente reportada na literatura. Os resultados obtidos validam a metodologia empregada e demonstram a confiabilidade das simulações moleculares como ferramenta complementar aos estudos experimentais de desnaturação proteica.

Como próximos passos, planeja-se expandir esta investigação através de simulações com tempo significativamente maior, visando capturar eventuais processos de desnaturação que possam ocorrer em escalas temporais mais longas. Adicionalmente, técnicas computacionais especializadas, como Temperature Annealing, serão implementadas para investigar de forma mais direta os efeitos térmicos no sistema. Novas análises computacionais poderão também ser incorporadas para complementar os resultados aqui obtidos, permitindo uma caracterização mais abrangente do comportamento termodinâmico e estrutural do sistema. O protocolo estabelecido neste trabalho serve assim como base sólida para investigações futuras mais aprofundadas nesta linha de pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] NNYIGIDE, O. S.; HYUN, K. Molecular dynamics studies of the protective and destructive effects of sodium dodecyl sulfate in thermal denaturation of hen egg-white lysozyme and bovine serum albumin. ***Journal of Biomolecular Structure and Dynamics***, Busan, v. **39**, n. 3, p. 1106-1120, 2021
- [2] ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, Amsterdam, v.1-2, p.19-25, 2015.
- [3] HUDA, M. M.; ADAWIYAH, R.; PRADANA, A. R. Thermodynamic and Conformational Analysis of GTRNase and Lysozyme Proteins Under Thermal Variations using Molecular Dynamics Simulations. ***Jurnal Pijar Mipa***, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 946–953, 2024.
- [4] LESNIEROWSKI, Grezegorz; KIJOWSKI, Jacek. Lysozyme. In: **Bioactive egg compounds**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 33-42.