

Universidade de Brasília
Instituto de Biologia

**Estudo estrutural *in silico* do inibidor de proteases BTCI
em complexo com a tripsina e quimotripsina e efeito
anticarcinogênico deste inibidor nanoestruturado**

DIEGO ELIAS HONDA

Brasília
2020



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia



TESE DE DOUTORADO

Estudo estrutural *in silico* do inibidor de proteases BTCI em complexo com a tripsina e quimotripsina e efeito anticarcinogênico deste inibidor nanoestruturado

Me. Diego Elias Honda
Orientadora: Dra. Sonia Maria de Freitas
Coorientador: Dr. João Batista Lopes Martins

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

Brasília
2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

Diego Elias Honda

Título do trabalho: Estudo estrutural *in silico* do inibidor de proteases BTC1 em complexo com a tripsina e quimotripsina e efeito anticarcinogênico deste inibidor nanoestruturado.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Aprovada em: 25/09/2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas
Universidade de Brasília

Prof. Dr. João Batista Lopes Martins
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro
Universidade de Brasília

Prof. Dr. José Roberto dos Santos Politi
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Elton Anderson Santos de Castro
Universidade Estadual de Goiás

Prof. Dr. Aisel Valle Garay
Universidade de Brasília



Dedico este trabalho Àquele que fez minha alma
o jardim de suas delicias;

e à Imaculada, Mãe de Deus e assunta aos céus
Virgem do Carmo, cujo ventre o gerou.

“Por ocasião do teu nascimento, ao vires ao mundo, não cortaram o teu cordão umbilical, não foste lavada para tua purificação, não foste esfregada no sal, nem foste enfaixada. Nenhum olhar de piedade pousou sobre ti, disposto a fazer-te qualquer dessas coisas por compaixão de ti. No dia em que nasceste foste atirada ao pleno campo, tal era a indiferença que te mostravam. Ao passar junto de ti, eu te vi a estrebuchar no teu próprio sangue. Vendo-te envolta em teu sangue, eu disse: “Vive!” Comprometi-me contigo por juramento e fiz aliança contigo – oráculo do Senhor lahweh – e tu te tornaste minha.”

Ez 16, 4-6.8

“Dir-se-ia também que Sua Majestade anda experimentando uns e outros, para ver quem o quer. Se, porventura, a fé naquilo que ele há de dar um dia estiver amortecida, para avivá-la o Senhor revela quem ele é por meio daquela alegria interior tão soberana. Parece dizer: ‘Olhai que isso não é mais que uma gota do mar imenso de meus tesouros’. Nada deixa de fazer em favor daqueles que ama. Vendo que o recebem, dá tudo de dá-se a si mesmo. Quer a quem o quer. E como sabe querer bem! E que bom amigo! Ó Senhor de minha alma, quem saberia ter palavras para fazer compreender o que dais aos que confiam em vós!”

Santa Teresa de Jesus, Livro da Vida

Agradecimentos

Brasil

A vida humana é mesmo um dom extraordinário. Segundo alguns pesquisadores, estima-se que em todo o planeta existam mais de 8,7 milhões de espécies de seres vivos.¹ A grande maioria deles ainda não é catalogada – somente para realizar este processo, dizem, levaria mais de 1000 anos. Pensar que nós, *Homo sapiens*, somos a única capaz daquela liberdade de esvaziar-se de si mesmo para, livremente, se doar ao outro é, simplesmente, extraordinário. Sim, como aqueles 8,7 milhões, uma vez que estivermos embaixo da terra, não vamos durar nem um mês. Entretanto, diferentemente de todos estes animais, a ação humana tem o poder de tocar na eternidade.²

Ah, vovó e vovô, com vocês aprendi que não existe palavra mais bonita que *sacrifício*, pois é através dela que todas as outras são geradas e adquirem sentido! Mas como o valor de cada ação humana é dado pelo seu fim, o sacrifício por si mesmo é um imenso vazio. Depois de muitos anos, descobri que vida que se fez oferta pelas mãos de vocês não me deu uma pós-graduação, mas o meio pelo qual ocorreu o toque daquela única graça que conseguiu preencher meu coração e nunca mais me deixou. Obrigado por sempre estarem ao meu lado. Estas folhas são um pequeno mimo que os ofereço, mas pouquíssimo perto de todo amor com o qual os tenho.

Ah, minha mãe, como agradecer pelo maior presente que já recebi? O seu *sim* foi uma reverberação heroica daquele outro *Sim*; não se importando tanto com a estrada, mas tendo os olhos fitos no destino. Como é bom tê-la a meu lado durante esta caminhada; como é bom experimentar esse ar que passa pelas narinas e nos possibilita, através das tribulações, encontrar a plenitude daquela vida que não tem hora pra acabar. Como eu queria que outros tivessem a mesma sorte. Mas, se a régua é o papel, daqui saiu um doutorado. Hoje em dia é isso que conta, ne?!³

¹ *How many species are there on Earth and in the ocean?* PLoS Biol 2011 9(8):e1001127.

² Se você, biólogo, veio aqui pra me dizer que nem todos *animais* são *seres vivos*... Eu sou químico!

³ Não, não é isso que conta.

Ah, minha eterna namorada... Assim como se enxerga a luz através de sua reflexão, o amar somente consegui quando o vi emanado de você refletido em mim, rumo àquele banquete no qual somos três. Obrigado por ter me ajudado a chegar até este pequeno final, sendo a coluna firme na qual me apoio e almejando juntos aquela única sarça que não se consome.

Ah, meus orientadores! Agora, enfim, podemos dizer: acabou! Durante este trabalho nós realizamos diversos cálculos. Todavia, se fôssemos mensurar quantos *kcal* de dor de cabeça vocês tiveram por *mol* de preocupações, precisaríamos de outro doutorado! Sou grato por terem sido um espelho daquela benevolência a todos disponível, não desistido quando eu desisti.

A maior descoberta destes 4 anos não foi um método semi-empírico que permite identificar corretamente os resíduos da interface de uma interação entre proteínas. No final das contas, um dia este trabalho será esquecido, mas seu valor permanecerá naquilo que não finda jamais: por trás de cada um que passou pela minha vida, pude experimentar sinais do eterno manifestados em gestos de sacrifício. Se é loucura gastar a vida naquilo que um dia há de perecer, seria igualmente desatino não a despejar em atos de doação, afinal, a caridade jamais passará⁴ - e isso, só o *Homo sapiens* consegue realizar. A vida humana é mesmo um dom extraordinário.

1 em 8,7 milhões é um sinal de eternidade.

Apoiaram este trabalho: Paróquia Santa Teresinha/Servos da Caridade/Grupo de Coroinhas, Carmelo Nossa Senhora do Carmo, São José, Santa Teresa de Jesus, Santa Teresa de Lisieux, Santa Rita de Cassia, CAPES e CNPq.

Czech Republic

Part of this work was done in Prague, under the orientation of Dr Pavel Hobza. I would like to express my deep gratitude to him and all his collaborators, especially Dr Adam Pecina and Dr Martin Lepsik. It was incredible to spend part of my life in this beautiful city and in such wonderful company.

⁴ 1 Cor 13, 8.

RESUMO

O inibidor de tripsina e quimotripsina extraído de sementes do feijão-de-corda *Vigna unguiculata* (BTCI) é uma proteína com elevado potencial biotecnológico. Desde o combate às pragas de lavoura, como o bicudo-do-algodoeiro, até o controle da homeostase no sistema renal, o BTCI se mostra um promissor agente. Todavia, nos últimos anos tem sido explorada principalmente sua atividade anticarcinogênica. Estudos recentes demonstraram que este inibidor induz efeitos citotóxicos e citostáticos em células de adenocarcinoma mamário invasivo e não invasivo. O que realça ainda mais sua viabilidade nesse contexto é o fato de, concomitantemente a estas consequências para células neoplásticas, células saudáveis não serem afetadas. Com isso, o BTCI se mostra um agente com potencialidade ainda mais pronunciada ao não manifestar os efeitos adversos advindos de tratamentos quimioterápicos. Neste sentido, um dos objetivos do presente trabalho foi encapsular o BTCI em nanopartículas de quitosana a fim de maximizar sua conjugação com as células tumorais. Uma das possíveis rotas bioquímicas na qual o BTCI atua ao adentrar estas células é a da degradação proteica proteossômica mediante ubiquitinação. Ancorando-se ao proteossoma 20S, inativa-o, tornando inviáveis as células neoplásticas. A interação BTCI-proteossoma se dá em sítios semelhantes aos da tripsina e quimotripsina. Entretanto, ainda não há uma descrição clara do mecanismo químico que ocorre quando dessa ligação, dado que, pelo grande tamanho do proteossoma, estudos experimentais e computacionais são por demais custosos. Sendo assim, objetivou-se também, por técnicas *in silico* semi-empíricas utilizando as metodologias PM6-D3H4/COSMO e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO, aferir as principais interações que ocorrem quando da formação dos sistemas BTCI-tripsina e BTCI-quimotripsina, identificando os resíduos mais colaborativos destas três proteínas. Nos ensaios relativos à nanoestruturação do BTCI, observou-se que, contra células de MCF-7, as nanopartículas atenuavam os efeitos citotóxicos em comparação com aqueles relativos ao inibidor puro. Portanto, os resultados obtidos indicaram que, em estudos posteriores, o método de nanoestruturação deverá ser redesenhado. Por outro lado, os experimentos computacionais revelaram uma excepcional convergência em

relação aos dados presentes na literatura. Em ambos os sistemas BTCl-tripsina e BTCl-quimotripsina, as rotinas computacionais foram capazes de identificar tanto os resíduos da tríade e do bolsão catalíticos quando os da cavidade oxifônica. Assim sendo, a rotina in silico aqui adotada permitiu identificar os resíduos mais importantes para o mecanismo de inibição das proteases em questão pelo BTCl. Por fim, de modo igualmente eficaz, esta abordagem evidenciou a importância energética das moléculas de água para a ancoragem do BTCl à tripsina – fato também já previsto pela literatura. Portanto, os resultados deste trabalho mostraram que a metodologia semiempírica utilizada foi adequada para o estudo das interações químicas existentes nos sistemas formados pelo BTCl e pelas serinoproteases tripsina e quimotripsina. A partir disso, ensaios posteriores poderão ser formulados para o entendimento do sistema BTCl-proteassoma - visto que os sítios reativos são semelhantes àqueles das proteases -, esclarecendo o mecanismo inibitório de células tumorais por parte do BTCl.

Palavras-chave: BTCl, câncer de mama, nanocápsulas, nanotecnologia, semi-empírico, química computacional, proteassoma.

ABSTRACT

The trypsin and chymotrypsin inhibitor extracted from the seeds of cowpea *Vigna unguiculata* (BTCI) is a protein with high biotechnological potential. It shows high activity against the boll weevil, a beetle that damage cotton cultivation. Besides that, it can regulate homeostasis in the kidney system. However, in recent years, its anticarcinogenic activity has been in the spotlight. Recent studies have shown that this inhibitor induces cytotoxic and cytostatic effects in invasive and non-invasive breast adenocarcinoma cells. Furthermore, healthy cells are not affected. As a result, BTCI proves to be even more relevant as it does not manifest the adverse effects arising from chemotherapy treatments. In this sense, one of the objectives of the present work was to encapsulate BTCI in chitosan nanoparticles in order to maximize its conjugation with tumor cells. One of the possible biochemical routes in which BTCI acts when entering these cells is the ubiquitin proteasome pathway. It inactivates the proteasome 20S by binding to it, making neoplastic cells inviable. The BTCI-proteasome interaction occurs at trypsin and chymotrypsin-like sites. However, there is no clear description of the chemical mechanism involved in that reaction. Due to the large size of the proteasome, experimental and computational studies are too demanding. Thus, another objective of this work was, through computational techniques, using the semi-empirical PM6-D3H4 / COSMO and SCC-DFTB3-D3H4X / COSMO methodologies, seek the main interactions that occur by the binding of BTCI to trypsin and chymotrypsin, identifying the most collaborative residues of these three proteins. Regarding nanoencapsulation of BTCI, it was observed that, against MCF-7 cells, the nanoparticles attenuated the cytotoxic effects in comparison with those related to the inhibitor by itself. Thus, in this perspective, the results obtained indicated that, in subsequent studies, the nano structuring method should be redesigned. On the other hand, the computational experiments revealed an exceptional convergence in relation to experimental data. In both BTCI-trypsin and BTCI-chymotrypsin systems, was possible to identify the catalytic triad, the S1 site and the oxyanion hole. Therefore, it can be stated that the methodology adopted here was successful in identifying the most important residues for both proteases inhibition

mechanisms. Finally, this approach was equally effective highlighting the energetic importance of water molecules for anchoring of BTCl to trypsin - a fact that is also experimentally proven. Therefore, this work shows the existence of an effective semi-empirical methodology to assign the most important residues to the BTCl-trypsin and BTCl-chymotrypsin systems. Thereafter, further studies can be formulated to understand the BTCl-proteasome system - since its reactive sites are similar to trypsin and chymotrypsin ones -, helping to clarify the mechanism in which BTCl inhibit tumor cells.

Key words: BTCl, breast cancer, nanocapsules, nanotechnology, semi-empirical, computational chemistry, proteasome

ÍNDICE

PARTE I

Introdução

1 A descoberta dos inibidores de proteases: famílias Kunitz e Bowman-Birk	22
2 O inibidor de proteases Bowman-Birk isolado de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> (BTCI): estrutura e função	25
2.1 A interface BTCI-tripsina	31
2.1.1 As moléculas de água da interface BTCI-tripsina	33
2.2 A interface BTCI-quimotripsina	35
3 Aspectos termodinâmicos das interações BTCI-tripsina e BTCI-quimotripsina	39
4 Oligomerização do BTCI	44
4.1 Efeitos termodinâmicos da oligomerização do BTCI	46
5 Aspectos funcionais e potencial biotecnológico do BTCI: efeitos anticarcinogênicos em células de câncer de mama	48
5.1 O BTCI e o proteossoma 20S	53
6 Nanoencapsulamento	57

PARTE II

Justificativa e Objetivos

1 Justificativa	60
2 Objetivos	61
2.1 Objetivos específicos	61

PARTE III

Metodologia

SEÇÃO A

Métodos experimentais

1 Purificação do BTCI	64
1.1 Obtenção de sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	64
1.2 Obtenção do extrato bruto	65

1.3 Cromatografia de troca iônica e análise de pureza	66
2 Encapsulamento do BTCl em quitosana	68
2.1 Síntese de nanopartículas de quitosana via método químico	68
2.2 Caracterização hidrodinâmica das nanopartículas	69
3 Ensaios <i>in vitro</i>	70
3.1 Manutenção da cultura de células	70
3.2 Tratamento das células com BTCl nanoestruturado	71
3.3 Análise estatística	73

SEÇÃO B

Métodos computacionais

4 Procedimentos e cálculos realizados	75
4.1 Preparação do sistema	75
4.2 Análise dos resíduos de aminoácidos mais colaborativos	76

PARTE IV

Resultados e Discussão

SEÇÃO A

*Experimentos *in vitro**

1 Obtenção do BTCl livre e nanoestruturado	81
1.1 Pureza e caracterização do BTCl	81
1.2 Produção e caracterização das nanocápsulas contendo BTCl	83
2 Ensaios <i>in vitro</i>	85
2.1 Viabilidade celular mediante tratamento com BTCl nanoencapsulado	85

SEÇÃO B

*Experimentos *in silico**

3 Análise <i>in silico</i>	90
3.1 Curva de fragmentação do sistema BTCl-quimotripsina	91
3.2 <i>Cluster</i> BTCl-quimotripsina <i>versus</i> sistema completo	94
3.3 Cálculo SCC-DFTB3-D3H4X para o <i>cluster</i> BTCl-quimotripsina	98
3.4 Análise mecanística da interface BTCl-quimotripsina	101

3.5 Efeitos não covalentes associados aos resíduos da interface BTCl-quimotripsina	114
3.6 Curva de fragmentação do sistema BTCl-tripsina	121
3.7 <i>Cluster</i> BTCl-tripsina <i>versus</i> sistema completo	125
3.8 Cálculo SCC-DFTB3-D3H4X para o <i>cluster</i> BTCl-tripsina	128
3.9 Análise mecanística da interface BTCl-tripsina	131
3.10 Efeitos não covalentes associados aos resíduos da interface BTCl-tripsina	143
3.11 Análise da hidrofiliçidade da interface BTCl-tripsina	150

PARTE V

Considerações Finais

1 Conclusão	161
2 Referências bibliográficas	165
3 Trabalhos publicados	178
4 Patentes	178
5 Apresentações orais	178
6 Participações em eventos	179
7 Certificados	179

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional do BTCl, com destaque para os dois resíduos do sítio reativo	25
Figura 2. Estrutura tridimensional do BTCl, com destaque para os resíduos hidrofílicos	28
Figura 3. Estrutura tridimensional do BTCl, com destaque para o <i>cluster</i> de resíduos aromáticos	29
Figura 4. Ponte salina entre sítio reativo do BTCl e a tripsina, com destaque para a proximidade da ligação dissulfeto	32
Figura 5. Sítio reativo do BTCl e sua proximidade com a Ser ¹⁸⁹ e a Ser ¹⁹⁵ , com destaque para a ligação dissulfeto próxima	36
Figura 6. Bolsão catalítico da quimotripsina e ancoragem do BTCl, com destaque para a Phe ⁵³ (em verde)	38
Figura 7. (A) O proteassoma, com destaque para as subunidades catalíticas, em vermelho; (B) vista superior do proteassoma, por onde entram proteínas	53
Figura 8. Perfil cromatográfico da purificação do BTCl por troca iônica. Em azul tem-se o espectro de absorvância do conteúdo que elui da coluna; em vermelho, a condutividade. Ambas curvas foram geradas concomitantemente e em tempo real. O pico correspondente ao BTCl está em aproximadamente 900 mAu	81
Figura 9. Perfil cromatográfico de separação do BTCl do NaCl por exclusão molecular. Em azul tem-se o espectro de absorvância do conteúdo que elui da coluna; em vermelho, a condutividade. Ambas curvas foram geradas concomitantemente e em tempo real	82
Figura 10. Análise de pureza do BTCl por espectrometria de massa MALDI-TOF. O pico referente ao BTCl é o de 9104,814 Da; o outro, de 4551,545 Da, é de seu equivalente com dupla carga	83
Figura 11. Ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT	86
Figura 12. Curva de fragmentação BTCl-quimotripsina	92
Figura 13. Representação estrutural do <i>cluster</i> escolhido, em linhas pretas, comparado com o sistema nativo, colorido (em verde o BTCl e em laranja a quimotripsina)	93
Figura 14. Contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCl relativos ao sistema completo (em preto) e ao <i>cluster</i> r4 (em cinza) para a interface BTCl-quimotripsina utilizando o método PM6-D3H4X/COSMO	95

Figura 15. Contribuições para a energia de interação dos resíduos da quimotripsina relativos ao sistema completo (em cinza) e ao <i>cluster</i> r4 (em preto) para a interface BTCl-quimotripsina utilizando o método PM6-D3H4X/COSMO	97
Figura 16. Contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCl relativos <i>cluster</i> r4 pelas metodologias PM6-D3H4X/COSMO (em cinza) e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO (em preto)	98
Figura 17. Contribuições para a energia de interação dos resíduos da quimotripsina relativos <i>cluster</i> r4 pelas metodologias PM6-D3H4X/COSMO (em cinza) e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO (em preto)	100
Figura 18. Resíduos da tríade catalítica e da cavidade oxiónica da quimotripsina (em laranja), e sítio reativo do BTCl (em verde) para a quimotripsina	103
Figura 19. Primeira etapa da ação catalítica da quimotripsina, onde se vê a formação do radical alcóxi; o ataque nucleofílico deste à carbonila, formando o intermediário tetraédrico; a quebra da ligação peptídica e, finalmente, a liberação do primeiro fragmento molecular (H ₂ N-R)	106
Figura 20. Ligações de hidrogênio entre a Cys ⁵¹ e a Gly ²¹⁶ no complexo BTCl-quimotripsina	110
Figura 21. Contribuições para a energia de interação (em azul) e interações não-covalentes (em amarelo, cinza e vermelho) associadas aos resíduos do BTCl na interface BTCl-quimotripsina	115
Figura 22. Contribuições para a energia de interação (em azul) e interações não-covalentes (em amarelo, cinza e vermelho) associadas aos resíduos da quimotripsina na interface BTCl-quimotripsina	118
Figura 23. Possível centro de tensões estéricas na quimotripsina envolvendo os resíduos Met ¹⁹² , Cys ¹⁹¹ , Cys ²²⁰ e Ser ²¹⁸	119
Figura 24. Diferença percentual entre as energias obtidas pelos métodos PM6-D3H4/COSMO (A) e DFTB3-D3H4X/COSMO (B) dos 5 resíduos mais e menos colaborativos para a energia de interação	121
Figura 25. Curva de fragmentação BTCl-tripsina	122
Figura 26. Representação estrutural do <i>cluster</i> escolhido, em linhas pretas, comparado com o sistema nativo, colorido (em verde o BTCl e em azul a tripsina)	124

Figura 27. Contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCl relativos ao sistema completo (em preto) e ao <i>cluster</i> r5.3 (em cinza) para a interface BTCl-tripsina utilizando o método PM6-D3H4X/COSMO	126
Figura 28. Contribuições para a energia de interação dos resíduos da tripsina relativos ao sistema completo (em preto) e ao <i>cluster</i> r5.3 (em cinza) para a interface BTCl-tripsina utilizando o método PM6-D3H4X/COSMO	127
Figura 29. Contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCl relativos <i>cluster</i> r5.3 pelas metodologias PM6-D3H4X/COSMO (em cinza) e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO (em preto)	129
Figura 30. Contribuições para a energia de interação dos resíduos da tripsina relativos <i>cluster</i> r5.3 pelas metodologias PM6-D3H4X/COSMO (em preto) e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO (em cinza)	130
Figura 31. Resíduos diferentes dos bolsões catalíticos da quimotripsina (em laranja) e da tripsina (em azul), respectivamente	133
Figura 32. Ligações de hidrogênio entre uma fita beta do BTCl e alguns resíduos do bolsão catalítico da tripsina	135
Figura 33. Ligações de hidrogênio entre o sítio reativo do BTCl e a cavidade oxiónica da tripsina	136
Figura 34. Interações mediadas pelo Glu ²³ no complexo BTCl-tripsina	138
Figura 35. Interações mediadas pela Arg ²¹ no complexo BTCl-tripsina	139
Figura 36. Tríade catalítica da tripsina e sua proximidade com o sítio reativo do BTCl	140
Figura 37. Contribuições para a energia de interação (em azul) e interações não-covalentes (em amarelo, cinza e vermelho) associadas aos resíduos do BTCl na interface BTCl-tripsina	143
Figura 38. Possíveis tensões estéricas entre os resíduos Arg ²¹ , Glu ²³ e Ser ³⁵ do BTCl	145
Figura 39. Contatos polares da Lys ²⁶ do BTCl	146
Figura 40. Contribuições para a energia de interação (em azul) e interações não-covalentes (em amarelo, cinza e vermelho) associadas aos resíduos da tripsina na interface BTCl-tripsina	148
Figura 41. Corredor hidrofílico da tripsina exposto ao solvente, por onde podem entrar moléculas de água. É formado pelos resíduos Ser ²¹⁰⁽²¹⁷⁾ , Ala ^{213(221A)} , Gln ²¹⁴⁽²²¹⁾ , Lys ²¹⁷⁽²²⁴⁾ , e Pro ²¹⁸⁽²²⁵⁾	151

Figura 42. Sítio hidrofílico próximo da interação Lys ²⁶ -Asp ¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ , formado pelos resíduos Ser ¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾ , Val ²²⁰⁽²²⁷⁾ e Tyr ²²¹⁽²²⁸⁾	152
Figura 43. Representação das 7 moléculas de água adicionadas ao sistema BTCl-tripsina	153
Figura 44. Efeitos energéticos da solvatação pelas 7 moléculas de água nos resíduos do BTCl na interface BTCl-tripsina (em vermelho), juntamente com a energia de interação do sistema com e sem solvatação (em azul e cinza, respectivamente)	155
Figura 45. Interações próximas a Gln ³¹ no sistema hidratado do complexo BTCl-tripsina	156
Figura 46. Interações entre a Lys ²⁶ , Asp ¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ e Ser ¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾ , no sistema hidratado do complexo BTCl-tripsina	157
Figura 47. Efeitos energéticos da solvatação pelas 7 moléculas de água nos resíduos da tripsina na interface BTCl-tripsina (em vermelho), juntamente com a energia de interação do sistema com e sem solvatação (em azul e cinza, respectivamente)	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constantes de equilíbrio para formação do complexo BTCl-tripsina	40
Tabela 2. Variáveis termodinâmicas do equilíbrio BTCl-tripsina	41
Tabela 3. Constantes de equilíbrio para formação do complexo BTCl- quimotripsina	42
Tabela 4. Variáveis termodinâmicas do equilíbrio BTCl-quimotripsina	43
Tabela 5. Dados termodinâmicos da interação do BTCl com tripsina e quimotripsina por ressonância plasmônica de superfície	47
Tabela 6. Análise de DLS para as nanopartículas vazias e com BTCl	85

PARTE I

Introdução

1 A descoberta dos inibidores de proteases: famílias Kunitz e Bowman-Birk

Entre as décadas de 30 e 50, Kunitz desenvolveu um trabalho de vanguarda, isolando e purificando inibidores de tripsina a partir do pâncreas bovino e da soja.^{1,2} Em organismos vegetais, sua ocorrência se dá majoritariamente em sementes e em tubérculos - ambos órgãos de armazenamento - das famílias Leguminosae e Solanaceae, respectivamente. A partir desses estudos, cristais do complexo inativo formado por essas estruturas proteicas e a tripsina foram obtidos.

Posteriormente, outras propriedades foram por ele elucidadas³, sendo tais descobertas ainda hoje parte do conhecimento basilar do que se entende sobre toda uma família de inibidores - família esta que herdou o seu nome.

Observou-se que estas proteínas adotavam um comportamento típico de formas globulinas; ou seja, sua solubilidade é diretamente proporcional à presença de eletrólitos em solução, apresentando um nível mínimo no ponto isoelétrico - normalmente aí insolúveis - quando configurada em seu estado nativo.

Proporcionalidade igualmente observada se deu quando da determinação da estequiometria do processo inibitório (1 mol de inibidor/1 mol de protease), sendo ela independente da concentração de tripsina presente no meio e do pH da solução.

Além disso, constatou-se a estabilidade destes inibidores ao serem passíveis de estoque à 40°C em soluções cujo pH ou era muito ácido ou muito básico. Efeitos de mudanças estruturais são percebidos somente em valores extremos de pH e em temperaturas elevadas concomitantemente. Nesses casos, a perda da atividade inibitória à tripsina é acompanhada da diminuição de solubilidade no ponto isoelétrico (pH 4,5). Para temperaturas acima de 40°C e abaixo de 60°C, a desnaturação é passível de reversibilidade e um equilíbrio é estabelecido entre as formas nativa e desnaturada, sendo este equilíbrio cinética e termodinamicamente determinado pela temperatura e pH da solução. A partir de 60°C esse equilíbrio é descaracterizado, sendo que em 90°C a desnaturação

passa a ser irreversível. A forma desnaturada é prontamente digerida por pepsina em pH ácido - evidenciando um comportamento radicalmente oposto à forma nativa - e, de maneira menos vigorosa, por tripsina e quimotripsina.

Em 1944, por meio de um experimento *in vitro*, Bowman desenvolveu um estudo no qual pôde-se constatar a inibição da digestão de caseína, oriunda do leite, pela tripsina a partir da adição de frações derivadas de feijão branco ou de soja.⁴ Esse estudo corrobora a presença de fatores antiproteolíticos isoláveis contidos nessas leguminosas, assemelhando-se ao que já havia sido elucidado sobre os inibidores da família Kunitz. Todavia, há de se levar em consideração uma diferença essencial em relação à metodologia adotada por Kunitz. Este utilizava frações que podem ser extraídas com água e posteriormente precipitadas com etanol⁵; enquanto aquele as extraía com álcool e as precipitava com acetona. Bowman notou essa diferença e em 1946 apontou para a possível presença de duas frações distintas de inibidores de proteases em um mesmo extrato obtido a partir de grãos de soja.⁶

Então, em 1963, Birk e colaboradores isolaram a fração insolúvel em acetona e a caracterizaram pela primeira vez.⁷ Essa separação foi realizada utilizando uma coluna de carboximetilcelulose, isolando o inibidor de protease em questão de uma outra fração rica em amilases. Por meio dos coeficientes de difusão e sedimentação, Birk caracterizou-o como sendo uma proteína de 24 kDa. Posteriormente, também mediu seu ponto isoelétrico, aferindo-o em pH 4,2.

Neste trabalho, Birk deixou claro que este inibidor de protease era distinto daquele abordado por Kunitz, e os primeiros aspectos a ele singulares começaram a se moldar de forma inequívoca: não somente era ativo contra a tripsina, como a atividade da fração insolúvel em acetona para quimotripsina era cerca de 13 vezes maior do que o constatado para os inibidores de Kunitz. Além disso, não foi observada a presença de triptofano em sua estrutura proteica primária; constatação essa corroborada quando da completa determinação de sua sequência primária, em 1972, por Odani e colaboradores.⁸ Ademais, esse último trabalho evidenciou a ocorrência de duas porções residuais correlatas - 9 em 18 resíduos eram idênticos ambas em posições de meias cistinas e nas redondezas dos sítios antiproteolíticos. Este fato por si só aponta para a

ocorrência de uma estrutura conformacional formada por duas regiões homólogas com atividade inibitória para tripsina e quimotripsina. Tendo Birk apontado previamente, em 1968, que a porção responsável pela ação anti tripsina não é necessariamente a mesma que age contra a quimotripsina⁹ – haja vista que o complexo formado pelo inibidor e pela tripsina consegue inativar a quimotripsina –, Odani concluiu que estas porções poderiam estar dispostas separadamente, de maneira que o inibidor pudesse agir sob ambas proteases simultaneamente.

Conforme os inibidores de proteases solúveis em álcool de diversas origens vegetais eram purificados, mais e mais dados eram gerados acerca de suas propriedades físico-químicas, os quais inevitavelmente convergiam para os resultados de Bowman, Birk e Odani. Todavia, discrepâncias acerca da massa molecular dessas proteínas eram cada vez mais frequentes. Haynes e Feeney, em 1967, reportaram proteínas anti proteolíticas obtidas a partir do feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus*) cujas massas moleculares situavam-se entre 9 e 10 kDa.¹⁰ Um ano mais tarde, Frattali e Steiner detectaram um inibidor com cerca de 18 kDa.¹¹

Foi então que, um ano após essa constatação, em 1969, Frattali e colaboradores, trabalhando com sementes de soja da variedade *Lee*, reportaram a existência de um sistema formado pelo equilíbrio das formas monoméricas, diméricas e triméricas destes inibidores de proteases solúveis em álcool, sendo suas constantes de equilíbrio consequentemente determinadas.¹² Dessa maneira, inferiram que um monômero do inibidor pesava cerca de 8 kDa.

Com isso, pôde-se concluir que, das espécies estudadas por Birk, Haynes, Feeney e Frattali, inibidores semelhantes foram identificados, muito embora o método de extração pudesse ser diferente – Birk baseava o processo de purificação em uma coluna cromatográfica de carboximetil celulose (CM-celulose), enquanto outras abordagens englobavam o uso de uma de dietilaminoetil celulose (DEAE-celulose).¹³

2 O inibidor de proteases Bowman-Birk isolado de sementes de *Vigna unguiculata* (BTCl): estrutura e função

Em 1966, Ventura *et al* desenvolveram um método de purificação por meio do qual, a partir de sementes do feijão-de-corda da espécie *Vigna unguiculata*, chegava-se à forma pura de um inibidor de proteases (tripsina e quimotripsina) correlato àqueles identificados por Birk,³² denominado, do inglês, *Black-eyed-pea trypsin/chymotrypsin inhibitor* (BTCl).

Após os extensivos estudos de Ventura *et al* acerca das características estruturais do BTCl, os quais perduraram por mais de 4 décadas, em 2007 Barbosa e Freitas *et al* resolveram a estrutura tridimensional do BTCl complexado com a β -tripsina em uma resolução de 1,55 Å, por difração de raios-X.²⁹ Este estudo gerou uma estrutura tridimensional do BTCl que foi depositada no *Protein Data Bank* referenciada pelo código 2G81, a qual corroborou muitos dos estudos de Ventura *et al*.

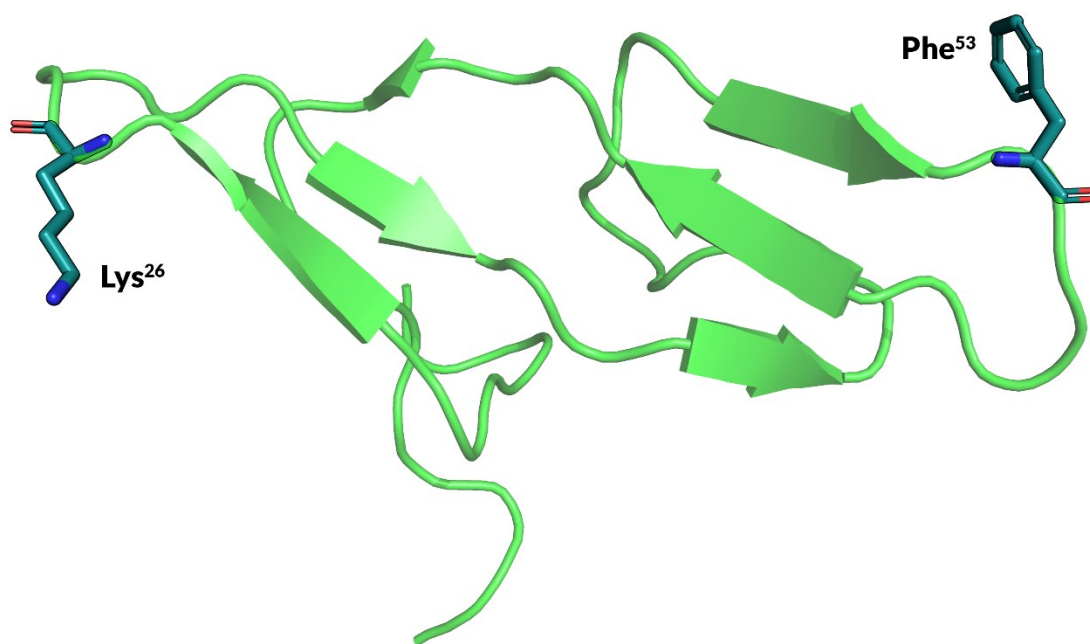


Figura 1. Estrutura tridimensional do BTCl, com destaque para os dois resíduos do sítio reativo

A estrutura tridimensional do BTCl, apresentada na figura 1, exibe uma conformação simétrica, sendo dois os domínios semelhantes que, juntos,

constituem o sistema proteico em questão. Cada um desses domínios é constituído por três fitas beta, duas das quais dão origem a um arranjo secundário da forma folha beta antiparalela, sendo que a terceira gera outra folha beta antiparalela com a fita beta do domínio simétrico adjacente, originando uma forma secundária de interdomínio.

Esta configuração simétrica se relaciona diretamente com a funcionalidade do BTCI. Adotando conformação semelhante a um cilindro alongado, em uma das extremidades se encontra o sítio reativo para a tripsina, estando o sítio para a quimotripsina localizado em uma posição diametralmente oposta. Os resíduos P1, tanto para a tripsina quanto para a quimotripsina, estão localizados no *loop* de uma folha beta antiparalela. São eles a Lys²⁶ e a Phe⁵³, respectivamente.

Uma propriedade importante observada por Barbosa e Freitas *et al* diz respeito à distância entre os átomos C α dos dois sítios catalíticos. Sendo ela igual a 32,5 Å, constatou-se que era congênere àquela verificada em outros inibidores da família Bowman-Birk (BBI) em sua forma livre. Deste modo, pôde-se concluir que a estabilidade conformacional é conservada mesmo no estado ligado, tornando factível o estabelecimento de um complexo ternário quimotripsina-BTCI-tripsina devido à independência entre os dois sítios catalíticos.

Curiosamente, por mais que a distância entre os átomos C α dos dois resíduos responsáveis pela formação do complexo ternário permaneça praticamente inalterada, a flexibilidade da região de cada um dos sítios reativos é consideravelmente diferente. Por meio da análise do fator de Debye-Waller (*b-factor*), observou-se que o local onde ocorre a ancoragem do BTCI à quimotripsina é mais flexível do que aquele relativo à tripsina. Isto é constatado pelos valores de 12,56 Å², aferido para o estado ligado, e 29,07 Å², aferido no estado livre. Então, pôde-se afirmar que não só há diferença de flexibilidade entre os sítios, como também entre os estados ligados.

Outra propriedade estrutural marcante do BTCI é a presença de 14 resíduos de cisteína, os quais formam 7 ligações dissulfeto. São eles: Cys¹⁸-Cys⁷², Cys¹⁹-Cys³⁴, Cys²²-Cys⁶⁸, Cys²⁴-Cys³², Cys⁴²-Cys⁴⁹, Cys⁴⁶-Cys⁶¹ e Cys⁵¹-Cys⁵⁹ (os resíduos foram agrupados em duplas correspondentes às respectivas ligações dissulfeto). É importante salientar que uma dessas ligações se localiza

no *loop* terminal da proteína, enquanto as outras são igualmente distribuídas entre os dois domínios do BTCl, estabelecendo interações diretamente associadas às folhas beta.

Em um estudo publicado no ano de 2003, ao resolver a estrutura de um BBI extraído de sementes de luzerna-escudelada (*Medicago scutellata*), Zetta *et al* constataram que, mediante a ausência do efeito Overhauser entre os dois domínios deste inibidor, há certa flexibilidade na orientação espacial destas regiões.⁴⁸ Esta propriedade foi correlacionada com a distribuição espacial das 7 ligações dissulfeto presentes neste BBI. Nele, estas ligações estavam todas localizadas dentro de um mesmo domínio, não possuindo assim nenhum centro de restrição conformacional interdomínio. De modo semelhante, o BTCl também não possui nenhuma ligação dissulfeto na interface entre os dois domínios.

Tais ligações dissulfeto são responsáveis pela estabilidade estrutural deste inibidor às variações drásticas de temperatura e pH. Elas conferem rigidez conformacional a ponto de, mesmo submetido a condições extremas, manter sua capacidade inibitória. Ademais, é a presença destas 7 ligações dissulfeto que explica o fato de a distância entre os átomos C α dos dois sítios catalíticos permanecer praticamente inalterada nos complexos binário ou ternário com a tripsina e a quimotripsina.

Para se ter uma dimensão da estabilidade termoquímica do BTCl, em 2001 Freitas *et al* mostraram que, mesmo quando submetido a condições de pH extremamente ácidas ou altamente alcalinas, não há alterações estruturais significativas e, conseqüentemente, sua capacidade inibitória é mantida.⁵⁰ Além disso, também não apresentou mudanças conformacionais relevantes ao ser submetido a temperaturas entre 25°C e 95°C, retendo o potencial de inibição.

Este comportamento em relação a variações térmicas e químicas, onde a maioria das proteínas se desnaturariam, revela a dimensão da estabilidade conformacional do BTCl, a qual tem como origem a preservação da cadeia principal advinda da rigidez das estruturas secundárias e terciárias.

Foi detectada a presença de uma região estrutural formada por resíduos de cadeias laterais carregadas, indicados na figura 2. São eles: Asp³⁶, Arg³⁸, His⁴³ e Asp⁶³. Estes resíduos se encontraram dispostos de modo que suas respectivas

cadeias laterais se localizam na parte interna do BTCI. Nesta região, ligações de hidrogênio intramoleculares são mediadas por moléculas de água, as quais se localizam na parte interna do inibidor, auxiliando também a regulação do ambiente eletrostático interno.

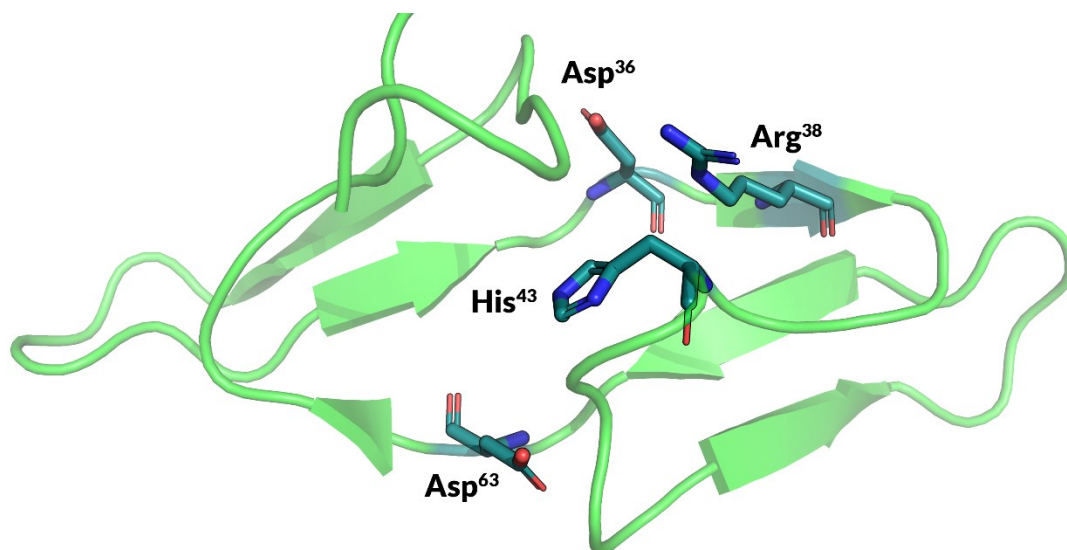


Figura 2. Estrutura tridimensional do BTCI, com destaque para os resíduos hidrofílicos

Não obstante, também se observou que formação de um *cluster* composto por resíduos nos quais a cadeia lateral apresentava estruturas aromáticas (Phe⁶⁷, Tyr⁶⁹ e His⁴³) dispostas de modo a formar uma distribuição ortogonal (figura 3). Este *cluster* é descrito na literatura como sendo parte essencial de uma trinca de resíduos responsáveis pela oligomerização do BTCI. É importante notar que tal *cluster* se dispôs na superfície proteica, o que, de modo geral, é algo incomum - a localização mais provável dos resíduos hidrofóbicos seria na parte interna do inibidor. Esta formação de resíduos é altamente conservada nos inibidores da família Bowman-Birk. Ao comparar o BTCI com o inibidor extraído de sementes de soja (SBBI - PDB 1BBI), nota-se uma identidade de 100% nesta região.

Outro paralelo importante a ser feito em relação ao SBBI é a presença de um grupo de resíduos cujas cadeias laterais são hidrofóbicas e dispostas no sentido externo do inibidor. No SBBI, estes resíduos são: Met²⁷, Leu²⁹, Ile⁴⁰, Tyr⁴⁵, Phe⁵⁰, Val⁵² e o grupo CH da Pro⁴⁶. No BTCI, os resíduos homólogos a

estes são: Val³⁷, Leu³⁹, Ala⁵⁰, Ile⁵⁵, Phe⁶⁰, Gly⁶² e o grupo CH da Pro⁵⁶. Além de o BTCl apresentar identidade de aproximadamente 43% em relação ao SBBI, quando seus resíduos não são idênticos seus equivalentes possuem o mesmo caráter hidrofóbico (à exceção da Gly⁶², que não possui cadeia lateral), diferindo majoritariamente em relação ao tamanho da cadeia lateral – de certo modo, no BTCl estas são mais curtas entre os grupos em questão.

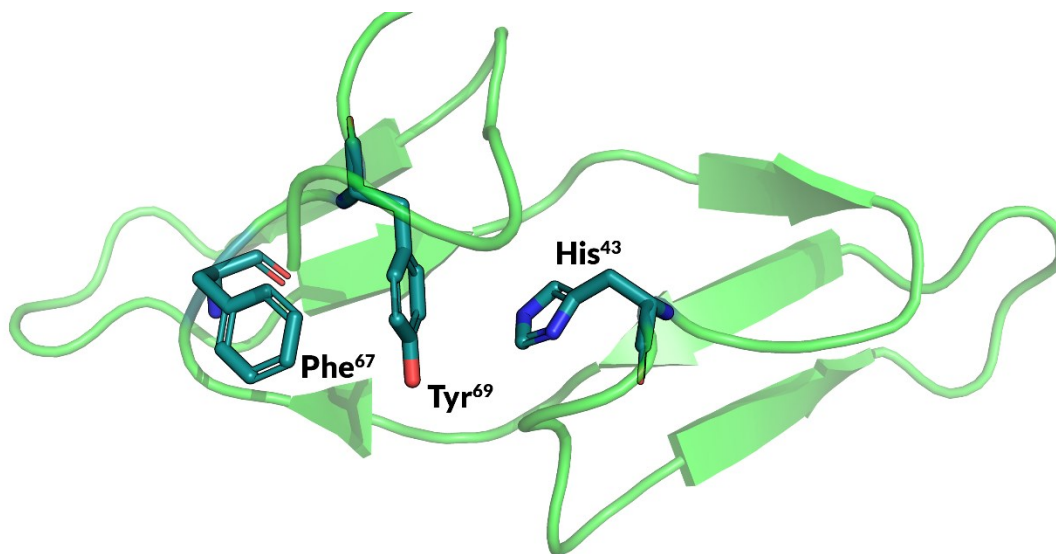


Figura 3. Estrutura tridimensional do BTCl, com destaque para o cluster de resíduos aromáticos

É interessante notar que todos os resíduos citados acima estão dispostos no domínio dos inibidores cuja especificidade é a quimotripsina. Para a outra porção simétrica do SBBI, também existe um outro conjunto de resíduos hidrofóbicos cujas cadeias laterais se dispõem de modo análogo àquele. São eles: Pro⁷, Pro¹⁹ e Pro²⁰. No BTCl, seus equivalentes são: Pro¹⁷, Pro²⁹ e Pro³⁰. Como se pode observar, a identidade é de 100% para este domínio.

A disposição destes resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente também foi observada em outros inibidores da família Bowman-Birk.³³ De modo semelhante, o conjunto das ligações dissulfeto, juntamente com o *cluster* dos resíduos cujas cadeias laterais são carregadas, formam estruturas muito bem conservadas em diversos inibidores desta mesma família, como os inibidores extraídos das sementes do feijão-de-lima (PDB 1H34), soja (1BBI), ervilha (1PBI) e do feijão-da-china (1DF9), dentre muitos outros. Em maior ou menor

intensidade, juntos, todos esses fatores contribuem para a rigidez conformacional do BTCl e, conseqüentemente, para a conservação de sua capacidade inibitória contra proteases.

Este arranjo dos resíduos hidrofóbicos caracteriza outro fator estrutural importante. Durante o processo de enovelamento proteico, sabe-se que a distribuição destes resíduos é uma das forças que guiam a formação de certas estruturas terciárias. Isso se dá devido ao fato de o processo de enovelamento ser conduzido de modo a minimizar a entropia do sistema solvente-proteína. Deste modo, os resíduos hidrofílicos tendem a se dispor na superfície proteica, maximizando o contato entre suas cadeias laterais e o solvente. Por outro lado, os hidrofóbicos se dispõem na cavidade interna da proteína, minimizando a entropia por meio do estabelecimento de interações fracas do tipo dispersão de London. Este efeito é particularmente mais pronunciado em proteínas globulares.

No BTCl, dá-se um comportamento oposto. Há um *cluster* de resíduos, cujas cadeias laterais são hidrofílicas, localizado na parte interna deste inibidor. Por outro lado, são observados resíduos hidrofóbicos na superfície, dispendo suas cadeias laterais em direção ao solvente. Este comportamento contra intuitivo em relação ao que se é esperado quando do processo de enovelamento proteico pode ser justificado pela regulação do ambiente eletrostático interno. A presença de resíduos hidrofílicos nesta região forma uma rede de ligações de hidrogênio mediante interações com as moléculas de água confinadas na cavidade do inibidor. De outro modo, a presença de resíduos hidrofóbicos expostos é justificada pelo fato destes poderem ser fatores de estabilização de estruturas multiméricas durante o processo de oligomerização. De fato, ao se observar a interface dimérica de um inibidor Bowman-Birk análogo ao BTCl (PDB 2R33), nota-se que parte destes resíduos (principalmente a Phe⁶⁷ e a Tyr⁶⁹), estão dispostos no sentido de favorecerem o estabelecimento de contatos apolares na região.¹²⁸ Além disso, os resíduos hidrofóbicos também são capazes de estabilizar a interface BTCl-quimotripsina por meio do estabelecimento de interações fracas do tipo dispersão de London.⁵¹

Outro aspecto importante é o fato de não só esses conjuntos de resíduos serem conservados ao se analisar o BTCl no contexto dos inibidores de

Bowman-Birk, como também a incrível similaridade estrutural com os demais inibidores desta família. Em alguns casos, o RMSD calculado entre o BTCl e outra estrutura proteica (PDB 1H34) chega a ser da ordem de 0,5 Å. Além disso, o BTCl também apresentou altas taxas de identidade em comparação com outros inibidores desta família, taxas estas que chegam até a 78,6%. Com isso, conclui-se que o BTCl adota a conformação canônica dos inibidores da família Bowman-Birk ao ser comparado com outras estruturas cristalográficas conhecidas.

2.1 A interface BTCl-tripsina

Caracterizando a interface onde ocorre a interação entre o BTCl e a tripsina, nota-se que o tipo de força motriz da ancoragem do inibidor ao substrato é predominantemente eletrostático. A ligação, então estabelecida, além de não alterar consideravelmente a estrutura do BTCl – dada a manutenção da distância entre os C α dos dois sítios catalíticos –, também não modifica conformacionalmente a tripsina. Freitas *et al*, ao analisar o C α da tripsina complexada com o BTCl face o mesmo átomo desta enzima em sua forma inicial, obtiveram um RMSD de apenas 0,47 Å, corroborando a observação anterior.

O sítio reativo do BTCl cuja especificidade é a tripsina tem a Lys²⁶ como resíduo mais colaborativo (P1) para a formação do complexo enzima-inibidor. Este resíduo está localizado no loop de uma folha beta antiparalela. A estrutura desta região é dotada de certa rigidez conformacional no estado ligado, a qual está associada a uma ligação dissulfeto que, além de ser um dos elementos propiciadores da forma da estrutura secundária, garante a integridade conformacional desta região - também no estado livre. A ligação dissulfeto em questão é aquela entre os resíduos Cys²⁴ e Cys³². A presença deste arranjo molecular não é algo específico do BTCl, mas também é notada em outros inibidores da família Bowman-Birk, como é o caso daquele extraído das sementes de cevada.⁴⁹

O estudo realizado por Suh *et al* com sementes de cevada também evidenciou outro aspecto importante dos BBI. Ao se aferir o fator de Debye-Waller do sítio reativo do inibidor, tanto no estado livre quanto no estado ligado,

observa-se uma redução desta variável, sem, todavia, alterar o arranjo molecular da região em questão. A superposição destes dois fatos está relacionada com a perda de flexibilidade da área de ancoragem, a qual pode ser atribuída à estabilização proveniente das interações eletrostáticas que guiam a formação do complexo inibidor-protease.

Ao se analisar o ponto crítico da interação que possibilita a formação do sistema BTCI-tripsina, nota-se que a Lys²⁶ se dispõe de modo que sua cadeia lateral adote uma conformação estendida, interagindo diretamente com o bolsão catalítico S1 da enzima por meio do resíduo Asp¹⁸⁹, formando uma ponte salina. Este arranjo molecular é guiado majoritariamente por forças eletrostáticas, onde a carga negativa da Lys²⁶ é estabilizada pela carga positiva do Asp¹⁸⁹, como se pode observar pela figura 4.

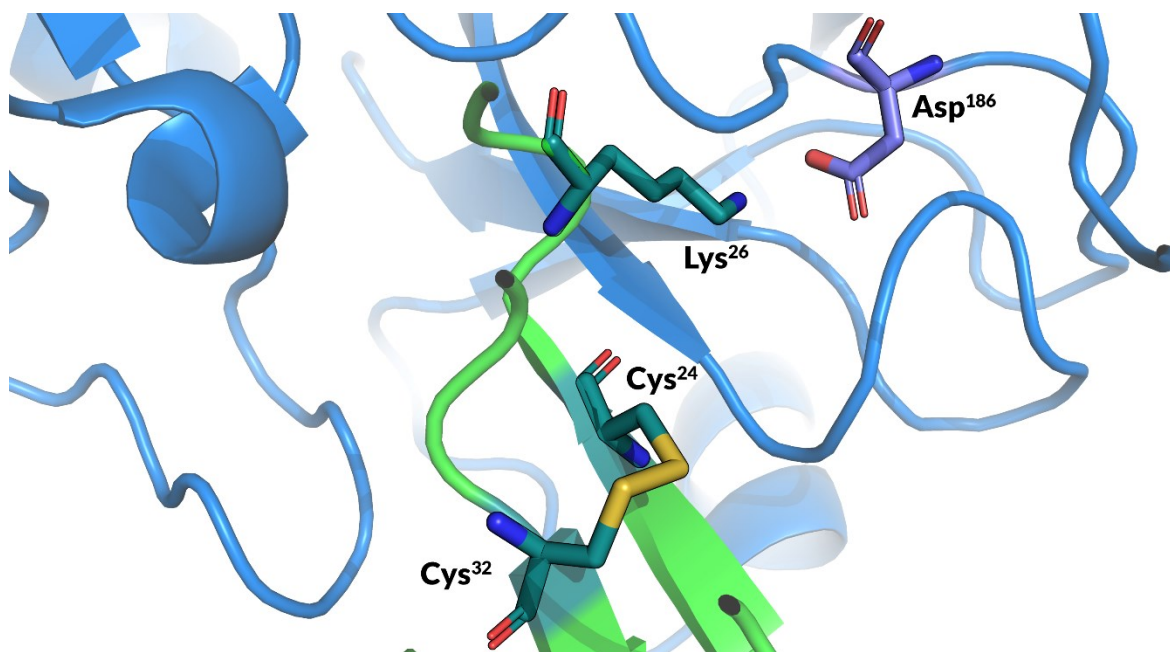


Figura 4. Ponte salina entre sítio reativo do BTCI e a tripsina, com destaque para a proximidade da ligação dissulfeto

Todavia, a interface onde ocorre a ancoragem não é uma região cujas interações apresentem caráter homogêneo. Os resíduos que a constituem apresentam cadeias laterais hidrofóbicas e hidrofílicas. As interações envolvendo resíduos deste último tipo, tanto do BTCI (Glu²³, Thr²⁵, Ser²⁷, Ile²⁸ e Pro³⁰) quanto da tripsina (Tyr³⁹, Phe⁴¹, Cys⁴², His⁵⁷, Leu⁹⁹, Tyr¹⁷², Cys¹⁹¹, Gln¹⁹², Ser¹⁹⁵, Val²¹³, Trp²¹⁵), também conferem estabilidade à região.

De outro modo, também nesta mesma interface, resíduos hidrofílicos, por meio de contatos polares, formam uma rede de ligações de hidrogênio que estabilizam a região. Esta rede é importante para o sistema BTCl-tripsina, como também para as formas multiméricas deste inibidor. Juntamente com as interações fracas de London advindas de resíduos hidrofóbicos, colaboram para a minimização energética do sistema e para a estabilização da interface do dímero.⁴⁸

2.1.1 As moléculas de água da interface BTCl-tripsina

O mecanismo pelo qual a tripsina exerce sua ação de clivagem envolve duas etapas. A primeira delas, uma acetilação, ocorre mediante o ataque nucleofílico da serina enzimática a um grupo carbonil contido no resíduo do substrato a ser degradado. Já a segunda compreende uma reação de desacetilação. Nela, uma molécula de água, atuando como nucleófilo, adentra à região de interação, atacando o mesmo grupo carbonil anterior e proporcionando a liberação do fragmento N-terminal.

A molécula de água que faz parte deste mecanismo é altamente conservada em várias estruturas que envolvem tanto processos nos quais a tripsina atua de per si, quanto nos que ela é inibida.⁷⁴ De modo semelhante, em outros mecanismos que não envolvem necessariamente a tripsina, mas que seguem padrões mecanísticos semelhantes ao dela, também são encontradas moléculas de água altamente conservadas que atuam neste processo no sentido de estabelecer ligações de hidrogênio, as quais favorecem o desenvolvimento das reações.⁷⁵

A importância de moléculas de água em interações que envolvem proteases é tamanha que seu simples deslocamento pode acarretar em mudanças mecanísticas que irão interferir no modo de ligação. Isto é o que ocorre quando da inativação de metaloproteinases de matriz (MMP) por seus respectivos inibidores teciduais (TIMP).⁷⁶ Nela, uma série de etapas ocasiona o descolamento da água catalítica, distanciando-a do centro reativo, fazendo com que a inibição não se dê mediante a clivagem de ligações químicas.

De modo semelhante, um estudo envolvendo o inibidor 2 de quimotripsina, pertencente à família dos inibidores de batata, também evidenciou a importância das moléculas de água para a atividade catalítica.⁷⁷ No seu sítio ativo se encontram 4 moléculas de água entre as fitas de uma folha beta, promovendo a coesão desta região. Em simulações computacionais onde estas águas, livres para se movimentarem, se distanciam desta estrutura secundária, variações conformacionais consideráveis são observadas, dando origem a inconsistências em relação à construção proveniente da Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Por outro lado, ao se manterem fixas as coordenadas de somente uma destas moléculas, a folha beta em questão conserva sua integridade como na estrutura cristalográfica original.

Isto evidencia um aspecto que vai além daquele relacionado à participação de moléculas de água quando do processo de inibição por parte de inibidores de serinoproteases – ou seja, participante da reação de inibição em si. Percebe-se, então, que tais moléculas também são importantes para a região catalítica.

Em diversas proteases, dentre elas a tripsina e a quimotripsina, constata-se a presença de um canal no qual diversas moléculas de água se encontram dispersas. Um ponto importante a ser notado é o fato de o resíduo 225 destas enzimas modular a forma do canal.⁷⁸ A prolina e a tirosina são os que ocupam tal posição em 95% destas proteínas. A tirosina interage por meio de sua cadeia lateral em uma cavidade hidrofóbica que poderia ter comunicação com o solvente. Como a cadeia lateral deste resíduo é grande, a abertura é ocluída e as moléculas de água se dispõem restritamente na região ao redor do sítio catalítico. Por outro lado, quando uma prolina se encontra na posição 225, além de não ocorrer a obstrução da cavidade exposta ao solvente e a consequente uniformidade do canal que dela é advinda, o átomo de oxigênio da carbonila causa uma obliteração no centro do canal. Esta mudança faz com que a disposição das moléculas de água desta região resulte em outro tipo conformação.

Todo o conjunto dos fatores aqui expostos são relevantes não só devido a estrutura deste canal ser uma propriedade altamente conservada por toda família de serinoproteases, como também por sua presença poder estar relacionada com o reconhecimento de substratos e com sua especificidade. A

forma deste canal é uma variável que serve como moduladora da atividade catalítica da enzima ao aumentar ou diminuir sua interação com o substrato.

2.2 A interface BTCL-quimotripsina

Em 1997, Freitas *et al* propuseram um modelo de interação que seria corroborado 10 anos depois.⁵³ Por meio de simulações computacionais utilizando como ponto de partida dados experimentais, mostraram-se as principais interações responsáveis pela ancoragem do BTCL à quimotripsina. Posteriormente, em 2007, dados cristalográficos do complexo formado pelo BTCL, quimotripsina e tripsina foram obtidos.⁵² A estrutura cristalográfica deste complexo resolvida por Freitas *et al* foi depositada no banco de dados *Protein data bank* (PDB – 3RU4).

O sítio reativo do inibidor é formado pelos resíduos Phe⁵³ e Ser⁵⁴. Estes resíduos são localizados no *loop* de uma folha beta antiparalela, a qual os dispõe de modo a maximizar sua exposição, fazendo-os facilmente acessíveis a enzimas proteolíticas.

A região onde ocorre a interação com a enzima possui certa rigidez conformacional. Isto está associado à presença de uma ligação dissulfeto pelos resíduos Cys⁵¹ e Cys⁵⁹ entre as duas fitas da folha beta antiparalela (figura 5). A consequência primaz deste grau de rigidez é a alta estabilidade conformacional que permite o BTCL se ligar de um modo muito mais forte à enzima. Além disso, esta característica também é a causa que proporciona a ligação concomitante à tripsina e à quimotripsina, inibindo-as simultaneamente. Não obstante, a posição desta ligação dissulfeto é muito conservada nos inibidores da família Bowman Birk.

O mecanismo pelo qual ocorre a inativação da quimotripsina por um dado inibidor passa pela formação de um estado de transição tetraédrico. Nele, a proteína que adentra o sítio catalítico da protease carrega consigo, por meio do resíduo que mais subsidia a ancoragem, um caráter aniônico. A quimotripsina possui, em seu sítio catalítico, um conjunto de resíduos responsáveis por estabilizar esta densidade eletrônica negativa de carga advinda do inibidor. Eles formam uma cavidade oxiônica (*oxyanion hole*) descrita pela primeira vez em

1970 por Henderson.⁵⁴ Tais resíduos exercem sua função ou por meio de cargas positivas nas cadeias laterais ou pelos grupos amina das cadeias principais. A quimotripsina é um bom exemplo desta última situação, onde a Gly¹⁹³ e a Ser¹⁹⁵ constituem a cavidade oxiônica.⁵⁵

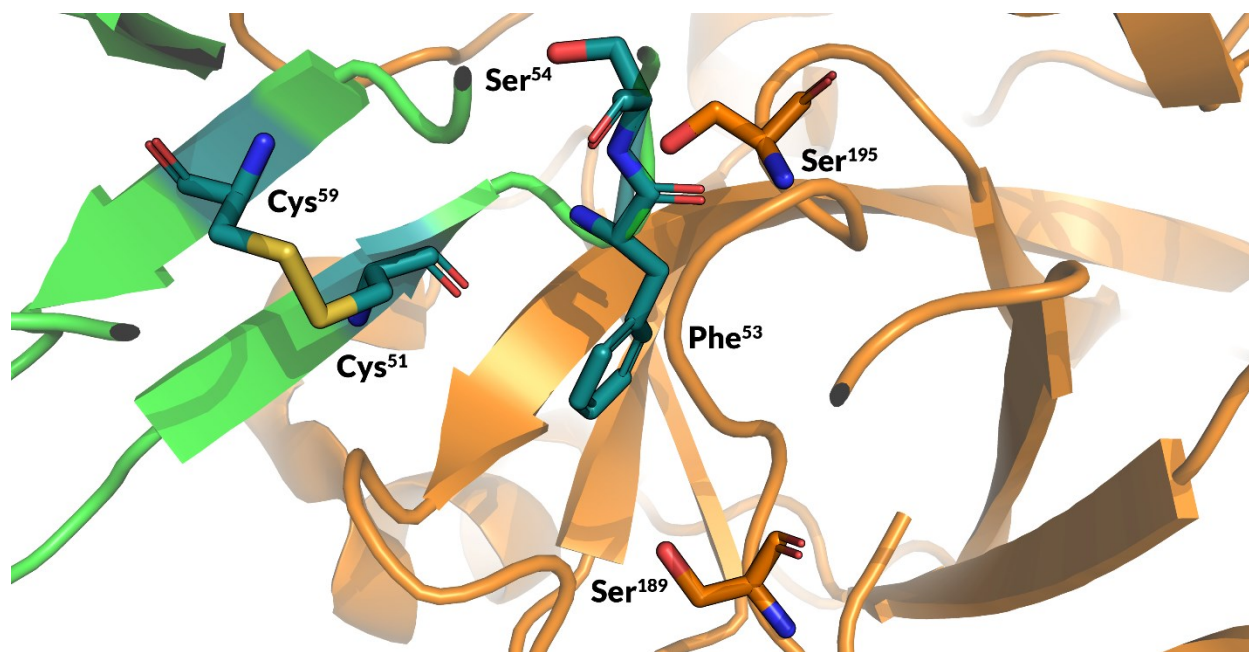


Figura 5. Sítio reativo do BTCL e sua proximidade com a Ser¹⁸⁹ e a Ser¹⁹⁵, com destaque para a ligação dissulfeto próxima

Esta região da protease colabora para a formação do complexo enzima-inibidor por meio do estabelecimento de uma rede de ligações de hidrogênio, as quais contrabalançam o caráter aniônico advindo do BTCL. Barbosa *et al* identificaram o ponto crucial desta rede em duas interações de hidrogênio cujo centro é a cadeia principal da Phe⁵³: a uma distância de 2,0 Å, se liga à Gly¹⁹³; e a 2,4 Å, à Ser¹⁹⁵. Mesmo estes valores sendo obtidos por meio de uma construção teórica, servem como importante ponto de partida para as avaliações posteriores.

Outro conjunto de resíduos de suma importância para a interface de interação é a tríade catalítica da quimotripsina. Ele é formado pelos grupos His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵. Já preliminarmente se nota a importância redobrada da Ser¹⁹⁵, a qual além de integrar a cavidade oxiônica também é um agente subsidiador das interações que ocorrem na tríade catalítica. Por isso, tem-se que a Ser¹⁹⁵ é

dotada de maior caráter reativo ao ser comparada com outras serinas da quimotripsina.

Além de serem determinantes para o estabelecimento das interações que possibilitam a formação do complexo enzima-inibidor, os resíduos da tríade catalítica também se correlacionam por meio de um conjunto de ligações que mantêm a região molecularmente coesa - coesão esta necessária para a interação com o sítio reativo do BTCl. O grupo hidroxila da Ser¹⁹⁵ forma uma ligação de hidrogênio com a His⁵⁷, a qual estabelece esta mesma interação com o grupo carboxila do Asp¹⁰². De fato, pode-se afirmar que é justamente pela constituição desta rede de ligações de hidrogênio que a tríade catalítica irá adquirir o caráter químico necessário para a ligação do inibidor.

A quimotripsina possui uma região chamada bolsão catalítico (S1), o qual direciona a ligação com o BTCl. Ele é formado pelos resíduos Ser¹⁸⁹, Ser¹⁹⁰, Cys¹⁹¹, Met¹⁹², Gly¹⁹³, Asp¹⁹⁴, Ser¹⁹⁵, Ser²¹⁴, Trp²¹⁵, Gly²¹⁶, Ser²¹⁷, Ser²¹⁸, Thr²¹⁹, Cys²²⁰, Pro²²⁵, Gly²²⁶, Val²²⁷ e Tyr²²⁸. Pode-se dizer que a especificidade enzimática está relacionada diretamente com esta região, bem como com o grupo localizado do lado amino-terminal da ligação peptídica a clivada.

Todos os resíduos que compõem o bolsão catalítico dão origem a um arranjo molecular profundo, o qual é dotado de um caráter hidrofóbico. Estes dois fatores possibilitam à quimotripsina ser uma receptora de resíduos cuja cadeia lateral seja longa e hidrofóbica. Este é o caso da Phe⁵³, pertencente ao sítio reativo do BTCl.

Freitas *et al* caracterizaram então a interação que ocorre quando da ancoragem do BTCl à quimotripsina. Em suma, o posicionamento do sítio ativo do BTCl por meio da Phe⁵³ é guiado majoritariamente por interações apolares, dada a hidrofobicidade do bolsão catalítico da quimotripsina. Uma vez alocado no interior reativo da enzima, o inibidor, por meio de sua cadeia principal, estabelece uma rede de ligações de hidrogênio com a cavidade oxigênica, as quais tornam possível a formação do estado intermediário tetraédrico. Deste modo, o processo de inibição envolve uma conjunção de interações químicas tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas. Isto por si só já difere este mecanismo daquele da formação do complexo BTCl-tripsina, onde as interações eletrostáticas são as forças que predominam no processo de inibição.

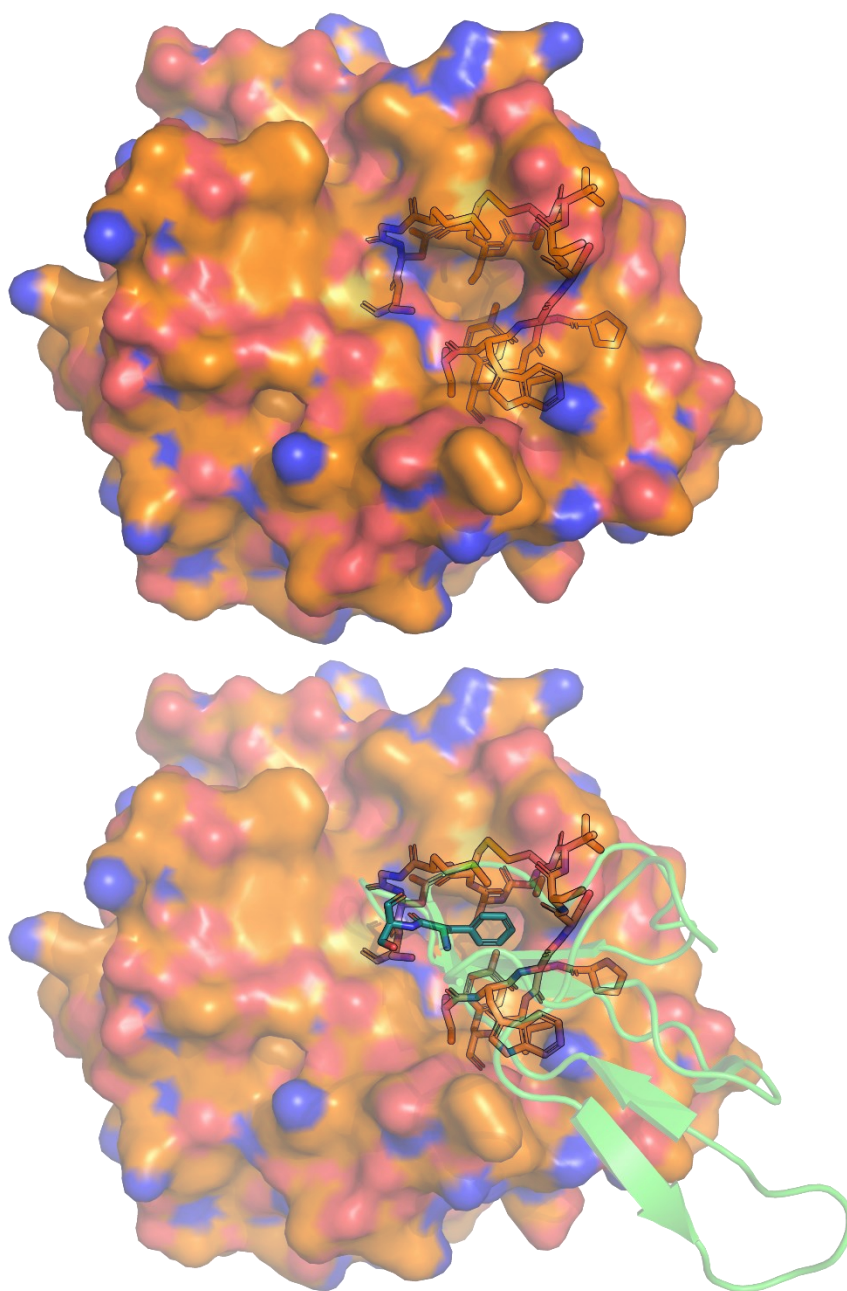


Figura 6. Bolsão catalítico da quimotripsina e ancoragem do BTCL, com destaque para a Phe⁵³ (em verde)

Outro fator importante diz respeito às cargas de ambas as proteínas e a relação delas com o processo inibitório.⁵³ Tanto o BTCL quanto a quimotripsina possuem um balanço de cargas de +3. Em um primeiro momento, este fato poderia ser impeditivo à complexação de ambas as proteínas. Entretanto, a análise do potencial eletrostático ao longo de toda superfície proteica revela

uma importante complementariedade entre estas estruturas. Esta correlação é expressa não em relação às proteínas como um todo – dadas as cargas de mesmo sentido –, conquanto mais especificamente no sítio ativo da enzima e no sítio reativo do inibidor. Ao redor do sítio reativo do inibidor foi constatado um potencial eletrostático positivo; enquanto na região próxima ao sítio ativo da enzima deu-se um potencial eletrostático negativo. Esta complementariedade de potenciais eletrostáticos contribui para a formação do complexo BTCl-quimotripsina.

3 Aspectos termodinâmicos das interações BTCl-tripsina e BTCl-quimotripsina

As características termodinâmicas acerca das interações entre o BTCl e as duas enzimas foram determinadas em meados da década de 80. Mais especificamente, em 1985, Fachetti e Ventura *et al* conduziram um estudo no qual foram obtidos os primeiros parâmetros termodinâmicos quantitativos do complexo formado por meio da interação entre o BTCl e a tripsina.²¹

O método utilizado para se aferir estas variáveis se baseou na técnica de titulação em diferentes temperaturas, monitorando a inibição de proteases pelo BTCl por espectroscopia. Para determinação dos parâmetros termodinâmicos que regem a ação inibitória do BTCl foi considerada a concentração residual de tripsina – ou seja, o conteúdo excedente de tripsina que não reagiu quando submetida a um meio contendo BTCl. Além disso, foram utilizados dois substratos sintéticos: α -N-Benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) e α -N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride (BAPNA). Estes substratos estão relacionados com a capacidade de a tripsina exibir ação à esterase e à amidase, respectivamente. Deste modo, a quantidade de tripsina não reativa era submetida à titulação juntamente com os respectivos substratos, sendo que a reação era relativa à hidrólise dos substratos sintéticos por meio da enzima em questão. Todos os ensaios foram realizados em uma faixa de temperatura

compreendida entre 15 e 38°C, com pH e força iônica fixos em 7,75 e 0,25, nessa ordem.

Os resultados deste experimento, além de fornecerem informações inéditas à época, confirmaram outros dados já conhecidos da relação entre o BTCl e a tripsina. Ao se extrapolar a curva de titulação no eixo x - relativo à razão entre a quantidade de mols de inibidor e enzima a ser inibida -, obteve-se o intercepto no valor 1, indicando a proporção 1:1 entre o inibidor e a tripsina.²² Esta constatação, juntamente com as diversas outras que se seguiram, é de precisão experimental ao bem descrever o equilíbrio químico ali presente, a julgar pelo ajuste não linear dos pontos. A partir da tabela 1 abaixo, pode-se verificar os resultados obtidos para a constante de equilíbrio mediante o uso dos dois diferentes substratos.

Tabela 1. Constantes de equilíbrio para formação do complexo BTCl-tripsina²²

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Ensaio com BAEEK_a</i> ($\times 10^{-8} M^{-1}$)	<i>Ensaio com BAPNAK_a</i> ($\times 10^{-8} M^{-1}$)
15	-	1,1 ± 0,1
20	-	1,5 ± 0,0
25	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,1
30	2,5 ± 0,1	2,0 ± 0,2
35	3,4 ± 0,1	2,6 ± 0,2
38	4,3 ± 0,2	-

A julgar pelas constantes de equilíbrio obtidas, mesmo desconsiderando as pequenas diferenças numéricas entre os dois ensaios, percebe-se que, para ambos os substratos sintéticos utilizados, há uma tendência de aumento da constante de inibição mediante incremento concomitante da temperatura. Os parâmetros termodinâmicos obtidos caracterizam o equilíbrio químico entre o BTCl e a tripsina como sendo um processo estritamente endotérmico e espontâneo, conforme mostrado na tabela 2.

Além disso, processos assim são acompanhados de uma variação entrópica positiva, sendo esta justificada na literatura por meio da deslocalização das moléculas de água da interface entre as duas proteínas.^{23,24}

Iniciado o processo de associação, o custo entrópico estaria relacionado ao fato de tais moléculas, oriundas do solvente, ali localizadas, serem deslocadas no sentido de se afastarem da esfera de coordenação, estabelecendo uma zona de contato mais imprópria à impedimentos estéricos quando da interação inibidor-protease. Este deslocamento, em princípio, explicaria o fato de o processo de inibição ser guiado entropicamente – ou seja, sofrer uma variação positiva de entropia mediante o início do equilíbrio químico entre o BTCl e a tripsina. Tal comportamento é observado não somente nos inibidores de proteases da família Bowman-Birk, como também naquela de onde estes inibidores foram derivados - isto é, na família dos inibidores de Kunitz.²⁵ Também é importante salientar que, mesmo mediante o afastamento das moléculas do solvente em direção à área externa à interface, algumas moléculas de água mantêm sua posição. Conforme explicitado anteriormente, isso se dá pela participação direta destas moléculas no mecanismo de inativação da tripsina pelo BTCl.

Tabela 2. Variáveis termodinâmicas do equilíbrio BTCl-tripsina²²

Ensaio (25°C, pH 7.75 e força iônica 0,25)	ΔG° (kcal.mol⁻¹)	ΔH° (kcal.mol⁻¹)	ΔS° (cal. K⁻¹. mol⁻¹)
Ensaio com BAEE	-11,2 ± 0,1	13,8 ± 1,3	84 ± 4
Ensaio com BAPNA	-11,3 ± 0,1	7,0 ± 0,3	61 ± 1

Os aspectos termodinâmicos da interação BTCl-quimotripsina foram elucidados em 1999 por Freitas *et al*, utilizando métodos como a polarização de fluorescência e microcalorimetria de mistura isotérmica.²⁶

No que diz respeito à constante de inibição, adotaram-se dois protocolos diferentes para sua quantificação, sendo que os resultados por eles gerados puderam ser, ao final, confrontados uns com os outros.

A primeira metodologia se baseou na determinação da constante de dissociação do equilíbrio BTCl-quimotripsina, a qual fez uso do conteúdo de protease residual. Para a averiguação deste equilíbrio, aferiu-se a quantidade

enzimática não reagente mediante submissão a um meio contendo o inibidor. Vale a pena destacar que, assim como no experimento realizado uma década atrás, este processo de quantificação se deu de maneira indireta, dado que o resultado obtido – expresso como atividade relativa de quimotripsina – foi gerado a partir da hidrólise, por parte da quimotripsina residual, do substrato sintético *N-Glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide* (GPNA). As medidas realizadas foram obtidas acompanhando a absorbância em 410 nm, consistente com a formação do produto, p-nitroanilida, resultante da hidrólise do substrato GPNA.

Por maior que seja a concordância em relação a ordem de grandeza das constantes de equilíbrio para a formação do complexo BTCl-quimotripsina, há discrepância entre os resultados obtidos e aqueles da literatura.²⁷ A fim de minimizar este efeito, adotou-se um segundo protocolo, o qual utilizara uma técnica baseada na polarização da fluorescência. Preliminarmente, por meio da quantificação enzimática residual utilizando o substrato sintético GPNA, usou-se BTCl marcado com isotiocianato de fluoresceína para se detectar a alteração da atividade inibitória associada a formação de complexo BTCl-quimotripsina, acompanhando as mudanças das dimensões moleculares deste complexo formado por meio da variação de polarização de fluorescência.

Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles observados para outros inibidores da família Bowman-Birk.³⁴ Ao se extrapolar a curva relativa à atividade inibitória do BTCl em relação à quimotripsina, a proporção estequiométrica de 1:1 existente no equilíbrio em questão foi determinada. A tabela 3 mostra as constantes de equilíbrio obtidas por meio dos dois protocolos utilizados.

Tabela 3. Constantes de equilíbrio para formação do complexo BTCl-quimotripsina

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Ensaio com GPNA</i> <i>K_a (x10⁻⁷ M⁻¹)</i>	<i>Ensaio de polarização</i> <i>K_a (x10⁻⁷ M⁻¹)</i>
20	0,53 ± 0,01	0,32 ± 0,03
25	0,87 ± 0,03	0,48 ± 0,04
30	1,06 ± 0,06	0,58 ± 0,02
35	1,36 ± 0,07	-

Em ambas as técnicas se nota o aumento da constante de equilíbrio mediante elevação da temperatura. Estes dados são compatíveis com o processo endotérmico constatado para o equilíbrio entre o BTCl e a tripsina. Outro fator a ser levado em consideração diz respeito às ordens de grandeza das constantes de equilíbrio, as quais são compatíveis com as da tabela 1.

Uma vez aferidas as constantes de equilíbrio em várias temperaturas, foram determinadas a energia livre de Gibbs (ΔG), a entropia (ΔS) e a entalpia (ΔH). Os valores obtidos estão da tabela 4.

Ensaio (25°C, pH 7.6)	ΔG° (kcal.mol⁻¹)	ΔH° (kcal.mol⁻¹)	ΔS° (cal. K⁻¹. mol⁻¹)
Hidrólise de GPNA	-9,46 ± 0,01	10,8 ± 0,4	67,94 ± 0,03
Polarização de fluorescência	-9,11 ± 0,01	11,1 ± 2,5	67,77 ± 0,01

Pelos valores mostrados na tabela 4, pode-se concluir que a inibição da quimotripsina pelo BTCl é um processo endotérmico e espontâneo, de maneira similar ao observado para o sistema BTCl-tripsina. Estes dois efeitos termodinâmicos, em reações como estas, são encontrados na literatura acompanhados um do outro. Aqui, a variação positiva da entropia é de suma importância. Deste modo, também para o acoplamento BTCl-quimotripsina, foi sugerido que as moléculas de água partem de um estado interativo com a superfície proteica e, a partir daí, adotam uma configuração desordenada, localizando-se à parte da área de contato de ambas proteínas quando da formação do complexo. Assim, comprovou-se que a interação BTCl-quimotripsina ocorria de modo termodinamicamente semelhante à interação BTCl-tripsina. Não obstante, como a ligação do BTCl em ambas proteases se dá de modo endotérmico, espontâneo e acompanhado de uma variação positiva de entropia, surge aí um argumento termodinâmico que justifica a possibilidade de um acoplamento independente da tripsina e da quimotripsina ao BTCl.

A contribuição destes dois estudos de Ventura *et al* é de vital importância para o entendimento histórico do desenvolvimento de tecnologias associadas ao BTCl. Ele foi prógono naquilo que se propôs, bem caracterizando os aspectos termodinâmicos das interações BTCl-tripsina e BTCl-quimotripsina.

4 Oligomerização do BTCl

Até o início de 2003 já existiam muitas evidências que suportavam a ideia de o BTCl poder se organizar em estados multiméricos, estabelecendo verdadeiros equilíbrios químicos entre as formas monoméricas, diméricas e triméricas. Diversas técnicas experimentais já haviam sido utilizadas para o estudo de arranjos proteicos oligoméricos, como a difração de raios-x e a ressonância magnética nuclear. Zetta *et al*, ao estudarem um BBI extraído de sementes de luzerna-escudelada (*Medicago scutellata*) por meio de ressonância magnética nuclear, demonstrou que este inibidor, apresentando aproximadamente 70% de similaridade com o BTCl, começava a apresentar estados oligoméricos a partir de 2 mM.⁴⁸ O estudo anterior de Ventura *et al*, realizado no início da década de 80, foi inovador no sentido de utilizar o espalhamento de luz por medidas de fluorescência para averiguar a auto-associação do BTCl.¹²⁹ Todavia, quase 25 anos mais tarde, em 2005, estas estruturas multiméricas foram identificadas por modelagem molecular e por microscopia de força atômica por Silva, Ventura e Freitas *et al*.²⁸

Este estudo edificou bases concretas que corroboraram a ideia de um estado organizado multimérico. À época, a estrutura do BTCl ainda não era conhecida. Entretanto, existiam modelos construídos *in silico* que estavam de acordo com as características estruturais até então descobertas. A partir destes modelos, se obtiveram, por meio cálculos teóricos, os parâmetros da organização proteica relativos à forma monomérica - tais como o tamanho dos eixos e o volume -, os quais serviram de critério para caracterizar os possíveis estados agregados a serem visualizados por meio da microscopia de força atômica. Nela, amostras puras de BTCl foram analisadas, de modo que somente a interação BTCl-BTCl fosse capaz de ocorrer.

Adicionalmente, as constantes de equilíbrio dos estados diméricos, triméricos e hexaméricos foram determinadas, bem como estimativas em relação às formas tetraméricas e pentaméricas.

O trabalho de Silva, Ventura e Freitas *et al* foi o primeiro a descrever quantitativamente o equilíbrio oligomérico do BTCl por meio da técnica de microscopia de força atômica. Além disso, os resultados obtidos por meio dela foram similares aos anteriores por espalhamento de luz, indicando que o equilíbrio estava coerentemente descrito. Foi por meio deste estudo que se alicerçou o ponto de partida em direção ao entendimento do modo como este inibidor pode influenciar o metabolismo proteico, porquanto a formação de agregados acarreta à diminuição da atividade anti proteolítica, sendo este fator um possível meio regulatório.

Para iniciar uma averiguação mais pormenorizada destes aspectos, dois anos mais tarde, em 2005, Freitas *et al* conduziram um estudo que visava examinar a possível formação de oligômeros a partir dos monômeros BTCl-tripsina e BTCl-quimotripsina, bem como do sistema ternário quimotripsina-BTCl-tripsina.²⁹ Para isso, também fez uso da técnica de microscopia de força atômica, adotando o critério volumétrico obtido por Ventura *et al*.

De início, observou-se que o complexo BTCl-quimotripsina gerava um histograma com três bandas bem definidas, caracterizando, além do monômero, as formas diméricas e tetraméricas dele. Além disso, também se observou um pico proeminente relativo a um pequeno volume molecular, correspondente à forma monomérica do BTCl.

Em contraste, ambos os histogramas relativos às espécies BTCl-tripsina e quimotripsina-BTCl-tripsina apresentaram somente uma banda bem definida - relativa ao estado monomérico -, o que indicava uma não propensão ao estabelecimento de equilíbrios entre as formas oligoméricas destes sistemas. Este comportamento revela que a formação destes complexos é mais favorecida do que os estados auto associados.

Posteriormente, procedeu-se a construção das curvas de inibição envolvendo as espécies binárias e as proteases correspondentes. A partir delas, o complexo BTCl-tripsina exibia uma constante de inibição para a quimotripsina da ordem de $1,13 \pm 0,34 \times 10^{-7}$ M. Em contrapartida, a interação entre o

complexo BTCl-quimotripsina e a tripsina era da ordem de $1,36 \pm 0,16 \times 10^{-8}$ M. Deste modo, pôde-se dizer que não são verificadas mudanças conformacionais no BTCl que desfavoreçam a posterior interação com uma ou outra protease.

Dentre todas as conclusões deste estudo, talvez a mais importante delas seja justamente a raiz de onde surgiram os fatos nele expostos: independentemente do grau de oligomerização dos diversos sistemas investigados, notabiliza-se a ocorrência e exposição de dois sítios inibitórios independentes, o que dá origem a uma gama de potenciais aplicações biotecnológicas.

4.1 Efeitos termodinâmicos da oligomerização do BTCl

Com o advento tecnológico, em 2017 foi realizado um estudo por Brant *et al* que permitiu avaliar diretamente e termodinamicamente o processo de interação do BTCl com a tripsina e a quimotripsina.³⁰ Mediante o uso da ressonância plasmônica de superfície, o comportamento do BTCl em escala nanomolar pôde ser observado em relação a formação e dissolução de complexos proteicos dele oriundos. Mais especificamente, esta técnica possibilitou um acompanhamento em tempo real do processo inibitório, gerando importantes dados termodinâmicos que puderam ser confrontados com aqueles obtidos anteriormente por Fachett e Ventura *et al* e Freitas e Ventura *et al*, utilizando métodos experimentais indiretos para descrever a formação dos complexos inibidor-proteases.^{21,26} Além disso, realizou-se uma titulação calorimétrica isotérmica com o intuito de se validar os dados termodinâmicos obtidos por meio da ressonância plasmônica de superfície. Os resultados dos ensaios de ressonância a 25 °C são apresentados na tabela 5.

Estes dados mostram que, para o BTCl, não há preferência de um sítio catalítico em relação a outro, dados os valores similares das constantes de equilíbrio. Nos experimentos anteriores havia discrepância entre os valores dessas constantes.^{21,26}

Por outro lado, cineticamente os estudos de Brand *et al* demonstraram uma disparidade entre as velocidades de associação e dissociação dos sistemas BTCl-tripsina e BTCl-quimotripsina. Para este, os processos ocorriam com

aproximadamente a metade da velocidade daquele, conforme os valores obtidos para as constantes de equilíbrio.

Tabela 5. Dados termodinâmicos da interação do BTCl com tripsina e quimotripsina por ressonância plasmônica de superfície

Protease	K_a ($\times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$)	ΔH° (kcal.mol^{-1})	ΔS° ($\text{cal. K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Tripsina	$0,42 \pm 0,07$	8 ± 2	70 ± 6
Quimotripsina	$0,41 \pm 0,00$	$-7,5 \pm 0,9$	18 ± 3

Pela tabela 5, para a interação BTCl-tripsina, efeitos endotérmicos e entrópicos ocorrem preferencialmente no estabelecimento deste equilíbrio. Em contraste, para o complexo BTCl-quimotripsina, não só a magnitude do efeito entrópico foi inferior – quase 4 vezes menor –, como também o termo entálpico indicou um processo exotérmico. Estes dados foram antagônicos àqueles reportados anteriormente, tendo em vista que, para ambos processos inibitórios, o processo de inibição pelo BTCl foi endotérmico e associado a uma variação entrópica positiva.^{21,26}

Para avaliar as diferenças citadas, procedeu-se à análise direta da formação do complexo BTCl-quimotripsina por meio da técnica de titulação calorimétrica isotérmica. Partindo de uma concentração de inibidor igual a $3 \mu\text{M}$, à 25°C as variáveis termodinâmicas obtidas ($\Delta H^\circ = -7,0 \pm 0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 19 \text{ cal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) não apresentaram variação significativa ao serem comparadas com as apresentadas anteriormente. Todavia, ao se aumentar a concentração de BTCl para $5 \mu\text{M}$, à mesma temperatura de 25°C foi percebida a ocorrência de intermediários não definidos que acarretaram nos efeitos endotérmicos relatados. Esta característica foi observada de maneira mais intensa ao se aumentar gradativamente a quantidade de BTCl até uma concentração máxima de $30 \mu\text{M}$. Outrossim, a proporção estequiométrica quimotripsina:BTCl variou de 1:2 para 1:4, o que estava em desacordo com os estudos envolvendo inibidores de proteases da família Bowman-Birk. Contudo, os resultados corroboravam aqueles obtidos por meio da ressonância plasmônica de superfície.

Uma possível explicação para estes resultados surgiu dos mesmos experimentos realizados anteriormente por Silva *et al*, os quais mostraram, por microscopia de força atômica, a oligomerização do BTCl.²⁸ Dessarte, a auto-associação deste inibidor diminuiria a concentração de BTCl efetivo para a inibição, dando origem a uma pseudoproporção estequiométrica divergente daquela observada na literatura.^{21,26}

Em contrapartida, a explicação para as diferenças das variáveis termodinâmicas obtidas neste estudo em relação às da literatura não é tão imediata. De certo modo, os experimentos conduzidos por Fachett *et al* e Freitas, *et al* partiram de concentrações de BTCl maiores do que as aqui adotadas.^{21,26} Neste sentido, tendo observado que o acréscimo dos fatores endotérmicos é devido ao aumento da concentração do inibidor, pode-se inferir que o processo inibitório BTCl-quimotripsina é, por si só, exotérmico, sendo diretamente influenciado pela ocorrência de eventos endotérmicos, a partir de uma dada concentração de inibidor. De fato, é de se imaginar que, probabilisticamente, quanto maior a concentração de BTCl, maior a taxa auto-oligomerização. Porquanto, um dos possíveis fatores de onde se originariam termos endotérmicos poderia ser a dissociação das formas oligoméricas, a qual daria origem a monômeros que, por sua vez, formariam outros complexos.

5 Aspectos funcionais e potencial biotecnológico do BTCl: efeitos anticarcinogênicos em células de câncer de mama

Já no início do século XXI, era de conhecimento notório a ação dos inibidores de Bowman-Birk no sentido de inibir a proliferação de células cancerígenas. Diversos exemplos haviam sido constatados e novas evidências eram frequentemente descobertas. Dentro da classe dos inibidores de proteases, a família Bowman-Birk era de elevado destaque, sendo uma das mais estudadas em relação a potenciais aplicações biotecnológicas e, principalmente, biomédicas. Frequentemente, proteínas dessa família eram elencadas como potenciais inibidoras de diversas patologias, projetando um futuro promissor.

Se durante a derradeira década do século XX até a primeira do atual mais e mais evidências eram levantadas destacando a imensa aplicabilidade dos inibidores de proteases desta família, foi na década seguinte, por meio dos trabalhos de Mehdad *et al* e Joanitti *et al*, que se passou a conhecer a destacada aplicação do inibidor BTCl: seu potencial anticarcinogênico.^{14,15}

Antes de 2010, a galeria formada pelos diversos BBI já havia sido descrita como potenciais inibidores anticarcinogênicos, dentro da qual o BTCl ainda não figurava. Entretanto, nesses estudos foi constatada sua atividade em tal contexto - tornando inviáveis as células de câncer de mama e impedindo sua proliferação.

O estudo de Joanitti *et al* foi realizado com células tumorais da linhagem MCF-7, juntamente com uma população controle formada por células epiteliais mamárias sadias MCF-10A.¹⁵ A hipótese dos efeitos citostáticos e citotóxicos levantada se deu rente a constatação da redução da viabilidade celular de maneira dose dependente, restando, então, o apontamento de um ou outro - ou de ambos - como fato gerador desse efeito. Não obstante, e há de se muito destacar, a ação do BTCl em nada afetou a população de células controle. Esse primeiro e tão importante resultado apontou o BTCl como agente anticarcinogênico viável ao não interferir no ciclo de células epiteliais mamárias normais, agindo somente nas células tumorais.

No que diz respeito à ação citostática do BTCl, o estudo do ciclo celular e a contagem de células mostraram que o inibidor em questão atua diretamente na transição entre as fases S e G2/M^{14,15}. Nelas, foram aferidas maior quantidade de células em relação à população controle. Sendo assim, para se entender os efeitos do BTCl na viabilidade celular é importante voltar um olhar mais cauteloso em relação à produção e expressão de proteínas que atuam diretamente na regulação do ciclo celular desta etapa.

Uma vez atestada a ação deletéria desse inibidor de serinoproteases em células tumorais, se fazia necessária a constatação do modo com o qual tais células eram levadas à morte, dado que tanto vias apoptóticas quanto mecanismos de necrose podem estar relacionados a isso. Foi então que, com o auxílio de imagens extraídas por meio de microscopia eletrônica de transmissão, os aspectos da ação do BTCl na morfologia mitocondrial foram elucidados,

deixando clara a ocorrência de morte celular desencadeada por vias apoptóticas. Isso se deu pela observação de alterações na permeabilidade da membrana que reveste a mitocôndria, sendo que essas alterações permitiram um maior fluxo entre os conteúdos intra e extra mitocondrial. Advindo dessa constatação pôde-se verificar o aumento do volume desta organela, ratificando a observação anterior.

Para corroborar de maneira definitiva a adoção de mecanismos apoptóticos como desencadeadores de morte celular, o uso de citometria de fluxo permitiu demonstrar claramente a redução do potencial da membrana mitocondrial. Além disso, essa mesma técnica tornou possível a análise da membrana plasmática, na qual se verificaram alterações em sua integridade, o que por si só é propriedade notória de estágios avançados de apoptose.¹⁴

Outro fato que provou o desencadeamento de vias citotóxicas foi a observação de fosfatidilserina na parte externa da membrana celular, evidenciando ainda mais os efeitos apoptóticos do BTCl no ciclo da célula - em células saudáveis, essa molécula é mantida na parte interna; somente quando do processo de apoptose é deslocada para a parte externa.¹⁵

Posto que o meio de morte celular fora constatado, procedeu-se, então, à averiguação de possíveis consequências deste efeito citotóxico na morfologia de outras organelas. Aqui, o uso da citometria de fluxo permitiu novamente a avaliação de um evento importantíssimo: a fragmentação do DNA nas células tumorais tratadas com BTCl. Essa fragmentação se deu em quase 80% das células presentes na cultura, realçando a considerável eficácia do inibidor.¹⁵

Concomitantemente ao desmembramento do DNA, é de se esperar que a morfologia do núcleo celular seja também alterada de maneira significativa. Por meio da microscopia de fluorescência, pôde-se confirmar esta tendência ao se notar a condensação da cromatina.¹⁵

Por fim, pelo uso da microscopia eletrônica de transmissão foi observada uma alta taxa de desorganização do citoplasma das células tumorais ao serem expostas ao BTCl, bem como a ocorrência de vesículas com membrana dupla.¹⁵ Mais revelador que isso, no entanto, foi, por meio dessa mesma técnica, a demonstração do aumento de tamanho dos lisossomos, o que, juntamente com

as demais alterações morfológicas, poderia indicar uma morte celular por meios autofágicos.¹⁵

Para elucidar essa nova possibilidade e concluir este estudo pioneiro, fez-se uso, novamente, da microscopia de fluorescência, a fim de se averiguar a alteração de acidez tanto do lisossomo quanto do meio citoplasmático, uma vez que um ambiente ácido é essencial para a degradação tanto de proteínas quanto de organelas. Constatou-se que as células tumorais tratadas com o BTCl apresentavam um fraco padrão de acidificação, assim como uma diminuição do pH citoplasmático. Dessarte, a hipótese de autofagia celular foi descartada. Desse modo, a explicação plausível sugerida foi a da permeabilização da membrana lisossomal - a qual, juntamente com a apoptose, representava outro meio pelo qual o BTCl poderia atuar citotxicamente. Tal hipótese foi levantada devido ao fato de que um discreto padrão de acidificação, conjugado com o aumento da acidez citoplasmática, constituem-se efeitos primordiais da permeabilização da membrana lisossomal.¹⁵ Este fenômeno pode desencadear uma série de eventos que fatalmente comprometerão o bom funcionamento da maquinaria celular. O equilíbrio rompido da membrana lisossomal se dá quando do deslocamento de hidrolases antes nela contidas para localidades a ela externas. A partir daí essas hidrolases podem induzir a permeabilização da membrana mitocondrial, bem como ativar caspases.

Este estudo realizado por Joanitti e Freitas *et al* se fez vanguarda do entendimento da ação do BTCl em células de adenocarcinoma mamário.¹⁵ Por meio dele, pôde-se constatar e avaliar tanto os efeitos citostáticos quanto os efeitos citotóxicos do modo de ação deste inibidor, além de colocá-lo como potencial candidato à agente anticarcinogênico - pois, além de interromper o ciclo celular entre as fases S e G2/M, diminuindo sua viabilidade, induz processos apoptóticos e permeabiliza a membrana lisossomal. Esta primeira tentativa se mostrou promissora, não somente pelo fato de todos esses fatores nunca terem antes sido reportados combinados, mediante a ação dos inibidores de proteases da família Bowman-Birk, mas também pelo início da descoberta dos mecanismos a eles relacionados.

Se por um lado o progresso obtido na década corrente se mostrou promissor, por outro ainda era necessária uma maior compreensão não somente

dos efeitos externáveis - perceptíveis pela constatação das alterações de formas morfológicas naturais -, como também dos fatores moleculares e bioquímicos que foram deles a causa primacial. Ora, tanto os efeitos citostáticos quanto citotóxicos advêm de um ponto nevrálgico comum, principalmente relacionado ao desmantelamento do equilíbrio das vias proteolíticas ou metabólicas. Neste contexto, em 2014, Souza e Freitas *et al* conduziram outro estudo com células tumorais da linhagem MCF-7 que procurou desvendar o modo pelo qual o BTCl age molecularmente, no sentido de provocar desde a diminuição da viabilidade celular até a fragmentação do DNA, passando pela deformação de organelas como a mitocôndria e o lisossomo.¹⁶

Nesta ocasião, na tentativa de se buscar um potencial agente bioquímico sensível à ação do BTCl, o mecanismo de degradação proteica exercido pela via de ubiquitinação e posterior degradação proteossômica foi um alvo lógico.

O proteassoma 20S é uma macromolécula de formato cilíndrico, sendo constituído por aproximadamente 45000 átomos (figura 7). Ele é uma fração de um complexo maior que compreende outras estruturas proteicas essenciais para a realização do processo de proteólise. Uma destas estruturas são as subunidades 19S, as quais se aderem em ambas extremidades do proteassoma 20S, formando um sistema 19S-20S-19S. A montagem deste arranjo molecular é mediada pelo ATP. A este sistema ternário dá-se o nome de proteassoma 26S.

A ação do complexo proteossômico é de vital importância para a divisão celular. Já é sabido que, quando da presença desta macromolécula com alteração estrutural ou inibida, há ocorrência de processos mitóticos incompletos e parada do ciclo celular na fase G2/M.^{72,73} Esta observação mostra que a localização intracelular do proteassoma é dotada de certa flexibilidade ao decorrer do processo de multiplicação celular, além de poder também estar relacionado com a degradação de ciclinas.⁵⁶

Essa maquinaria molecular é de elevada importância em células tumorais, sendo sua atividade mais intensa ao ser comparada com a de células sadias – fenômeno esse explicado pelo fato de células neoplásticas apresentarem metabolismo mais acelerado devido a elevada taxa de proliferação, bem como ao aumento do estresse oxidativo e dos níveis de citocina.¹⁷ Além disso, as três subunidades catalíticas do proteassoma 20S, onde ocorre o processo

proteolítico (figura 7 A), apresentam atividades distintas: $\beta 1$, contra proteases do tipo caspase; $\beta 2$, contra tripsina; e $\beta 5$, contra quimotripsina.¹⁸ Estes sítios funcionam de modo independente e podem perder suas vacâncias de maneira concomitante. Deste modo, no estudo em questão foram avaliados os possíveis efeitos do BTCl na via de ubiquitinação e degradação via ação do proteassoma 20S.

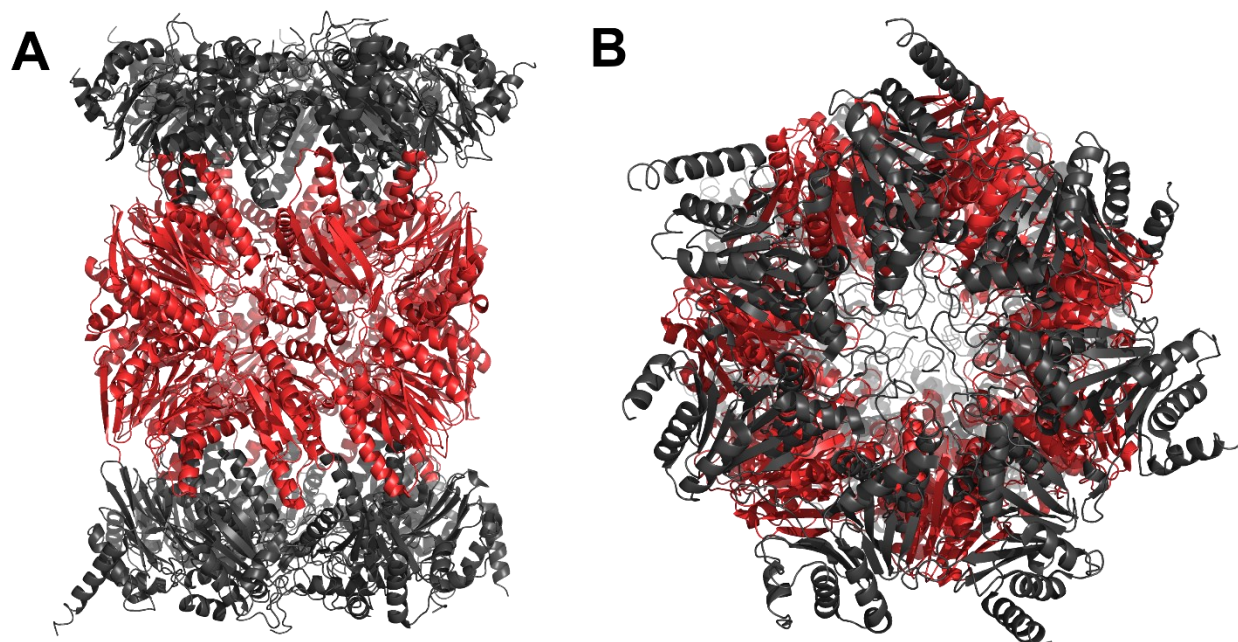


Figura 7. (A) O proteassoma, com destaque para as subunidades catalíticas, em vermelho; (B) vista superior do proteassoma, por onde entram proteínas

5.1 O BTCl e o proteassoma 20S

O complexo formado pelo BTCl e o proteassoma foi analisado por espalhamento de luz dinâmico. Os resultados dessa análise mostraram que o inibidor de serinoproteases impede a ação do proteassoma 20S, formando o complexo BTCl-proteassoma nos primeiros 15 minutos da reação. Além disso, o proteassoma sofre, por ação do BTCl, ligeiras alterações conformacionais, indicadas pelo aumento do raio hidrodinâmico do complexo BTCl-proteassoma, como também pela alteração do perfil de espalhamento correspondente ao BTCl. Adicionalmente, o experimento também revelou a tendência de o BTCl se auto associar em estruturas triméricas quando submetido a um meio

parcialmente básico (pH 7.5). Em contraste, o proteassoma, nas mesmas condições analisadas, conservou o estado monomérico. Contudo, na faixa de pH compreendida entre 2 e 4, as duas moléculas apresentaram tendência de formar agregados ou estruturas oligoméricas.¹⁶

Outro fator importante analisado foi a imunolocalização do BTCI e do proteassoma nas células tumorais. Mediante a utilização de microscopia confocal, detectou-se o modo como ambas as macromoléculas se alocam no meio intracelular. Tanto esta como aquela estão presentes e dispersas nos meios citoplasmáticos e nucleares, livres e formando um complexo inibidor-proteassoma.¹⁶

A interação do BTCI com o proteassoma 20S no citoplasma e no núcleo foi aferida quantitativamente por meio da variação relativa da intensidade de fluorescência emitida. Pôde-se observar que as modificações se davam de maneira tempo dependente. Mais especificamente, a intensidade relativa ao proteassoma decresceu ao longo do tempo, sendo que ao término do período observado – 24 horas – a fluorescência detectada representava cerca de 56% do valor mensurado no início do processo. Em relação ao inibidor, foi constatada a diminuição da intensidade de fluorescência nas horas iniciais do experimento em virtude da formação do complexo BTCI-proteassoma.

Essas observações revelaram dois aspectos de vital importância para o desvendamento dos mecanismos moleculares envolvidos na ação do BTCI em células de câncer de mama. Em virtude de um comportamento exclusivamente decrescente na curva relativa à intensidade da fluorescência do proteassoma, concluiu-se que o BTCI interage e afeta a conformação do complexo proteassômico 20S, corroborando os dados observados por espalhamento de luz dinâmico.

Esta interação foi analisada quantitativamente por meio da determinação das constantes de ligação. Os valores aferidos para essas variáveis foram de $1,0 \times 10^{-7} \text{M}$, $7 \times 10^{-7} \text{M}$ e $14 \times 10^{-7} \text{M}$ para os sítios relativos à tripsina, quimotripsina e caspase, respectivamente. Esses resultados revelaram uma diferença primordial entre a ação do BTCI e a de outros inibidores da família Bowman-Birk. Enquanto para estes a especificidade em relação aos sítios enzimáticos concentra-se essencialmente naqueles relativos à quimotripsina; para o BTCI o

efeito inibitório foi expressivo nos três sítios, dada a magnitude das constantes de inibição. Vale a pena ressaltar que esta foi a primeira vez na qual um inibidor de proteases dessa família apresentou atividade considerável para os três sítios catalíticos do proteassoma 20S.

Dentre as três localidades mencionadas, a ação mais surpreendente se deu no sítio concernente à caspase. Historicamente, dentro da família dos inibidores de Bowman-Birk, nenhuma outra espécie apresenta inibição contra caspase. Considerando que para a efetiva degradação proteica pela via de ubiquitinação é necessária a ação dos três sítios catalíticos presentes nas subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ do proteassoma 20S, Sousa *et al* sugeriram que a inibição do sítio ativo da caspase pelo BTCl originava-se do impedimento estérico causado pela interação enzima-inibidor entre o BTCl e os sítios catalíticos da tripsina e/ou quimotripsina.^{16,19,20}

A realização deste estudo explicitou uma visão de conjunto que o grupo de Freitas *et al* desenvolveu acerca do processo que leva células de adenocarcinoma mamário a perderem sua viabilidade e a sofrerem respostas que fatalmente acarretarão na morte celular devido à ação do BTCl. Desta forma, estabeleceu-se aí o suporte de uma presumível relação entre os efeitos citostáticos e citotóxicos e os fatores moleculares que a eles levaram.

Adicionalmente, os efeitos anticarcinogênicos do BTCl foram avaliados em uma linhagem de adenocarcinoma mamário invasivo (MDA.MB.231), contrastando-os com aqueles de uma linhagem não invasiva (MCF-7).¹⁴ Este estudo mostrou que tais efeitos estão relacionados com a alteração do ciclo celular, levando, além da morte via apoptose, sinalização de processos inflamatórios e de estresse oxidativo.

Conhecendo a atuação do BTCl no ciclo celular e uma vez sabendo que seu papel está intimamente relacionado com a ação do proteassoma 20S, outras análises no nível celular foram realizadas. Estes novos ensaios envolveram a avaliação atividade mitocondrial e de sua membrana, haja vista que alterações na morfologia e no ambiente eletrostático acompanham a morte celular associada à inativação do proteassoma 20S.

Neste sentido, com o auxílio de uma sonda fluorescente foi possível detectar o inchaço da estrutura mitocondrial mediante o tratamento das células

tumorais com o BTCl. Além disso, a membrana mitocondrial sofreu uma despolarização durante este processo. Assim, foi notória a alteração causada pelo inibidor no desempenho das funções mitocondriais em ambas as linhagens celulares.

Alterações químicas e morfológicas das mitocôndrias estão diretamente relacionadas com a ocorrência de estresse oxidativo e, conseqüentemente, com o surgimento das espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, são desencadeados por um processo apoptótico. Notou-se que tanto as linhagens MCF-7 quanto MDA.MB.231, incubadas com BTCl, apresentaram elevação no nível das espécies reativas de oxigênio, posteriormente ao aumento de volume e a despolarização de membrana das mitocôndrias.

Todavia, ainda era necessário um olhar mais cauteloso para o processo apoptótico, especificamente no que diz respeito a participação das caspases. A partir daí, verificou-se que, para a linhagem MDA.MB.231, havia um aumento da atividade relacionada à caspase-3, estendendo tal efeito à caspase-7 no caso da linhagem MCF-7.

Por fim, o último aspecto averiguado foi a expressão dos genes do complexo NF- κ B - um complexo proteico que está envolvido na resposta celular a estímulos, como o estresse, citocinas, radicais livres, dentre outros. A regulação incorreta ou a alteração da atividade de NF- κ B por inibidores de proteassoma está associada ao câncer e às doenças inflamatórias e autoimunes.

Neste contexto, o resultado relevante - gerado por meio de uma análise de PCR - foi o aumento da expressão de interleucina-8 em ambas as linhagens. A ação mais efetiva do BTCl ocorreu na invasiva; todavia, a expressão do gene BAX foi mais intensa na não invasiva. Para os demais genes - BCL-2, NFKB2 e c-FLIP -, não foi observado nenhum efeito na linhagem MFC-7, em contraste com a diminuição da expressão na MDA.MB.231.

Pode-se dizer que estes estudos representam um dos mais importantes alicerces que fundamentam toda a pesquisa desenvolvida sobre o BTCl, há mais de 40 anos, e o potencial de aplicação biotecnológica deste inibidor.

6 Nanoencapsulamento

O desenvolvimento da indústria farmacêutica nos últimos anos passou por diversas etapas que trouxeram novas perspectivas em relação ao tratamento de inúmeras doenças. Parte deste avanço se deu pelas copiosas inovações tecnológicas que revolucionaram não só as áreas biomédicas, como a ciência de um modo geral. A consequência imediata deste novo paradigma foi o surgimento de metodologias que abriram caminhos antes impensáveis dentro da medicina.

Sempre que um tratamento envolvendo o uso de novos medicamentos é proposto, aspectos relacionados à estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade destes compostos estão no cerne dos protocolos a serem considerados.

A estabilidade está relacionada com a capacidade de um fármaco conservar suas propriedades de interesse a longo do tempo. Compostos instáveis sofrem alterações estruturais que acarretam a perda de sua funcionalidade original. Com isso, se tornam desinteressantes tanto farmacologicamente quanto economicamente.

A bioatividade por sua vez é a característica conferida aos compostos que manifestam seus efeitos em organismos vivos, sendo estes desde pequenas células em um ambiente *in vitro* até espécimens complexas, como o próprio ser humano – *in vivo*. Deste modo, um composto bioativo é promissor quando sua ação se mostra eficaz em sistemas cujas condições são as mais próximas das fisiológicas.

Por fim, mesmo que um fármaco seja estável e bioativo, sua aplicabilidade está diretamente relacionada com a capacidade de atingir o alvo molecular quando da sua entrada no sistema de interesse. Dentro do organismo, diversas são as rotas – tanto físicas quanto químicas – nas quais a droga pode seguir. Sendo assim, é impositivo que não ocorra dispersão, otimizando seu caminho bioquímico para que, além do fármaco agir de modo tópico, toda a quantidade ministrada seja de fato utilizada. A característica relacionada a esta última potencialidade é a biodisponibilidade.

A biodisponibilidade é tão importante quanto a estabilidade e a bioestabilidade, porquanto é dela advinda a utilização da menor dose possível

que produza os efeitos desejados. Com isso, são evitadas possíveis superdosagens e as consequências dela originadas. Dessarte, uma nova área emergiu dentro das ciências biomédicas: a chamada *drug delivery systems* - em uma tradução livre, seriam os *sistemas de entrega de fármacos*. Estes sistemas visam garantir que o medicamento aplicado atue tão somente no local da mazela, minimizando possíveis efeitos colaterais decorrentes da ação do fármaco em outras vias bioquímicas.

Estruturalmente, o BTCI é uma molécula pequena, de aproximadamente 8kDa. Além disso, sua atividade é conservada e uma ampla faixa de temperatura e pH devido a presença de 14 resíduos de cisteína em sua estrutura, as quais formam 7 ligações dissulfeto. Portanto, sua forma conformacional é rígida e pouco suscetível a alterações decorrentes de condições físicas e químicas que desnaturariam uma grande quantidade de proteínas. Sendo constatadas a estabilidade e a atividade, é importante que, para o uso em terapias médicas no contexto da oncologia, a biodisponibilidade esteja otimizada de modo que toda dosagem prescrita atue no alvo desejado.

PARTE II

Justificativa e Objetivos

1 Justificativa

De acordo com o *Instituto Nacional de Câncer* (INCA), o câncer de mama é a neoplasia mais frequente em mulheres, representando aproximadamente 28% dos casos descobertos a cada ano.³⁵ Além disso, mundialmente, segundo a *Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer* (IARC), ele é o tipo de câncer que mais mata esta população.³⁶ Dados para o ano de 2012 revelaram que cerca de 522 mil mortes ocorreram devido a este carcinoma.

Ainda em concordância com a IARC, esta situação é ainda mais preocupante nos países em desenvolvimento. Neles, as regiões que atravessam uma fase de mudança social e econômica, conjugada com a transição para um estilo de vida mais próximo dos países industrializados, apresentam aumento dos casos de câncer de mama. Esta constatação está relacionada tanto com a nova rotina nutricional adotada por essas regiões como também com fatores hormonais e reprodutivos.

Neste sentido, o Brasil está susceptível a uma maior incidência desta doença. Por isso, é necessária não só a adoção de políticas públicas que tenham como objetivo a prevenção e detecção da enfermidade em suas primícias, como também o apoio a pesquisas científicas que visem desenvolver alternativas ao tratamento adotado atualmente.

Um ponto importante a ser levado em consideração, segundo a IARC, diz respeito a constatação que, nestes países em desenvolvimento, a taxa de mortalidade é superior aos demais, haja vista que o tratamento ainda é economicamente inviável para grande parte da população.

As tecnologias advindas da pesquisa relativa ao BTCl são promissoras não só do ponto de vista acadêmico - posto que sua ação anticarcinogênica já foi demonstrada -, como também clínico, uma vez que este inibidor não causa efeitos adversos em células sadias.

Os mecanismos moleculares pelos quais o BTCl se liga ao proteassoma 20S, inativando-o, são desconhecidos. Isso se dá principalmente pela dificuldade de se cristalizar o complexo binário e obter sua estrutura tridimensional. Sendo assim, o uso de metodologias *in silico* pode fornecer importantes contribuições para a elucidação das interações que dão origem ao sistema BTCl-proteassoma.

Essas contribuições, por sua vez, poderão colaborar para o design de novos fármacos. A reprodução com máxima precisão dos fatores químicos envolvidos na formação do complexo quimotripsina-BTCl-tripsina, no sentido de identificar os resíduos mais colaborativos em ambas interações, é de suma importância para o entendimento da atividade anticarcinogênica deste inibidor. Uma vez obtido este protocolo, poder-se-á, então, estendê-lo em um estudo posterior para se desvendar os mecanismos moleculares da ancoragem do BTCl ao proteossoma 20S, uma vez que esta interação se dá em sítios análogos aos da tripsina e da quimotripsina.

2 Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho está dividido em duas partes distintas: avaliar a resposta *in vitro* de células de adenocarcinoma mamário mediante tratamento com BTCl nanoestruturado; e analisar estruturalmente *in silico*, por métodos semi-empíricos, os parâmetros estruturais que estão diretamente relacionados aos mecanismos moleculares pelos quais o BTCl apresenta os efeitos citostáticos e citotóxicos em células tumorais.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar e encapsular o BTCl em nanopartículas de quitosana, caracterizando-as em relação às propriedades físico-químicas;
- Conduzir ensaios *in vitro* para avaliar a resposta da linhagem de células tumorais MCF-7 ao tratamento com BTCl nanoestruturado;
- Desenvolver um protocolo *in silico* que permita avaliar os resíduos mais colaborativos para o estabelecimento dos complexos BTCl-tripsina e BTCl-quimotripsina;
- Avaliar *in silico* a importância de moléculas de água para interface BTCl-tripsina.

PARTE III
Metodologia

SEÇÃO A

Métodos experimentais

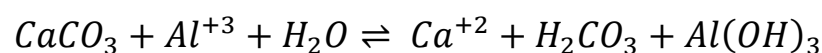
1 Purificação do BTCl

1.1 Obtenção de sementes de *Vigna unguiculata*

O protocolo utilizado de purificação do BTCl foi elaborado por Ventura *et al* em 1966, ao adaptarem e otimizarem as rotinas que eram então conhecidas para se obterem os inibidores de Kunitz e aqueles pertencentes à família Bowman-Birk extraídos de outras espécies vegetais.³² Nele, são utilizadas sementes de feijão-de-corda da espécie *Vigna unguiculata*.

Para a obtenção destas sementes em grandes quantidades, foi realizado o plantio do feijão a partir de sementes estoque, cujo cultivo ocorreu na Estação de Biologia Experimental da Universidade de Brasília, em 2016. A semeadura foi realizada em meados de outubro, visando aproveitar a transição entre a estação seca e chuvosa que ocorre no Distrito Federal, posto que o feijão é sensível ao estresse hídrico causado ou pela secura excessiva ou por chuvas exacerbadas. Deste modo, ao se servir de uma transição climática suave, são evitados índices pluviométricos extremos.

Previamente ao plantio, realizou-se o processo de calagem manual da área de cultivo. Este consiste na aplicação de calcário para equilibrar a acidez do terreno, diminuindo a compactação do solo e aumentando a biodisponibilidade dos nutrientes, além de minimizar os efeitos tóxicos advindos do alumínio e do manganês distribuídos na região. Para o feijão, esta etapa é de grande importância, posto que seu crescimento radicular não é elevando - o que por si só já é um fator limitante para a obtenção das espécies químicas indispensáveis ao seu desenvolvimento, como cálcio e o magnésio:



Uma vez maturadas, as vagens foram colhidas e as sementes devidamente selecionadas, separando-as de detritos oriundos do solo quando do processo de colheita. Posteriormente, expôs-se ao ar livre as sementes obtidas, minimizando a umidade a elas associada. Por fim, foram estocadas em uma câmara fria à -4 °C

até o momento de sua utilização, quando então serão previamente deixadas ao ar livre até o equilíbrio da sua temperatura com a do ambiente.

1.2 Obtenção do extrato bruto

As sementes do feijão-de-corda foram descascadas e trituradas até se chegar a um pó fino. A 500 g deste pó foram adicionados 2 L de água tipo II e 200 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) na concentração de 200mM. Este reagente é um inibidor de serinoproteases. Com o seu uso, objetiva-se prevenir a degradação das espécies de interesse pela ação destas enzimas.

Posteriormente, este extrato inicial foi deixado sob agitação por 12 horas à -4 °C e submetido a um movimento mais vigoroso em um liquidificador. Com isso, intenta-se conferir um maior grau de homogeneidade à amostra. Este último processo foi realizado em 3 etapas de 5 minutos, com intervalo de outros 5 minutos entre elas para evitar o aquecimento da solução. Em seguida, o extrato inicial foi filtrado em uma malha de algodão, onde se descartou a fração sólida.

Logo após, à solução obtida adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) 100% para uma concentração final de 2,5%. Este processo foi realizado sob agitação por meio de um lento gotejamento durante 1 hora. A ação do TCA faz com que a rede de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água do solvente e a superfície das proteínas seja rompida, atenuando os efeitos da esfera de hidratação.¹⁰⁹ Como consequência, estas proteínas não permanecem solúveis, podendo ser facilmente separadas. Muito embora o TCA não tenha força suficiente para romper ligações peptídicas, seu uso acarreta em uma provável desnaturação ao deformar as estruturas secundárias. No BTCl, este efeito não é pronunciado, haja vista que devido à presença de 7 ligações dissulfeto sua conformação é relativamente rígida. Deste modo, além da remoção de sais e detergentes, o uso do TCA separa o BTCl de outras proteínas maiores.

Após o término do gotejamento e uma posterior etapa de homogeneização por agitação magnética durante 1 hora, a solução resultante foi coada em um papel-filtro, depositando o que há de ser eliminado na fase sólida e mantendo a fração de interesse no extrato líquido. Para a completa eliminação das

impurezas, esta solução foi submetida à centrifugação por 40 minutos à 4 °C e 9000 rpm, eliminando posteriormente a fração depositada no fundo do frasco.

Na etapa seguinte foi adicionado sulfato de amônio para uma concentração final de 50% (p/v). A função do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é precipitar proteínas, incluindo o BTCl, concentrando-o em uma fração com menos moléculas.

Como o BTCl é uma proteína dotada de carga superficial, há tendência de formação de agregados moleculares por atrações de natureza eminentemente eletrostáticas.¹¹⁰ De um modo geral, conforme o sulfato de amônio é adicionado a proteínas desse tipo, forma-se uma esfera de coordenação iônica ao redor destas espécies, balanceando a carga superficial e impedindo-as de se ligarem umas às outras. À vista disso, sua solubilidade aumenta. Todavia, prosseguindo a adição de mais íons, a força iônica da solução continua crescendo. Então, surgem cargas eletrostáticas na superfície proteica, agregando-as e causando uma diminuição de solubilidade, acarretando sua precipitação.

Tendo sido adicionado sulfato de amônio, a solução foi mantida em agitação magnética por 1 hora para completar a precipitação do BTCl. Posteriormente, realizou-se uma etapa de centrifugação por 40 minutos à 4 °C e 9000 rpm; sendo, então, o TCA e outros interferentes presentes na fase líquida descartados, restando o BTCl na fase sólida.

Nesta altura, poder-se-ia dar sequência à fase de purificação cromatográfica. Entretanto, a força iônica da solução está elevada, o que poderia causar uma compressão da matriz cromatográfica. Além disso, a presença excessiva de cargas eletrostáticas seria um impeditivo em relação a sua aplicação em colunas de troca iônica. Para minimizar este efeito, a fase sólida obtida na etapa anterior foi ressuspensa em água tipo II e colocada em saquinhos de diálise (7 kDa) para a retirada dos sais dissolvidos provenientes do sulfato de amônio. Estes saquinhos foram depositados em uma proveta de 2 litros preenchida com água tipo II, sendo ela substituída 10 vezes em intervalos de 1 hora e 30 minutos.

1.3 Cromatografia de troca iônica e análise de pureza

Após a obtenção deste extrato bruto, a posterior etapa de purificação foi realizada por cromatografia de troca iônica com uma matriz de dietilaminoetil

celulose (DEAE-C) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Antes da purificação a matriz foi ativada, adquirindo caráter catiônico no nitrogênio básico do grupo DEAE. Uma vez que a fase estacionária se encontra carregada, proteínas aniônicas poderão a ela se unir. Posteriormente, dá-se a eluição por meio de um gradiente salino, cujos íons irão competir com as espécies aderidas, desagregando-as da coluna por ordem de afinidade.

Neste trabalho, foi utilizada uma coluna de vidro medindo 3,5 cm e 23 cm de diâmetro e altura, respectivamente, a qual foi previamente lavada com água e ativada com soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio à 0,2 M, assim como tampão fosfato de sódio 10X e 1X em pH 7.3, respectivamente. Antes de injetar a amostra na coluna, a ela foi adicionado este mesmo tampão 10X para uma concentração final de 1X. Em seguida, o extrato bruto foi centrifugado por 40 minutos à 18 °C e 9000 rpm, garantindo que nenhuma partícula sólida adentre no ambiente cromatográfico. Logo após a aplicação na coluna, realizou-se a passagem de uma solução tampão 1X, proporcionando a eliminação das proteínas não ligadas. Por último, o BTCl foi eluído com a aplicação de um gradiente linear de cloreto de sódio 0-0,8 M. O fluxo utilizado durante todo processo cromatográfico foi de 3 mL/min.

Quando do prosseguimento da eluição, deu-se concomitantemente a aferição da absorbância em 280 nm no aparelho AKTA Prime da GE Healthcare (Chicago, Estados Unidos). Deste modo, foi possível coletar e identificar em tempo real a fração referente ao BTCl, dado que esta proteína exibe um pico máximo de absorção em 280 nm. Posteriormente, fez-se necessária uma etapa de dessalinização, a qual foi realizada por meio da técnica de cromatografia de exclusão molecular. Nela, a estrutura da resina que compõe a matriz é formada por diversas cavidades porosas de pequenas dimensões, onde espécies menores, tais como os cátions e ânions salinos, serão alocadas por mais tempo, separando-as da proteína.

A solução contendo BTCl foi então aplicada a uma coluna medindo 3,5 cm e 23 cm de diâmetro e altura, respectivamente, cuja matriz era Sephadex G-50 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha). Logo após, o conteúdo aderido à coluna foi eluído com água tipo II. Paralelamente, realizou-se a leitura da absorbância em 280 nm no aparelho AKTA Prime, possibilitando a separação em tempo real

do BTCl, coletado no primeiro pico por se desligar primeiro da fase estacionária em relação às moléculas de sal.

Finalmente, tendo sido obtida uma solução aquosa contendo o BTCl, esta foi liofilizada e teve sua pureza avaliada por meio de um espectrômetro de massa MALDI-TOF.

2 Encapsulamento do BTCl em quitosana

2.1 Síntese de nanopartículas de quitosana via método químico

Neste trabalho, foi adotada a técnica química de gelificação iônica para sintetizar as nanopartículas. Nela, o produto resultante é uma estrutura esférica na qual o princípio ativo é contido. O processo de síntese se dá a partir de interações eletrostáticas entre o polímero e um agente estruturador, o qual deve ser provido de carga oposta à do polímero (contra íon). Em suma, é o contato da cadeia polimérica com o agente estruturador que fará surgir a nanocápsula.

A primeira etapa deste processo é solubilizar o polímero em água. Logo após adiciona-se o fármaco de interesse. A partir daqui duas rotas podem ser tomadas. A primeira procede à adição desta formulação à uma solução contendo o agente estruturador, formando as nanopartículas em uma espécie de hidrogel. A segunda inverte a ordem desta última etapa. Ao invés de se acrescentar a mistura do polímero com o composto bioativo à solução do contra íon, adiciona-se o agente estruturante à solução polimérica. O produto de ambas rotas é o mesmo.¹¹⁸ Aqui, há de se fazer notar que podem ser utilizados polímeros tanto catiônicos quanto aniônicos.^{119,120}

Ao longo dos anos, diversos polímeros se mostraram capazes de formar nanopartículas estáveis, tais como o colágeno, carboximetil celulose e o ácido hialurônico.¹¹⁷ Neste trabalho, o polímero escolhido foi a quitosana, pois além de se mostrar eficaz na síntese de nanocápsulas com aplicabilidade biotecnológica, é um composto atóxico e biodegradável pelo metabolismo humano. Além disso, sua obtenção é realizada a partir da carapaça de crustáceos por um processo que envolve etapas simples de desacetilação alcalina. Sendo a quitosana de fácil

consecução, há aqui um alinhamento tanto funcional quanto econômico, motivo pelo qual foi adotada neste projeto.

Sabendo que a quitosana, em meio ácido, é catiônica - dada a protonação dos grupos amínicos -, o contra íon a ser escolhido deve possuir caráter aniônico. Um dos compostos mais amplamente utilizados em conjunto com a quitosana é o tripolifosfato de sódio (TPP).¹²¹ Ademais, é uma substância atóxica ao ser humano. Por isso, foi aqui adotado como agente estruturador.

Tendo sido escolhidos os materiais, prosseguiu-se, então, para a síntese das nanopartículas contendo BTCl. Inicialmente, à 37,5 mg de quitosana foram adicionados 30 mL de água tipo I. Para acidificar esta solução, acrescentaram-se 30 μ L de ácido acético. Esse sistema foi mantido sob agitação por 30 minutos. Deste modo, formou-se a solução estoque de quitosana (A). Em seguida, 72 mg de BTCl em pó foram solubilizados em 8 mL da solução A. Submeteu-se este preparado à sonicação por 30 minutos. Paralelamente, foram adicionados 10 mg de TPP a 5 mL de água tipo I, formando a solução aniônica B. A etapa de formação das nanocápsulas foi realizada sob agitação gotejando 2 mL da solução B à solução de BTCl, com um fluxo de 0,04 mL/s. Por fim, à solução contendo as nanopartículas recém formadas foram adicionados 98 mg de polietilenoglicol (PEG2000) sob agitação – a qual foi mantida por 10 minutos.

As nanocápsulas de controle foram produzidas pelos exatos procedimentos descritos, com exceção da etapa de adição do BTCl.

2.2 Caracterização hidrodinâmica das nanopartículas

A etapa final deste trabalho envolveu a caracterização das nanopartículas por meio do método de espalhamento dinâmico de luz do tipo *size distribution* (DLS). Esta técnica consiste em detectar a dispersão da luz ao passar pela amostra, sendo por meio dela derivados os parâmetros físico-químicos. Uma vez que estas ondas eletromagnéticas interagem com a solução, sofrem em decorrência disto o fenômeno de espalhamento. O padrão com o qual ocorre é dinâmico, visto que as partículas dispersas se encontram em um tipo movimento browniano, tendo a distância entre elas uma variação ao longo do tempo. Outros fenômenos físicos podem ocorrer do mesmo modo, tais como interferências

construtivas e destrutivas. Todos estes padrões dinâmicos se relacionam com as características físicas das partículas, sendo por meio deles obtidas as informações de interesse (polidispersividade, estabilidade e as dimensões moleculares). Neste trabalho, esta análise foi realizada por meio do equipamento Zetasizer Nano SZ (Malvern, Reino Unido).

3 Ensaio *in vitro*

Todos os procedimentos aqui descritos foram realizados com materiais anteriormente esterilizados e em uma câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 40 minutos antes da realização de qualquer tipo de manipulação.

3.1 Manutenção da cultura de células

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário não invasivo (MCF-7) foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro (CBRJ), tendo sido armazenadas em nitrogênio líquido. Previamente descongeladas a 37°C, 500 µL destas alíquotas foram adicionados em 3 mL de meio de cultura EMEM (*Eagle's minimum essential medium*) suplementado com soro fetal bovino e insulina, além dos antibióticos penicilina e estreptomicina para concentrações finais de 10% (m/v), 0,01 mg/mL, 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Em seguida, a cultura celular foi centrifugada por 5 minutos à 300 g. Uma vez depositadas na fase sólida, procedeu-se à ressuspensão em 5 mL de meio de cultura EMEM. Posteriormente, foram transferidas para um frasco de cultura e incubadas a 37°C em uma estufa, cujo nível de CO₂ se manteve em 5%. A cada 48 horas o meio de cultura era substituído por um novo. O conteúdo do frasco foi observado em um microscópio de luz invertida, sendo avaliado em relação à multiplicação celular, morfologia e à presença de contaminantes.

Atingido o estágio de confluência (máximo crescimento), as células foram removidas do frasco de cultura e recultivadas em um ambiente que proporcione uma menor densidade em relação à sua distribuição por unidade de área. Para

isso, descartou-se o meio de cultura e 2 mL de solução tripsina-EDTA 1X foram adicionados, dissociando a monocamada de células aderida ao frasco. Após 2 minutos de incubação na mesma estufa utilizada anteriormente, esta desassociação foi constatada microscopicamente. Acrescentou-se então 2 mL de meio de cultura para inibir a atividade da tripsina. Logo após, a suspensão de células foi centrifugada por 5 minutos à 300 g. Após a remoção do sobrenadante, a fração depositada foi ressuspensa com meio de cultura e transferida para um frasco menor, sendo posteriormente incubada à 37 °C e 5% (v/v) de CO₂.

3.2 Tratamento das células com BTCl nanoestruturado

Após a incubação final e atingido o estágio de confluência, realizou-se a análise da qualidade do sistema celular, avaliando sua aptidão para o tratamento com BTCl nanoencapsulado. Com isso, espera-se determinar se a cultura está homogeneamente dispersa e viável. A este fim, retiraram-se os frascos da estufa e se descartou a fase líquida, procedendo a uma posterior lavagem com PBS 1X. Em seguida, foi acrescentado 1mL de solução tripsina-EDTA 1X para desassociar as células da superfície, sendo este sistema mantido em estufa por 3 minutos. Posteriormente à adição de meio de cultura, esta solução foi transferida para um tubo e submetida a centrifugação por 5 minutos a 300 g. Descartado o sobrenadante, a fase sólida foi ressuspensa em 1 mL do mesmo meio. Esta solução que será plaqueada, objetivando qualificar sua propensão para subsidiar os ensaios vindouros.

Visando a etapa de plaqueamento, para a determinação do número de células 10 µL da suspensão foram adicionados a 40 µL de solução de azul de tripan a 0,4% em PBS (m/v). Uma vez depositados 8 µL dessa mistura em uma câmara de Neubauer, as células presentes nos quatro quadrantes laterais de maiores dimensões foram contadas por meio de um microscópio. Então, o número final foi obtido por meio da seguinte fórmula:

$$n^{\circ}_{\text{células}} = \frac{n^{\circ}_{\text{células contadas}}}{n^{\circ}_{\text{quadrantes contados}}} * \text{fator de diluição} * 10^4$$

De posse deste dado, o ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método coulométrico do MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difenil tetrazolio -, estabelecido por Mosmann e obtido pela SIGMA (St Louis, MO, USA).⁴⁸ Em células viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinato desidrogenase, reduzem o substrato MTT, dando origem à uma espécie química cristalina chamada formazan, de cor azulada. Dessa forma, a quantificação do formazan produzido por células sadias submetidas a determinado tratamento se correlaciona com a viabilidade, possibilitando sua mensuração.

Para isso, foram plaqueadas, em triplicata, aproximadamente 5×10^3 células nos poços de uma microplaca contendo 96 destas estruturas. Após incubação na estufa por 24 horas, a placa de cultura foi observada em um microscópio de luz invertido, averiguando a morfologia e a multiplicação das células, bem como a presença de contaminantes. Então, removido o meio de cultura, foram adicionados 150 μ L de solução de MTT - 15 μ L de MTT a 5 mg/mL em 135 μ L de meio de cultura EMEM - em cada poço. Depois da incubação deste sistema por 3 horas, a fração líquida foi dispensada e 100 μ L de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan criado. Realizou-se a quantificação deste formazan pela medida da absorbância do conteúdo dos poços no comprimento de onda de 570 nm, por meio de um espectrofotômetro conjugado à uma leitora de microplacas (SpectraMax M3 microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A partir desta análise, pôde-se determinar se a cultura era adequada para os ensaios posteriores.

Uma vez demonstrada a eficácia deste sistema, a etapa de tratamento com o BTCl livre e nanoestruturado foi iniciada. O mesmo procedimento descrito anteriormente para o plaqueamento e para a quantificação da viabilidade celular foi adotado, à exceção da adição de um estágio complementar para a aplicação das moléculas de interesse em análise. Nele, após a etapa de avaliação microscópica, foi removida a fração líquida, sendo, então, adicionados meio de cultura e solução contendo as nanopartículas nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μ L.

3.3 Análise estatística

Os dados gerados durante a realização dos experimentos foram expressos como uma média aritmética acrescida do erro padrão associado a esta mesma média, sendo estes obtidos por meio de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. A determinação das diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos ensaios performados foi realizada por uma análise de variância (ANOVA) com o teste estatístico de Dunnett's, usando o software SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Adotaram-se as probabilidades de significância (valor-p) menores que 0,05 como significativas.

SEÇÃO B

Métodos computacionais

4 Procedimentos e cálculos realizados

4.1 Preparação do sistema

A partir da estrutura 3RU4, prepararam-se dois sistemas. O primeiro, constituído pelo complexo BTCl-quimotripsina, foi construído pela remoção da tripsina, água e demais reagentes formados durante a cristalização. O segundo, dado pelo sistema BTCl-tripsina, foi formado por um protocolo análogo ao anterior - todavia, o íon Ca^{+2} foi mantido a fim de não alterar o ambiente eletrostático ao redor dele, tendo em vista que este íon é um agente balanceador de cargas para cadeias laterais próximas.

Posteriormente, estimou-se o estado de protonação das cadeias laterais das histidinas utilizando o servidor *PDB2PQR*.¹¹¹ Nele, o sistema foi simulado em pH 7,3. Com isso, se observou que todas as histidinas de ambas estruturas adotaram a forma monoprotionada.

Em seguida, as cadeias laterais foram analisadas a fim de determinar as conformações ótimas. Esta análise foi realizada utilizando o servidor *MOLPROBITY*.¹¹²

O mapa de densidade eletrônica da estrutura 3RU4 foi analisado utilizando o programa *WinCoot*.¹¹³ Por meio desta avaliação, verificou-se que a porção terminal do BTCl estava indeterminada devido a densidade eletrônica quase inexistente. Por isso, foram excluídos os resíduos Ser¹⁴, Ser¹⁵, Lys¹⁶ e Ser⁷⁴. A Pro¹⁷ e a Lys⁷³ converteram-se em porções C-terminal e N-terminal.

Em ambos os sistemas foram adicionados hidrogênios por meio do pacote *LEaP*, contido no programa *AMBER*.^{41,114} Estes hidrogênios passaram por um processo de otimização utilizando o algoritmo *Steepest Descent* com uso do modelo de solvatação *igb7*, sendo posteriormente submetidos a uma simulação de dinâmica molecular *Simulated Annealing*, no qual o sistema foi submetido a etapas de arrefecimento partindo de 1700 K até 0 K em 3 ps, fazendo uso do termostato de Berendsen e do prévio modelo de solvatação.

4.2 Análise dos resíduos de aminoácidos mais colaborativos

Os dois sistemas proteicos obtidos a partir do método de preparação descrito anteriormente são constituídos por aproximadamente 4500 átomos. Estruturas deste tamanho são de difícil manipulação em estudos *in silico* mais robustos por necessitarem de um tempo computacional proibitivo. Deste modo, buscou-se, em um primeiro momento, obter uma estrutura menor que bem representasse o conjunto das contribuições energéticas mais importantes presentes nas formas nativas.

Objetivando a obtenção deste sistema, construiu-se uma curva de fragmentação para ambas as estruturas. Nela, analisa-se a energia de interação entre o inibidor e a protease de cada subsistema em função do número de átomos. Esta energia foi calculada de modo pontual, sem otimização, por meio da aproximação semiempírica PM6-D3H4X implementada no programa MOPAC, utilizando o modelo de solvatação COSMO.⁴²

Inicialmente, as energias de interação foram calculadas para o sistema completo e para a menor porção de interesse, a qual foi definida como sendo a interface entre o inibidor e a serinoprotease. Esta interface é constituída pelos resíduos do BTCL a 5 Å da enzima e pelos resíduos da enzima a 5 Å de distância do BTCL. A partir desta região, construíram-se outros sistemas maiores (*clusters*). Tais estruturas foram formadas adicionando, a partir da interface, resíduos do complexo nativo em raios sucessivos de 1 ou 2 Å. Deste modo, busca-se obter o menor *cluster* cuja energia de interação mais se aproxime do sistema completo, garantindo a representatividade do maior número de interações intra e intermoleculares. Vale salientar que, para completar as valências criadas a partir da exclusão de resíduos, foram adicionados hidrogênios, os quais passaram pelo processo de otimização descrito na seção anterior.

Uma vez que os dois *clusters* foram determinados, realizou-se a análise da contribuição energética de cada resíduo da interface. Esta análise se deu por meio de uma rotina chamada mutação por glicina (*glycine mutation*), na qual o resíduo a ser quantificado é substituído por uma glicina e a energia de interação do novo sistema calculada pela mesma metodologia PM6-D3H4X/COSMO. A perturbação gerada por esta mutação representa a uma perda ou ganho de

estabilidade correlacionada à presença do resíduo substituído. A contribuição energética do resíduo nativo x (CER_x) é obtida mediante mensuração das energias de interação referentes ao sistema original, Ei_n , e ao sistema que sofreu a mutação no resíduo x , Ei_x , de modo que seu valor é dado pela expressão:

$$CER_x = Ei_x - Ei_n$$

Este procedimento foi realizado em todos os resíduos da interface, mapeando-a por completo. Tal protocolo, além de fornecer informações importantes acerca das contribuições residuais individuais, também serve de validação para a fragmentação realizada anteriormente, pois se espera que as alterações observadas no sistema completo sejam percebidas no mesmo padrão e na mesma intensidade no *cluster*.

Por fim, calculou-se a contribuição dos resíduos para a energia de interação pela mesma técnica de mutação por glicina, utilizando um método mais robusto, SCC-DFTB3-D3H4X. A metodologia DFTB3 é a abordagem mais recente da rotina DFTB.⁴⁶ Ela não só incorpora termos de terceira ordem, como também os parâmetros de Slater-Koster 3OB, os quais, além de moléculas orgânicas, englobam halogênios e alguns metais alcalinos, alcalinos terrosos e de transição. Entretanto, a aplicabilidade de métodos DFTB pode ser limitada devido à subestimação das ligações de hidrogênio e à não representatividade dos efeitos de dispersão de London. Para superar tais limitações, Hobza *et al* transportaram as correções D3H4X desenvolvidas anteriormente para esta nova abordagem, dando origem a uma metodologia mais robusta.⁴⁷ Deste modo, objetiva-se corroborar os resultados obtidos pelo tratamento PM6-D3H4X/COSMO ao confrontá-los com aqueles gerados pela abordagem SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO. Nesta última metodologia, a solvatação foi estimada pelo mesmo método PM6 utilizado anteriormente.

Para avaliar a influência das moléculas de água da interface BTCl-tripsina, na estrutura preparada anteriormente foram adicionadas tais espécies oriundas da estrutura nativa (3RU4). O critério de adição foi a proximidade simultânea dos resíduos da interface do BTCl e da tripsina. Da cadeia do inibidor, as moléculas selecionadas foram as de número 102 e 230; da protease, 11, 261,

264, 360 e 436. Então, realizou-se um cálculo de energia por meio da metodologia PM6-D3H4X/COSMO, comparando-a com aquela obtida quando do sistema sem a presença explícita de água. Este estudo foi então concluído pela análise da influência destas moléculas nos resíduos da interface, através da utilização do mesmo procedimento de mutação por glicina e por intermédio da abordagem PM6-D3H4X/COSMO.

PARTE IV

Resultados e Discussão

SEÇÃO A

Experimentos *in vitro*

1 Obtenção do BTCl livre e nanoestruturado

1.1 Pureza e caracterização do BTCl

A purificação do BTCl foi realizada por cromatografia de troca iônica, uma técnica baseada na formação de interações eletrostáticas entre a amostra e a matriz cromatográfica.¹¹⁵ Por meio dela, diversos tipos de compostos podem ser isolados, desde pequenos peptídeos até macromoléculas.¹¹⁶

O perfil cromatográfico, obtido a partir da absorbância do conteúdo que se desprendia da coluna, está apresentado na figura 8. O último pico representa a parcela correspondente ao BTCl. O produto foi coletado a partir do ponto de máxima absorbância até o término da curva, correspondendo à fração cromatográfica de maior pureza.

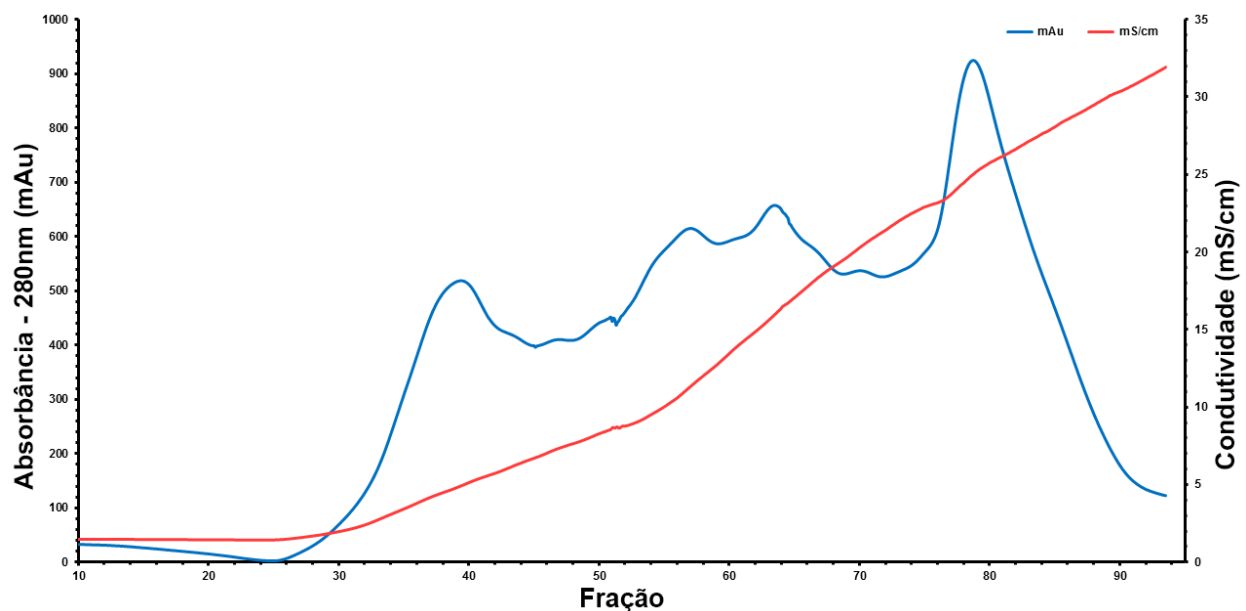


Figura 8. Perfil cromatográfico da purificação do BTCl por troca iônica. Em azul tem-se o espectro de absorbância do conteúdo que elui da coluna; em vermelho, a condutividade. Ambas curvas foram geradas concomitantemente e em tempo real. O pico correspondente ao BTCl está em aproximadamente 900 mAu

Conforme a força iônica do eluente aumenta, mais espécies são desligadas da coluna. O pico de maior intensidade corresponde ao BTCl.

Para retirar o conteúdo salino decorrente da passagem do eluente, procedeu-se à cromatografia por exclusão molecular. O perfil cromatográfico obtido é apresentado na figura 9.

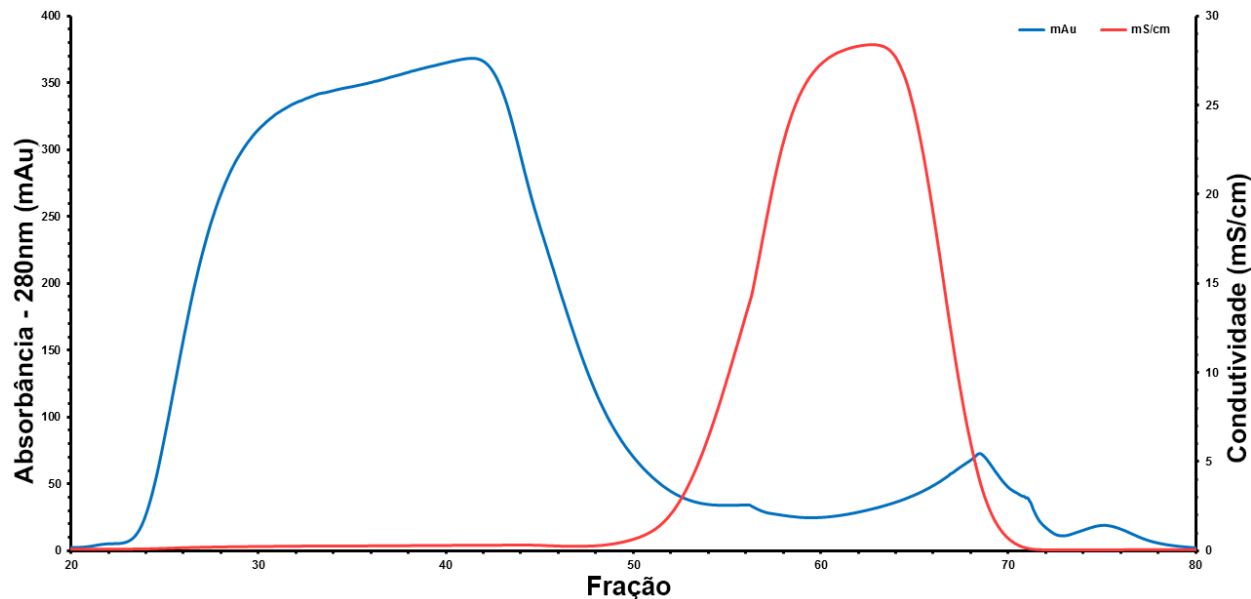


Figura 9. Perfil cromatográfico de separação do BTCl do NaCl por exclusão molecular. Em azul tem-se o espectro de absorvância do conteúdo que elui da coluna; em vermelho, a condutividade. Ambas curvas foram geradas concomitantemente e em tempo real

Na curva de absorvância, em azul, distinguem-se claramente dois picos. O primeiro, entre as frações 27 e 50, corresponde ao BTCl; o segundo, na porção final do gráfico, ao NaCl. A coleta do produto de interesse foi realizada desde o início do primeiro pico até a fração 50, maximizando a relação entre a quantidade BTCl e a exclusão de sal. Nota-se que, a partir desta fração, a condutividade (curva em vermelho) passa a aumentar consideravelmente. Qualquer coleta a partir desta fração acarretaria em uma maior quantidade de sais no produto final.

Posteriormente à liofilização, uma alíquota do produto final, gerado na forma de um fino pó branco, foi submetido à análise por meio da espectrometria de massa MALDI-TOF (figura 10). Este experimento visou analisar a pureza da amostra obtida e caracterizar o BTCl em termos de sua massa molecular.

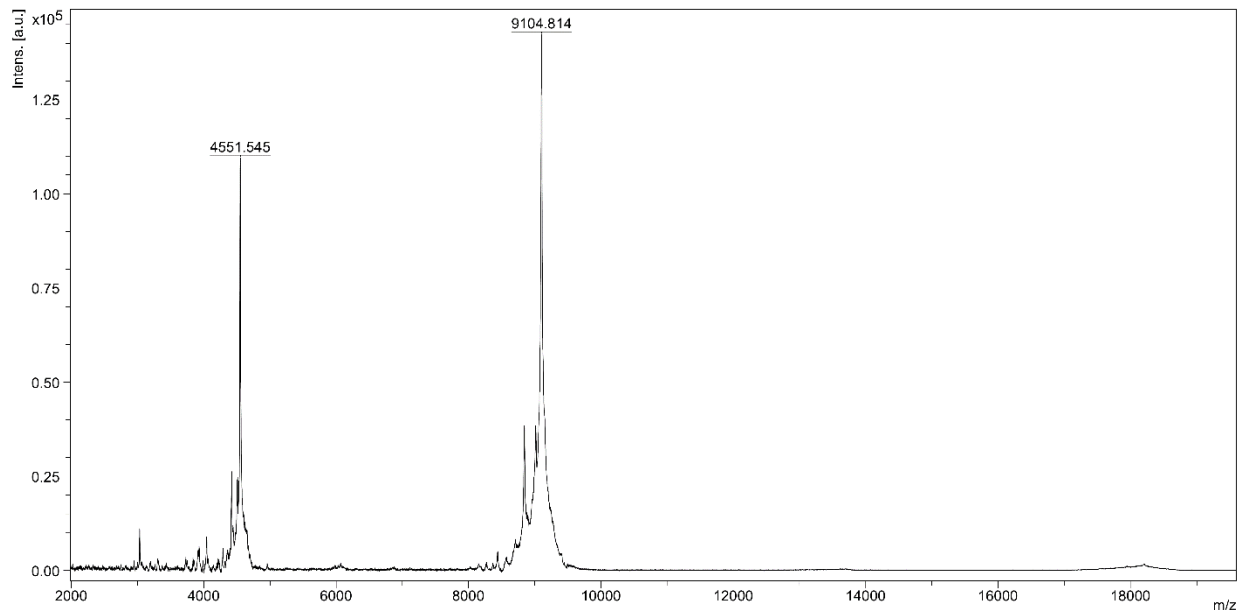


Figura 10. Análise de pureza do BTCl por espectrometria de massa MALDI-TOF. O pico referente ao BTCl é o de 9104,814 Da; o outro, de 4551,545 Da, é de seu equivalente com dupla carga

Pela figura 10 pode-se observar a ocorrência do BTCl no pico referente às moléculas de 9104,814 Da, bem como seu equivalente de dupla carga (4551,545 Da). Desta forma, conclui-se que o processo de purificação do BTCl foi realizado com êxito.

1.2 Produção e caracterização das nanocápsulas contendo BTCl

O aspecto físico do sistema obtido por meio do método de nanoencapsulamento era o de uma solução heterogênea contendo duas fases, sendo uma líquida e outra formada por um precipitado. Quando agitado, este precipitado se dissolvia; mas, em repouso, se acumulava no fundo do frasco novamente. Na fase líquida foram observadas partículas sólidas dispersas, provavelmente compostas por parte do BTCl não solubilizado. Além disso, durante o próprio processo de solubilização, formou-se uma quantidade excessiva de espuma, a qual também se fez presente no sistema final. Estes dois fatores combinados apontam para uma perda de rendimento durante as etapas de produção, tornando a quantificação dificultosa e inviabilizando ensaios posteriores.

Para contornar estes problemas, algumas condições experimentais foram alteradas. A primeira delas foi reduzir a quantidade de reagentes, alterando as proporções adotadas. Além disso, ao invés de dissolver o BTCl na solução de quitosana, solubilizou-se em água. Deste modo, o protocolo seguido partiu da adição de 10 mg de BTCl à 1,111 mL de água tipo I, sendo esta solução sonicada por 10 minutos. Posteriormente, 1,388 mg de quitosana foram adicionados. Concomitantemente, preparou-se uma solução de TPP a partir de 10 mg deste reagente adicionados a 10 mL de água tipo 1. Logo após, 0,277 mL deste recém preparado foram gotejados, sob agitação, à solução contendo BTCl (a agitação foi mantida por 10 minutos). Por fim, foram adicionados 13,6 mg de PEG2000.

Em relação às nanocápsulas produzidas por este protocolo modificado, o aspecto físico foi mais homogêneo. As partículas antes dispersas não foram detectadas, apontando para uma melhor solubilização do BTCl. Contudo, também foi observada a formação de precipitado.

Uma outra tentativa foi realizada objetivando a obtenção de um sistema homogêneo. Nela, o ultimo protocolo foi alterado, utilizando 3,33 mg de BTCl e de 0,694 mg de quitosana. O resultado obtido foi o melhor dentre todas as condições experimentais avaliadas: constatou-se a formação de um sistema homogêneo razoavelmente opaco – mas não decorrente de partículas sólidas não solubilizadas, e sim como consequência da formação de nanocápsulas contendo BTCl.

A partir dos resultados obtidos, importantes conclusões puderam ser traçadas. No primeiro sistema formulado, a concentração final de BTCl foi de 7,2 mg/mL, sendo a proporção entre quitosana e TPP 2,5:1. De início, imaginou-se que a formação de precipitado se deu em decorrência da baixa quantidade de quitosana em relação ao TPP, dado que, na literatura, experimentos mostram uma proporção exitosa de 4:1.^{118,122} A partir daí, para a mesma concentração de BTCl, as condições experimentais foram modificadas de modo que esta razão fosse de 5:1. Entretanto, provou-se que a obtenção de um sistema heterogêneo não apresentava correlação pronunciada em relação à esta proporção. Assim sendo, para a última formulação foi adotada novamente a razão de 2,5:1 e a concentração de 2,4 mg/mL de BTCl. Deste modo, obteve-se uma solução homogênea.

Em seguida, as nanopartículas foram caracterizadas por meio do espalhamento de luz dinâmico (tabela 8).

Tabela 6. Análise de DLS para as nanopartículas vazias e com BTCl

	<i>Nanopartícula vazia</i>	<i>Nanopartícula c/ BTCl</i>
Z-average (nm)	435	301
Média em número (nm)	61	71
Polidispersividade (Pdl)	0,690	0,573
Potencial Zeta (mV)	33,4	28,6

Esses resultados indicaram que as nanopartículas contendo BTCl tendem ser menores que as vazias. Além disso, o tamanho médio está condizente com a literatura.¹²³ Tanto o índice de polidispersividade (Pdl) quanto o potencial zeta revelaram igual conformidade, a qual não oferece restrição à posteriores ensaios em culturas de células.

2 Ensaios *in vitro*

2.1 Viabilidade celular mediante tratamento com BTCl nanoencapsulado

A viabilidade das células MCF-7 tratadas com BTCl nanoencapsulado foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT, aferindo a absorbância em 570 nm. Os resultados desta análise, realizada em triplicata, são apresentados na figura 11.

Com base nos resultados obtidos, percebe-se que todas as formulações, exceto a de controle, apresentaram efeitos na viabilidade celular. Nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , foram mortas 13, 5, 19 e 26% das células, respectivamente. Chama atenção a dosagem de 100 μM ser menos ativa que a de 50 μM .

Os ensaios de Joanitti *et al* e os de Mehdad *et al*^{14,15} indicaram que praticamente não há inibição da viabilidade celular mediante aplicação de BTCl

na concentração de 100 μM . À exclusão de possíveis erros técnicos, o ponto discrepante não é o de 100 μM , e sim o de 50 μM , o qual apresentou uma toxicidade duas vezes maior em relação aquelas descritas nos dois trabalhos anteriores.

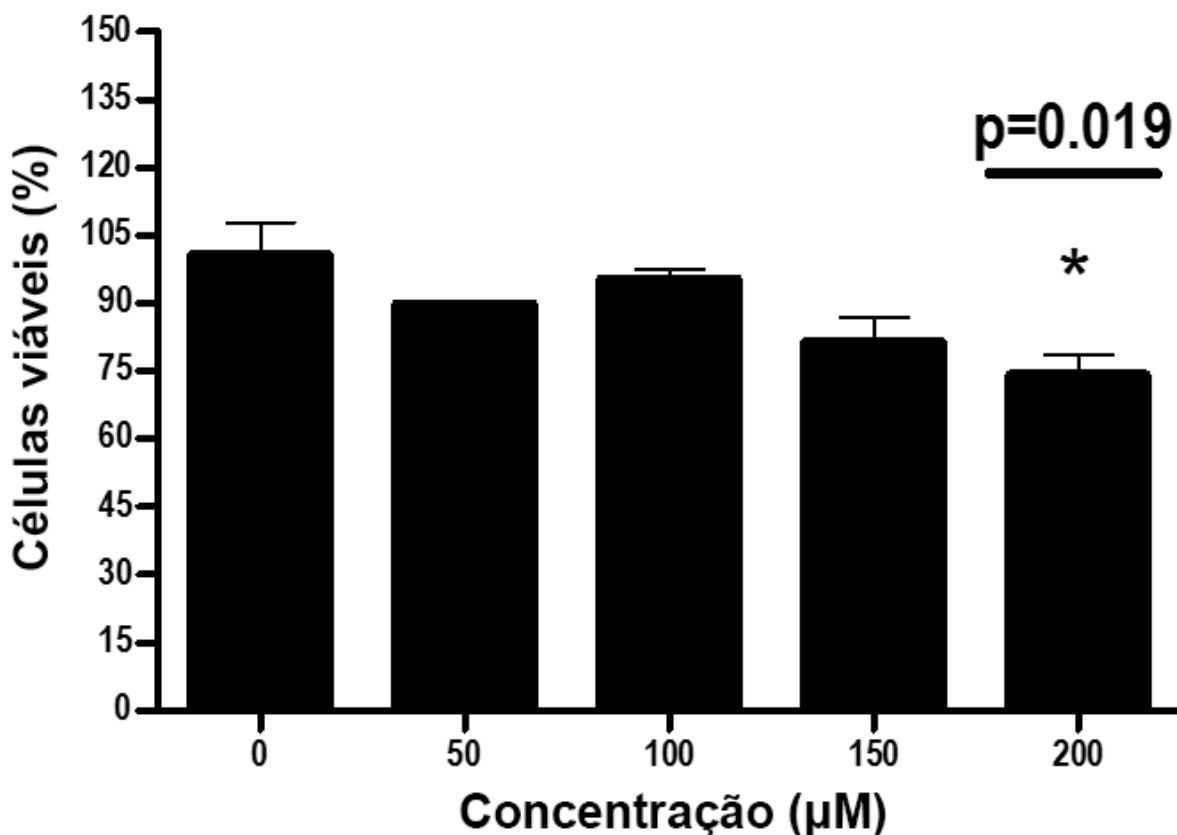


Figura 11. Ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT

Em relação ao ponto de 150 μM , os experimentos de Mehdad *et al* revelaram que, para tal dosagem, aproximadamente 15% das células anteriormente funcionais foram mortas.¹⁴ Aqui, mediante o processo de nanoencapsulamento, esta taxa aumentou 26%. A biodisponibilidade do BTCI pode ser um dos fatores responsáveis por este incremento.

Por fim, para 200 μM , os experimentos de Joanitti e Mehdad *et al* mostraram uma perda de viabilidade em 50% e 32% das células cultivadas, respectivamente.^{14,15} Esta divergência pode ser explicada pelas diferentes

fontes de obtenção das linhagens celulares, ou por alguma modificação no protocolo utilizado.

No tratamento das células com BTCl nanoencapsulado nesta mesma concentração, a taxa de morte celular foi menor em relação a ambos trabalhos.

Um dos fatores que pode estar relacionado a esta mudança no ponto de maior concentração é uma característica advinda do método de gelificação iônica. Nela, os índices de polidispersividade frequentemente são maiores que 0,1, e não raramente ultrapassam 0,5.^{124,125} Para esta observável, o valor obtido neste trabalho foi de aproximadamente 0,7. O efeito de um índice desta magnitude é a ocorrência de nanocápsulas cujas dimensões não são homogêneas. Com isso, a concentração de BTCl dentro de cada estrutura pode ser diferente.¹¹⁸ Dessarte, quanto maiores as concentrações, maiores poderão ser as discrepâncias entre o conteúdo teórico e o realmente utilizado no processo inibitório.

Além disso, partículas cujas dimensões são irregulares não interagem com estruturas biológicas tão facilmente quanto aquelas mais homogêneas.¹¹⁸ Em concentrações de até 150 μM , tal efeito pode não ser tão pronunciado. Todavia, conforme a dose é aumentada, pode haver uma saturação de nanocápsulas ao redor da parede celular devido a um grau de empacotamento pouco eficaz, de modo que uma grande parte das macromoléculas aplicadas não esteja de fato em contato com esta membrana.

Possíveis rotas a serem seguidas a partir daqui podem envolver a otimização do protocolo utilizado no processo de gelificação iônica. Um dos fatores a ser avaliado é a proporção entre quitosana e TPP. Durante as tentativas de nanoestruturação, notou-se que esta relação não afeta drasticamente o que se observa de modo macroscópico. Com isso, foi utilizada uma razão de 2,5:1. Todavia, há na literatura relatos de uma proporção 4:1 que produziu recorrentemente estruturas com elevado grau de homogeneidade.^{118,122} Desse modo, esta proporção pode estar relacionada com a similitude dos produtos formados. Adicionalmente, a força iônica que dirige o processo também foi alterada - o que pode ter contribuído para as discrepâncias observadas.

Uma outra possibilidade para otimização do encapsulamento do BTCl é a adoção de outro protocolo de produção dessas nanocápsulas, objetivando a

obtenção partículas menores e com alta taxa de encapsulamento. Uma destas metodologias é o eletrospray. Nesta técnica, a solução contendo o princípio ativo e o carreador polimérico é gotejada verticalmente de uma seringa para um coletor. Ao deixar a seringa, as gotas se desfazem devido a aplicação de um campo elétrico, o qual, provocando alterações na tensão superficial das partículas, gera um jato de espécies carregadas. Estas, por sua vez, ao se repelirem eletrostaticamente, se dispersam na forma de um spray, sendo coletadas em um recipiente aterrado.¹²⁶ Uma das vantagens deste método é a facilidade de obtenção de nanoestruturas isoladas, uma vez que o solvente é evaporado ao decorrer do processo. Além disso, devido ao alto grau de controle dos parâmetros experimentais, as partículas geradas exibem elevada homogeneidade, sendo elas produzidas mediante uma alta taxa de encapsulamento.¹²⁷ Outrossim, as propriedades das partículas produzidas podem ser manipuladas de modo a se adequarem ao sistema de interesse.

SEÇÃO B

Experimentos *in silico*

3 Análise *in silico*

Existem duas estruturas referentes ao BTCI depositadas no banco de dados PDB. A primeira delas, 2G81, é formada pelo complexo BTCI-tripsina; a segunda, 3RU4, pelo sistema quimotripsina-BTCI-tripsina. Enquanto esta foi resolvida em uma resolução de 1,68 Å, aquela foi em 1,55 Å. Muito embora a resolução seja um parâmetro fundamental para avaliar qualidade de uma estrutura – a qual está diretamente relacionada com os resultados a serem obtidos *in silico* –, o sistema 3RU4 foi adotado como ponto de partida para os cálculos vindouros devido ao fato de o BTCI já estar complexado com as duas serinoproteases por ele inibidas. Pressupõe-se que esta configuração tende a ser mais fidedigna à disposição adotada pelo BTCI quando de sua complexação com as proteases tripsina e quimotripsina. Ademais, tomando como base o complexo ternário, o BTCI pode ser correlacionado entre os subsistemas a serem gerados. Não obstante, a diferença entre as resoluções não é grande o suficiente a ponto de comprometer a qualidade dos resultados futuros.

Sobre a rotina computacional utilizada, o método PM6-D3H4X foi desenvolvido por Hobza *et al* e representa uma melhoria da abordagem PM6-D3H4, a qual foi construída com o intuito de corrigir a rotina PM6-DH2, tendo como referencial a metodologia MP2/aug-cc-pVDZ. Todavia, o tratamento PM6-D3H4 não é exato ao reproduzir os efeitos de dispersão. Com isso, Hobza *et al*, partindo de resultados mais precisos advindos do método CCSD(T)/CBS, criaram um novo funcional a partir de outra reparametrização, batizando-o de PM6-D3H4X. Esta nova metodologia, além de melhorar a representatividade dos efeitos de dispersão, também fornece melhores descrições para ligações de hidrogênio e ligações envolvendo halogênios.⁴³⁻⁴⁵

A respeito das conformações das cadeias laterais, analisadas por meio do servidor *MOLPROBITY*, alguns resíduos não puderam ser determinados assertivamente. Nestes casos, efetuou-se uma análise visual de cada um dos resíduos, buscando maximizar o estabelecimento de interações intra e intermoleculares. Em relação à estrutura original, os seguintes resíduos sofreram alterações conformacionais em suas cadeias laterais: Asn⁶⁵ do BTCI em ambos os sistemas; Asn⁴⁶, Gln⁴⁸, Gln⁶², Asn⁷¹, Asn⁷⁶, Asn⁹⁸, Asn¹⁵⁰, Gln¹⁷⁰,

Gln¹⁸⁹, Gln²⁰³ e Gln²¹⁴ da quimotripsina; assim como Asn⁴⁶⁽⁴⁸⁾, Gln⁴⁸⁽⁵⁰⁾, Gln⁶²⁽⁶⁴⁾, Asn⁷¹⁽⁷⁴⁾, Asn⁷⁶⁽⁷⁹⁾, Asn⁹⁸⁽¹⁰¹⁾, Gln¹⁷⁰⁽¹⁷⁵⁾, Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾, Gln²⁰³⁽²¹⁰⁾ e Gln²¹⁴⁽²²¹⁾ da tripsina.* Logo após, por meio desta mesma análise visual, determinou-se o estado de protonação na histidina. Deste modo, foram modificados os seguintes resíduos: His⁴³ para Hie⁴³ no BTCl em ambos sistemas; His⁵⁷ para Hid⁵⁷ e His⁴⁰ para Hie⁴⁰ na quimotripsina; da mesma forma que a His³⁸⁽⁴⁰⁾ para Hie³⁸⁽⁴⁰⁾, His⁵⁵⁽⁵⁷⁾ para Hid⁵⁵⁽⁵⁷⁾ e His⁸⁸⁽⁹¹⁾ para Hie⁸⁸⁽⁹¹⁾ na tripsina. *Hid* e *Hie* são duas denominações dos resíduos de histidina. A nomenclatura indica as diferentes conformações da cadeia lateral. A forma *Hid* está protonada no nitrogênio $\delta 1$ (o mais próximo da cadeia principal) e a *Hie* no nitrogênio $\epsilon 2$.

3.1 Curva de fragmentação do sistema BTCl-quimotripsina

Na curva de fragmentação (figura 12), a notação utilizada foi o raio em relação à interface. Assim, a partir do ponto *r1*, correspondente à interface, o ponto *r2* denota um raio de adição de 2 Å desde a interface, o ponto *r3* um raio de 3 Å e assim sucessivamente.

Os dois extremos da curva de fragmentação denotam a interface BTCl-quimotripsina e o sistema enzima-inibidor completo. Energeticamente, estes dois pontos estão separados por uma diferença de 4,41 kcal.mol⁻¹. Isto mostra que a interface representa, em termos energéticos, aproximadamente 93% do sistema completo. A diferença entre o número de átomos destes dois sistemas é de 3457, correspondendo a uma redução de tamanho de quase 80%, o que pode resultar em um ganho de tempo computacional para os cálculos de análise a serem realizados.

Entretanto, considerar a estrutura constituída por 846 átomos (*r1*) como ponto de partida pode gerar uma perda de representatividade já no início das simulações computacionais. Esta perda advém das interações de pequena magnitude energética. Isto pode ser crítico para bem representar o sistema enzima-inibidor em questão, dado que, no BTCl, é importante a influência de

* A estrutura cristalográfica adotada como ponto de partida para os cálculos aqui realizados (PDB 3RU4) adota uma numeração diferente para os resíduos da tripsina. Daqui por diante, a numeração desta estrutura será adotada, sendo representada a notação padrão entre parênteses. Deste modo, a Gln¹⁷⁵ se torna Gln¹⁷⁰⁽¹⁷⁵⁾.

interações não covalentes – as quais, mesmo não adquirindo proeminente grandeza energética, são essenciais para descrever todas as interações que ocorrem neste inibidor. Um exemplo disso é caso da estabilização oriunda da adoção de uma conformação do tipo *T-shape* nos resíduos aromáticos Phe⁶⁷, Tyr⁶⁹ e His⁴³, (não presentes na estrutura r1), responsáveis pelo processo de oligomerização do BTCl.

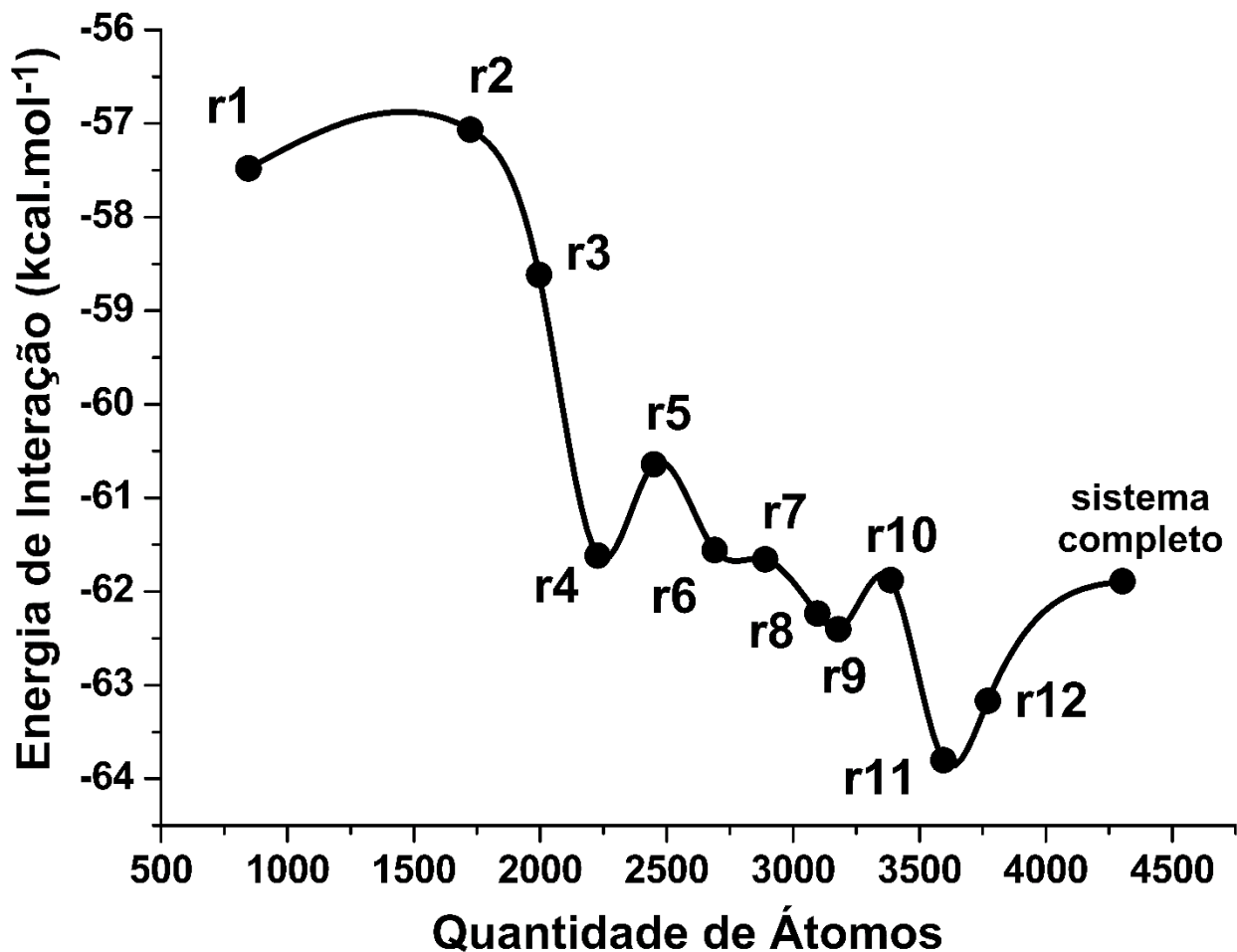


Figura 12. Curva de fragmentação BTCl-quimotripsina

Estando a energia referente ao sistema completo enzima-inibidor abaixo da energia da interface, infere-se que a perda de representatividade se dá pela falta de descrição das interações atrativas, responsáveis por minimizar a energia do complexo. Sendo assim, visando a maximização da quantidade de interações descritas, é necessário escolher uma outra estrutura de partida.

Por meio da análise da curva de fragmentação do sistema BTCl- quimotripsina, pode-se notar que o ponto *r4* é uma estrutura que melhor representa as interações intermoleculares contidas no sistema completo. Este ponto inclui, além dos resíduos da interface, resíduos do sistema nativo contidos em um raio de 4 Å ao redor desta mesma interface.

Ao se comparar a energia de tal estrutura com a do complexo original, a diferença foi de apenas 0,27 kcal.mol⁻¹. Sendo assim, é possível afirmar que, em termos energéticos, estes dois sistemas são praticamente indiferenciáveis. Mediante o processo de fragmentação, a adoção da estrutura 4 não acarretará na perda de contribuições energeticamente relevantes. Além disso, mesmo sendo cerca de 150% maior que a interface, constata-se uma diminuição de aproximadamente 50% em relação ao tamanho do sistema completo (figura 13). Deste modo, os ganhos em termos energéticos e computacionais são favoráveis para a adoção da estrutura relativa ao ponto 4 como partida para as simulações posteriores.

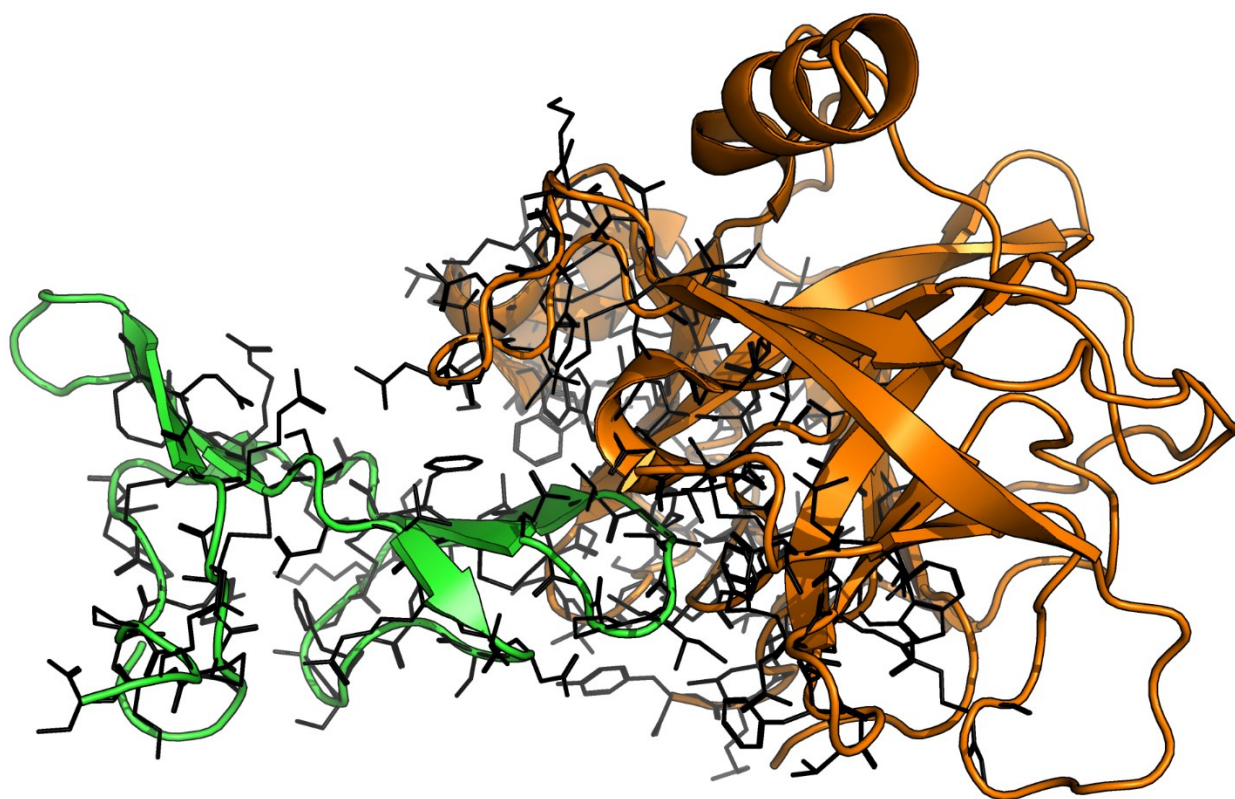


Figura 13. Representação estrutural do cluster escolhido, em linhas pretas, comparado com o sistema nativo colorido (em verde o BTCl e em laranja a quimotripsina)

Entre os pontos 1 e 2 da curva de fragmentação, é difícil distinguir energeticamente as respectivas estruturas, haja vista que a diferença entre elas é de somente 0,41 kcal mol⁻¹. Isso poderia indicar que tais sistemas são estruturalmente semelhantes. Entretanto, o que se observa é justamente o oposto, dado que o *cluster* r2 possui 877 átomos a mais. Portanto, é possível afirmar que os resíduos contidos a 2 Å da interface não colaboram de forma significativa para a representação das interações intermoleculares.

Por outro lado, a diferença energética entre os pontos 2 e 4 é mais pronunciada (4,55 kcal.mol⁻¹). Pode-se inferir que isso é decorrência dos resíduos contidos a partir de 2 Å da interface até um raio de 4 Å, tendo em vista que, como mencionado anteriormente, o primeiro raio de átomos adicionados praticamente não alterou a energia de interação. É importante notar que esta disparidade energética é extremamente próxima daquela existente entre a interface e o sistema completo. Por este motivo, é plausível atribuir também a esses resíduos parte desta dissemelhança.

3.2 Cluster BTCl-quimotripsina versus sistema completo

Uma vez que o sistema que melhor representa as interações foi determinado, procedeu-se à análise dos resíduos mais colaborativos para a interação BTCl-quimotripsina. A este fim, realizaram-se mutações por glicina em todos os resíduos da interface. Em um primeiro momento, objetivou-se comparar os efeitos de tais mutações no sistema nativo e no *cluster*.

Historicamente, tanto de modo experimental quanto em simulações computacionais, são utilizadas mutações por alanina para analisar a contribuição energética de cada resíduo para uma dada interação. Todavia, aqui optou-se pela glicina, uma vez que todos os átomos da cadeia lateral, após o carbono beta, são removidos sem acarretar na aquisição de um maior grau de liberdade conformacional.⁷⁹ Além disso, ela é o menor dos aminoácidos, evitando a introdução de perturbações decorrentes do estabelecimento de novas interações intra e intermoleculares, bem como de possíveis tensões estéricas. Uma vez que as simulações computacionais deste trabalho não envolvem a

otimização estrutural dos sistemas – ou seja, em nenhum cálculo foi conferida flexibilidade aos átomos pesados -, a possível adição de um maior grau de liberdade não traz efeitos que poderiam ser refletidos nas energias de interação calculadas.

Os dados apresentados na figura 14 permitem uma comparação entre o *cluster* e o sistema nativo do BTCl. Há dois tipos de tendências majoritárias. A substituição por glicina acarretou, nos dois, uma perda significativa de energia de interação - o que ocorreu em 11 dos 16 resíduos do sistema fragmentado e em 12 do nativo. Este comportamento indica que tais resíduos são muito importantes para o processo de inibição ao estabelecer interações que estabilizam a interface entre as duas proteínas. Deste modo, a ausência deles - e o conseqüente não estabelecimento destas interações - é refletida na perda de energia.

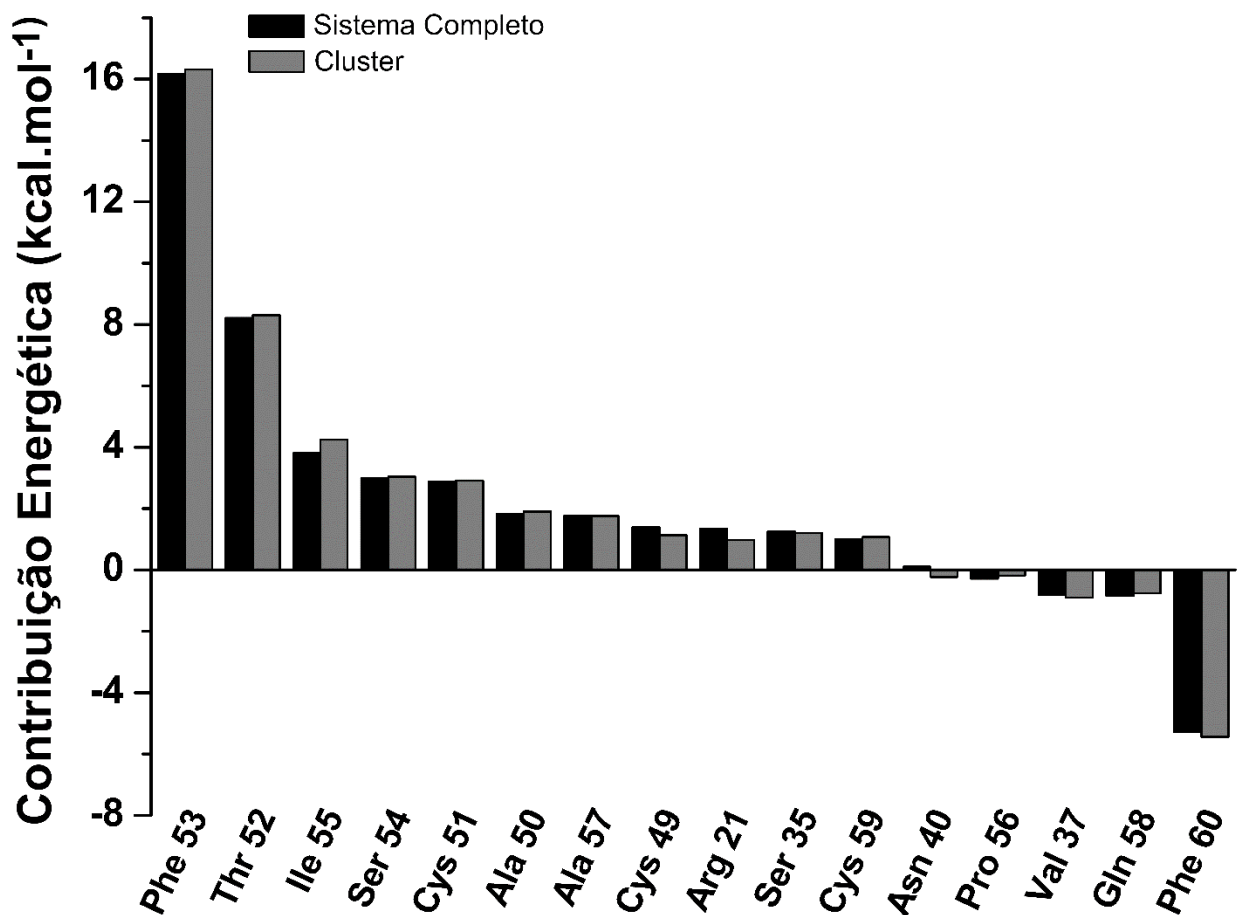


Figura 14. Contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCl relativos ao sistema completo (em preto) e ao cluster r4 (em cinza) para a interface BTCl-quimotripsina utilizando o método PM6-D3H4X/COSMO

A mutação realizada nos resíduos restantes aumentou a energia de interação. Por consequência, tem-se que a presença destes resíduos desfavorece a interação BTCl-quimotripsina. Isto se dá de maneira mais pronunciada para a Phe⁶⁰.

De acordo com a figura 14, percebe-se que o *cluster* escolhido no processo de fragmentação está bem correlacionado com o sistema original. Desde o resíduo que mais estabiliza a interface (Phe⁵³) até a Ala⁵⁷, as duas séries apresentam valores muito próximos. A discrepância máxima desta região é de 11% - para a Ile⁵⁵ -, sendo que para todos os outros resíduos essa disparidade foi no máximo da ordem de 4%, indicando que o *cluster* escolhido de fato traduz as interações do sistema como um todo.

É importante notar que existiram pontos onde estes valores foram muito altos, como é o caso da Asn⁴⁰, onde a divergência foi da ordem de 317%. Contudo, os pontos que aparentemente não se correlacionam são localizados em uma região onde a mutação por glicina não acarretou mudanças significativas na energia de interação. Deste modo, uma grande variação percentual não representa necessariamente uma discrepância entre os sistemas.

Em relação aos resíduos da quimotripsina que foram mutados por glicina, apresentados na figura 15, o mesmo padrão energético do gráfico anterior foi obtido. Percebem-se duas regiões bem segmentadas no gráfico. Na maior delas, após a substituição, ocorreu uma perda de energia de interação. Este comportamento foi observado em 26 dos 34 resíduos modificados da proteína nativa e em 24 do sistema fragmentado.

A magnitude desta perda em termos energéticos absolutos, relacionada a cada resíduo, foi ligeiramente menor do que o observado na curva anterior. Para o BTCl, o de maior contribuição (Phe⁵³) apresenta uma perda energética próxima de 16,00 kcal.mol⁻¹; já para a quimotripsina, cerca de 12,00 kcal.mol⁻¹ (His⁵⁷). Ademais, a média das perdas energéticas por resíduo também segue esta tendência. Para a quimotripsina, este valor foi de 1,50 kcal.mol⁻¹, enquanto para o BTCl a quantidade estimada foi aproximadamente o dobro. Por conseguinte, pode-se inferir que, para a energia de interação, os resíduos do inibidor contribuem mais intensamente que os da protease.

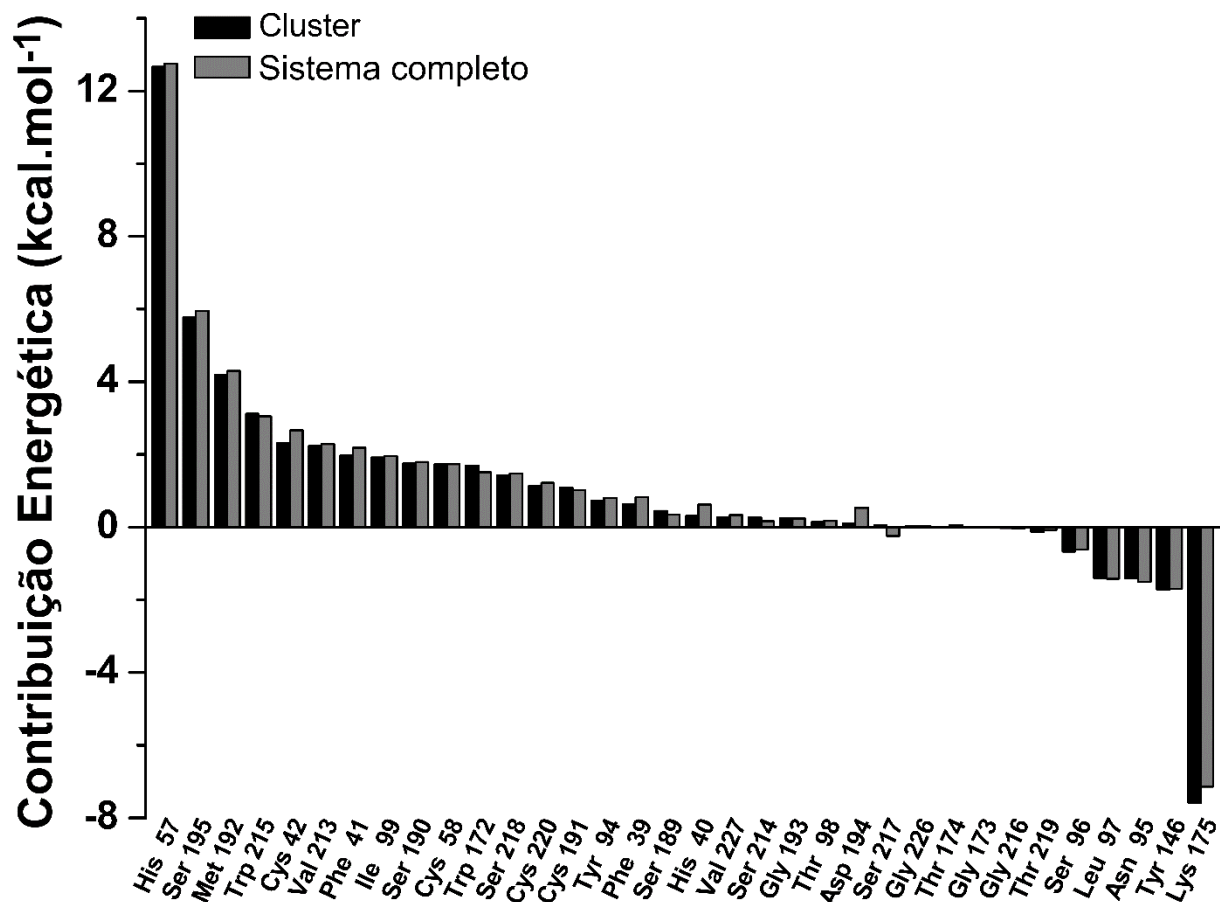


Figura 15. Contribuições para a energia de interação dos resíduos da quimotripsina relativos ao sistema completo (em cinza) e ao cluster r4 (em preto) para a interface BTCI-quimotripsina utilizando o método PM6-D3H4X/COSMO

O perfil observado na outra parte do gráfico revelou o mesmo padrão obtido anteriormente para o BTCI. A mutação dos 6 últimos resíduos aumenta a energia de interação. Dessa maneira, pode-se dizer que a presença de tais resíduos desfavorece a formação do complexo enzima-inibidor.

Para os 15 primeiros resíduos que sofreram mutação, houve uma convergência entre *cluster* e o sistema nativo. Desde a His⁵⁷ até a Tyr⁹⁴, o desvio máximo, nas contribuições energéticas, entre estas duas estruturas foi de aproximadamente 15%, sendo que a média dessas diferenças foi cerca de 5%. Com isso, conclui-se que, para as interações que ocorrem na interface, o *cluster* é análogo ao sistema completo.

A máxima discrepância observada entre os dois sistemas é relativa à mutação do resíduo Thr¹⁷⁴. Assim como o que ocorre no BTCI, este ponto está localizado em uma região onde são praticamente nulos os efeitos energéticos

das mutações. Desta forma, também aqui não há comprometimento em relação adoção do sistema fragmentado.

3.3 Cálculo SCC-DFTB3-D3H4X para o *cluster* BTCl-quimotripsina

O mesmo procedimento de substituição por glicina realizado nas etapas anteriores foi utilizado na análise pelo método SCC-DFTB3-D3H4X, fazendo uso da estrutura obtida por meio do processo de fragmentação. Os resultados são apresentados na figura 16, comparando-os com aqueles oriundos da metodologia PM6-D3H4X.

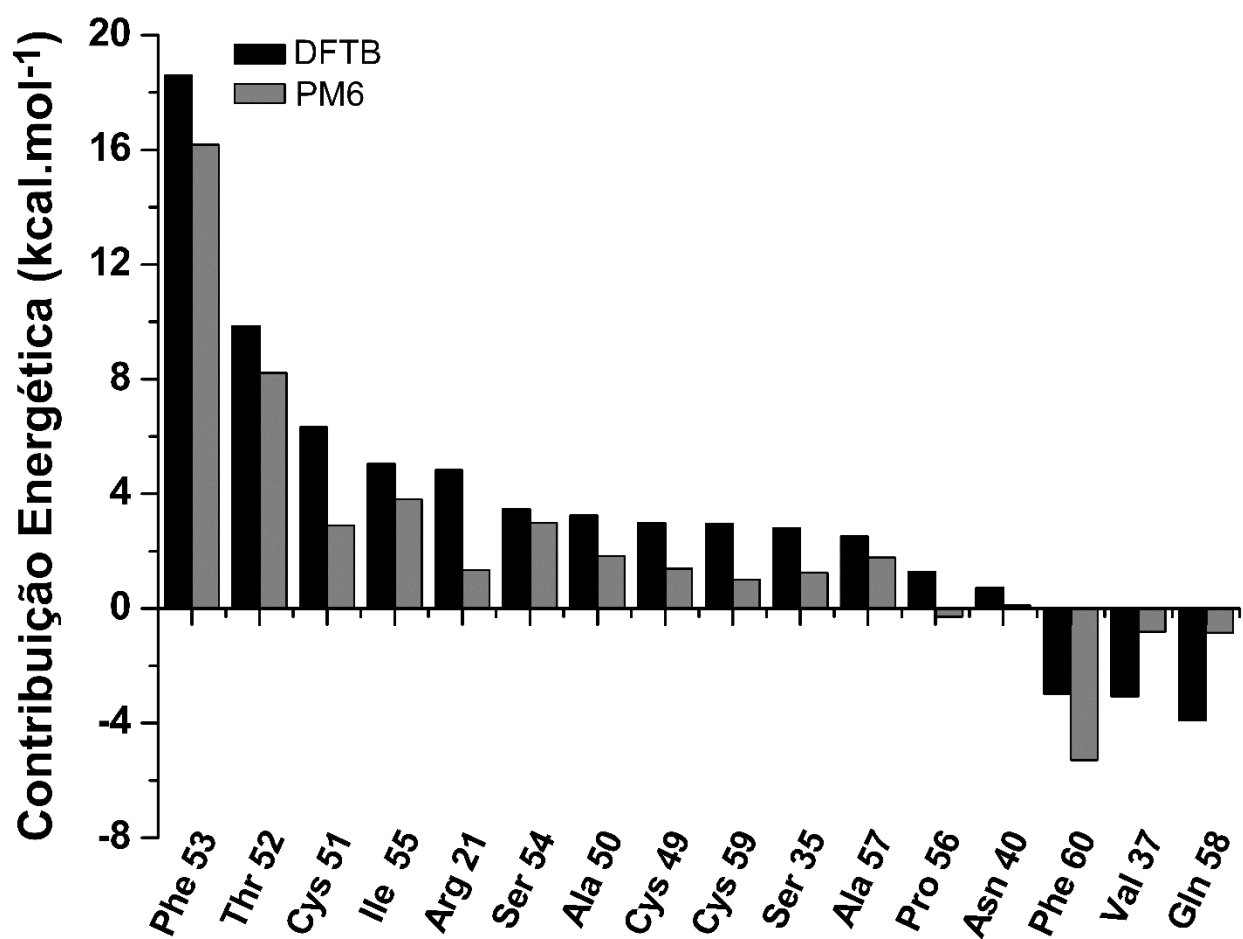


Figura 16. Contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCl relativos cluster r4 pelas metodologias PM6-D3H4X/COSMO (em cinza) e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO (em preto)

Ambos métodos apontaram para a existência de duas regiões distintas com tendências opostas. Na primeira parte do gráfico, a metodologia SCC-DFTB3-D3H4X identificou 13 resíduos que, quando mutados, ocasionaram na perda de energia de interação, indicando que são importantes para o processo inibitório. Os cinco primeiros mais importantes foram: Phe⁵³, Thr⁵², Cys⁵¹, Ile⁵⁵ e Cys⁴⁹. Sequência similar foi a encontrada para o sistema nativo: Phe⁵³, Thr⁵², Ile⁵⁵, Ser⁵⁴ e Cys⁵¹. Percebe-se que há uma concordância não somente entre os resíduos mais colaborativos, como também naqueles em que a energia de interação não foi de elevada magnitude.

Por outro lado, na seção final do gráfico, dos 16 resíduos mutados, 3 geraram um aumento da energia de interação. A presença destes resíduos pode ser responsável pelo estabelecimento de interações repulsivas que desestabilizam a interface entre o BTCL e a quimotripsina. Aqui, houve uma concordância entre as duas estruturas e as duas metodologias, pois os resíduos que mais causam desordem nesta região foram a Phe⁶⁰, Gln⁵⁸ e Val³⁷ em ambos cálculos.

Os dois pontos de maior contribuição para a interação, Phe⁵³ e Thr⁵², exibiram energias próximas, sendo a diferença entre as metodologias de 13,86% e 18,64%, respectivamente. Todavia, também foram constatadas discrepâncias da ordem de 100% em outros resíduos. Neste sentido, é importante salientar que as diferenças se deram somente pela magnitude das energias calculadas, sendo confluyente a tendência geral de ambas metodologias, de modo a não interferir na determinação dos resíduos mais colaborativos. Entretanto, é importante ressaltar que, na parte repulsiva da curva, as discrepâncias foram maiores, exibindo uma média de 225% contra 49% da parte atrativa (valores obtidos entre os três pontos mais energéticos de cada região).

Os dados referentes a quimotripsina (figura 17) exibiram um comportamento similar ao do BTCL. Também aqui se observou a distribuição dos pontos em duas regiões distintas, sendo a atrativa consideravelmente maior. Nela, os cinco resíduos mais importantes para a estabilização da interface são exatamente os mesmos, tanto para o sistema nativo avaliado pela metodologia PM6-D3H4X quanto para o fragmentado calculado pela rotina SCC-DFTB3-D3H4X: His⁵⁷, Ser¹⁹⁵, Met¹⁹², Trp²¹⁵ e Cys⁴².

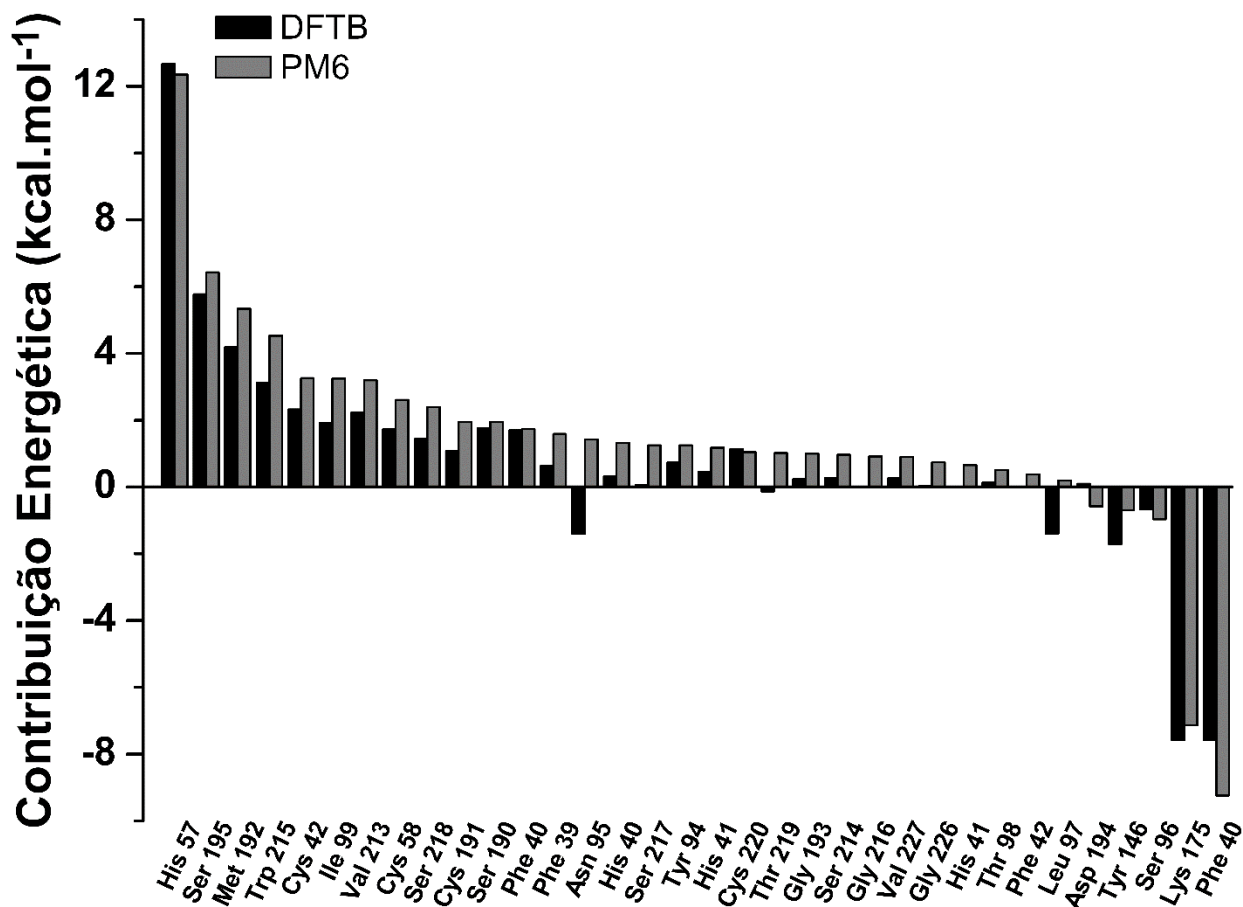


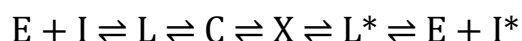
Figura 17. Contribuições para a energia de interação dos resíduos da quimotripsina relativos cluster r4 pelas metodologias PM6-D3H4X/COSMO (em cinza) e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO (em preto)

Há de se salientar que, assim como no BTCI (gráfico 16), a discrepância energética também foi maior na parte repulsiva quando comparada com a atrativa- 13,84% para esta e 42,10% para aquela (valores obtidos entre os três pontos mais energéticos de cada região).

De um modo geral, as energias obtidas, em módulo, foram maiores nos cálculos com a metodologia DFTB3-D3H4X. Contudo, o perfil de ambas as séries de dados é semelhante, principalmente na parte atrativa. Sendo assim, pode-se afirmar que não há prejuízo na determinação dos resíduos mais importantes.

3.4 Análise mecanística da interface BTCl-quimotripsina

O mecanismo pelo qual ocorre a interação entre um inibidor e a enzima a ser inibida pode ser descrito como um equilíbrio químico entre as diversas espécies que são geradas neste processo. De um modo geral, tais reações são similares àquelas onde o papel da enzima é auxiliar a clivagem de uma dada ligação peptídica, sendo diferenciadas pelo grau de modificação sofrido pelo inibidor. Em suma, adotam o seguinte comportamento:



em que E é a enzima, I o inibidor, L o complexo não covalente (ainda não ligado e instável), C o complexo estável e X o intermediário estável.⁸⁰⁻⁸³ O asterisco denota uma modificação estrutural em relação à espécie nativa. A este mecanismo dá-se o nome de mecanismo padrão. Geralmente, tanto a tripsina quanto a quimotripsina, quando inativadas por algum inibidor, seguem este esquema de reação.

O BTCl participa do processo inibitório por meio de um conjunto de resíduos chamado de centro reativo. Este centro reativo apresenta uma característica identitária à maioria dos inibidores cuja ação se desenvolve por meio do mecanismo padrão. Nele se encontra o *sítio reativo*, o qual é formado por uma ligação peptídica entre os resíduos do centro reativo.⁸⁴ É especificamente esta ligação que irá proporcionar a inibição da quimotripsina.

No BTCl, a referida ligação ocorre entre o carbono central da Phe⁵³ e o nitrogênio da Ser⁵⁴. Um aspecto importantíssimo sobre o centro reativo do BTCl diz respeito a sua relação com os demais inibidores da família Bowman-Birk. Sob um panorama mais amplo, pode-se dizer que, muito embora as sequências de resíduos sejam diferentes entre si, a estrutura conformacional do centro reativo é de elevada similaridade. Esta não é uma característica singular da família Bowman-Birk, mas também é observada ao serem comparados entre si os inibidores de outras famílias, como a de Kunitz e a classe de inibidores de subtilisina.

Aqui, é importante dizer que a hidrólise desta ligação é por demais lenta e dificultosa em concentrações usuais e pH neutro.⁸⁵ O sistema enzima-inibidor, atuando como um pseudo-substrato, se comporta de modo similar a um equilíbrio químico, sendo elevada a constante de equilíbrio para a associação destas duas macromoléculas – da ordem de 10^7 à 10^{13} M^{-1} .⁸⁶

Em todas estas proteínas, são os resíduos do sítio reativo que determinam a especificidade, de modo que Lys e Arg formam bons substratos para tripsina e Tyr, Phe, Leu e Met para quimotripsina.⁸⁵ Experimentos mostram que existe uma intercambialidade entre estes resíduos, de maneira que ao se trocar a Lys de um inibidor de tripsina por Phe ou Tyr, este torna-se capaz de impedir a ação da quimotripsina.⁸⁷ Esta característica é *sui generis* da classe de inibidores de proteases, dado que em proteínas, de um modo geral, a mínima alteração do centro reativo acarreta na completa perda de funcionalidade.⁸⁵

A inibição simultânea, pelo BTCl, da tripsina e da quimotripsina é possível devido a pouca flexibilidade do inibidor. Nota-se, também aqui, a extensão desta propriedade nos diversos inibidores da família Bowman-Birk. Mais especificamente, o centro reativo destas moléculas é sustentado por uma ou mais ligações dissulfeto, as quais, durante o processo inibitório, impedem que ocorra a dissociação das cadeias peptídicas.⁸⁵ No centro reativo, do BTCl, para a quimotripsina, estão presentes duas destas ligações: a primeira, entre os resíduos Cys⁵¹ e Cys⁵⁹; e a segunda, entre a Cys⁴² e a Cys⁴⁹. Dentre estas, a primeira é mais próxima do sítio reativo, sendo localizada à 8,1 Å dele (distância entre o nitrogênio da ligação peptídica Phe⁵³-Ser⁵⁴ e quaisquer átomos de enxofre da ligação dissulfeto).

A quimotripsina possui um *centro catalítico*, o qual é formado pela seguinte *tríade catalítica*: His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵ (figura 18). Dentre eles, a histidina atua como uma espécie de ativadora da serina. Em um primeiro momento, a His⁵⁷ sequestra o H ácido do grupo metil hidroxilado da Ser¹⁹⁵, formando um nucleófilo alcóxido extremamente reativo. É justamente este nucleófilo o responsável por clivar a ligação peptídica de proteínas específicas e por conferir a denominação de serinoprotease a esta enzima.

Contudo, há aqui um importante fato a ser considerado, sendo ele presente tanto no mecanismo de clivagem enzimática pela quimotripsina quanto

no mecanismo de inativação desta mesma protease pelo BTCl. Não são quaisquer proteínas aptas a interagirem e desencadear reações bioquímicas com quimotripsina. Há uma seletividade que é regida por outra importante região desta enzima.

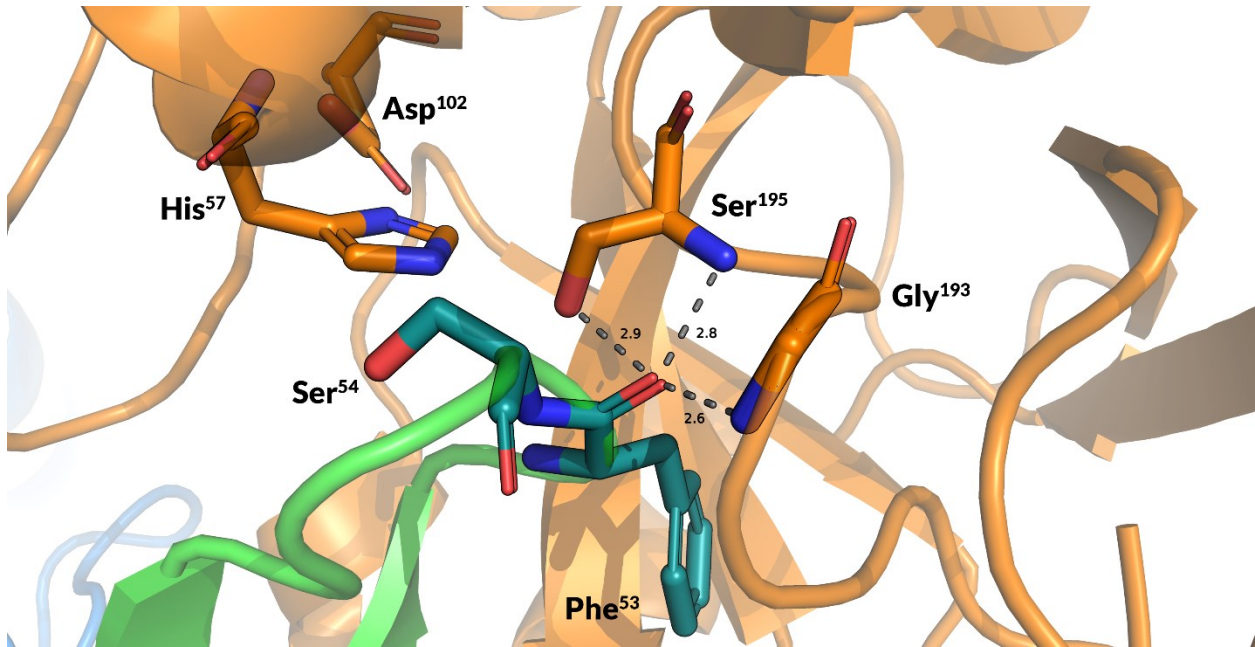


Figura 18. Resíduos da tríade catalítica e da cavidade oxifônica da quimotripsina (em laranja), e sítio reativo do BTCl (em verde) para a quimotripsina

O *bolsão catalítico* é o principal meio pelo qual a quimotripsina seleciona as proteínas que irão a ela se complexar. Não só para esta enzima especificamente, mas para toda a classe das serinoproteases, são os resíduos do bolsão catalítico que definem a afinidade química requerida para uma possível complexação (figura 6). Portanto, a região S1 é a primeira instância de reconhecimento determina a especificidade da quimotripsina.

Nela, a característica marcante do bolsão catalítico é a presença de resíduos que conferem a esta região um alto caráter hidrofóbico, tornando inviável quaisquer interações com espécies hidrofílicas. Ademais, estes resíduos apolares apresentam cadeias laterais preponderantemente curtas. Isto dá origem a um arranjo conformacional que favorece a ligação de proteínas a serem clivadas ou de inibidores cujos resíduos do sítio reativo são volumosos.

Especificamente, existe um resíduo em especial que confere ao bolsão catalítico propriedade química singular. Estando a Ser¹⁸⁹ localizada na porção mais inferior desta região, ela faz com que a seletividade da quimotripsina seja diferente daquela da tripsina.⁸⁸ De modo geral, a quimotripsina tem maior afinidade com proteínas cujo centro reativo seja constituído por fenilalanina, tirosina e triptofano.⁸⁹

Mecanicamente, o bolsão catalítico desempenha outro papel de elevada importância. O resíduo S1 é determinante tanto para o processo inibitório (pelo BTCl) quanto para o enzimático, onde a quimotripsina cliva ligações peptídicas. É necessária uma ligeira mudança conformacional na estrutura desta enzima para que ambos processos tenham início. Esta ocorre quando o BTCl ou outra proteína interage com a quimotripsina por meio do resíduo S1.

Durante a inibição, mediante o contato destas duas proteínas, diversos tipos de interações são estabelecidos, tais como ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações de van der Waals. Sendo o BTCl uma molécula rígida devido à presença de ligações dissulfeto, a ancoragem tanto à tripsina quanto à quimotripsina ocorre sem drásticas mudanças conformacionais. Todavia, pequenas alterações estruturais podem ocorrer - majoritariamente durante a transição entre as espécies *L* e *C*.

Uma das modificações mais importantes ocorre na carbonila da ligação peptídica do sítio reativo. Nela, durante o processo inibitório, o carbono pode adotar uma conformação intermediária aproximadamente tetraédrica.⁸⁵ Adotando o modelo de hibridização sp^2 , sua geometria tende a ser trigonal plana. Todavia, mesmo estando a ligação peptídica do sítio reativo intacta, este carbono se encontra distorcido à meio caminho de um tetraédro.⁸⁵

De início, imaginava-se que esta característica era oriunda de imprecisões experimentais. Contudo, estudos posteriores foram demonstrando que, de fato, o carbono desta ligação peptídica se encontra conformacionalmente distorcido.⁹⁰

Sendo a distância entre este carbono e o O^γ da Ser¹⁹⁵ menor que a de uma interação de van der Waals, tal distorção poderia ser atribuída a este resíduo do sítio catalítico da quimotripsina. Porém, experimentos subsequentes mostraram que, mesmo em enzimas correlatas à quimotripsina onde a Ser¹⁹⁵ é substituída

por outros resíduos cuja interação com o sítio reativo é desfavorável, há formação de uma espécie parcialmente tetraédrica no sítio reativo do BTCl.⁹¹ Dessarte, é necessária outra explicação.

Ao considerar o mecanismo padrão pelo qual a quimotripsina cliva ligações peptídicas, a proteína a ser degradada é guiada por meio dos resíduos do bolsão catalítico. Uma vez alocada e aderida nesta região por meio de interações hidrofóbicas, a estrutura conformacional da quimotripsina é parcialmente alterada. Esta modificação faz com que o sítio catalítico desta enzima seja ativado por intermédio da ionização da Ser¹⁹⁵ pela His⁵⁷, formando um grupo alcóxido. Por sua vez, esta espécie realiza um ataque nucleofílico na carbonila da ligação peptídica a ser clivada. Esta interação ocorre única e exclusivamente pelo carbono central, desfazendo seu arranjo trigonal planar e propiciando a formação de um intermediário tetraédrico. Tal nova forma molecular, além de possuir carga negativa – localizada no oxigênio da já desfeita carbonila – é altamente instável. A estabilização necessária para o prosseguimento da catálise é providenciada por outra região enzima, a cavidade oxiônica. Na quimotripsina, esta região é formada pela Gly¹⁹³ e pela própria Ser¹⁹⁵. Estes dois resíduos sustentam a forma intermediária por interações intermoleculares do tipo íon-dipolo entre os seus grupos amina e o oxigênio ionizado da espécie tetraédrica. Daqui por diante, esta primeira fase do processo catalítico – denominada *etapa rápida* – é concluída pela quebra da ligação peptídica mediante reformulação da carbonila, coadunada com a liberação do primeiro fragmento molecular (figura 19). O prosseguimento da catálise ocorre na *etapa lenta* posterior por um mecanismo hidrolítico. Por ele, dá-se a quebra da ligação entre a Ser¹⁹⁵ e o último fragmento molecular, desanexando-o e regenerando a enzima.

A ancoragem do BTCl à quimotripsina segue o arquétipo do mecanismo enzimático descrito no parágrafo anterior. Para a ocorrência da inibição, tal mecanismo não é necessariamente adotado até a sua completude, de modo que as ligações do inibidor podem não serem clivadas pela enzima. Todavia, as interações entre os resíduos lá presentes também aqui são de elevada importância, dentre elas aquela da cavidade oxiônica.

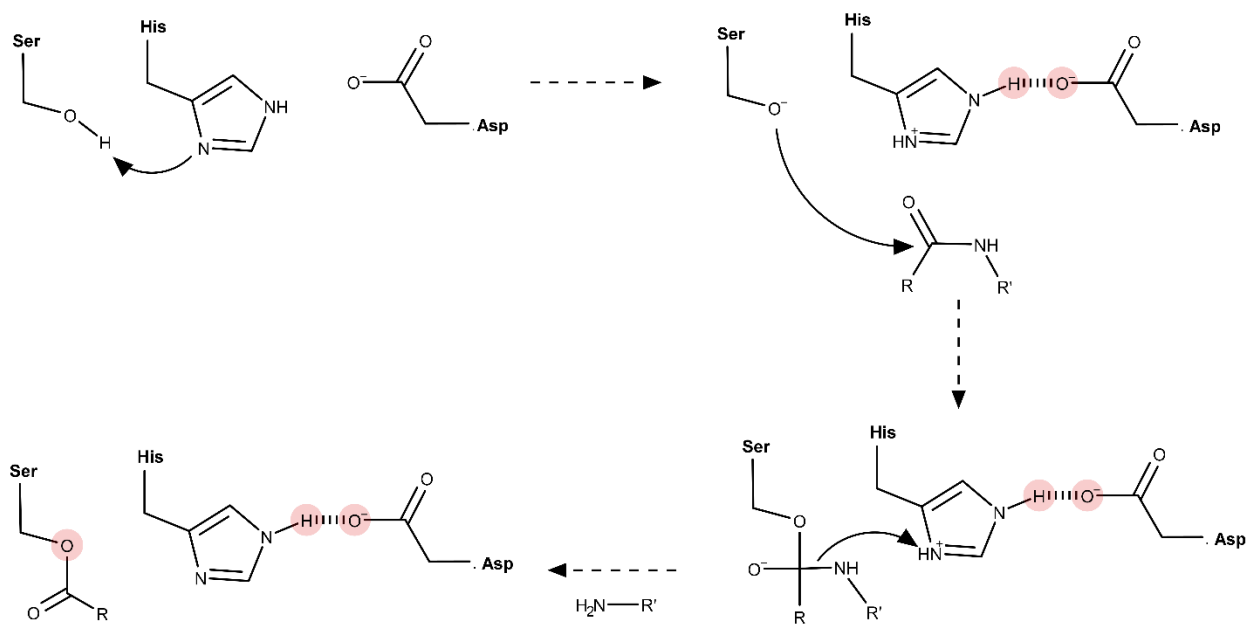


Figura 19. Primeira etapa da ação catalítica da quimotripsina, onde se vê a formação do radical alcóxi; o ataque nucleofílico deste à carbonila, formando o intermediário tetraédrico; a quebra da ligação peptídica e, finalmente, a liberação do primeiro fragmento molecular (H_2N-R)

Estudos cristalográficos mostram que a inibição da quimotripsina por trifluorometil cetonas adota um mecanismo no qual há formação de um intermediário tetraédrico, originário do ataque nucleofílico da cadeia lateral da Ser¹⁹⁵ à carbonila da cetona.⁹² Esta nova espécie também é estabilizada pelos resíduos da cavidade oxiônica (Gly¹⁹³ e Ser¹⁹⁵) mediante a formação de novas interações intermoleculares do tipo íon-dipolo, cujos comprimentos são de 2,6 e 2,7 Å, respectivamente – medida aferida entre o hidrogênio das aminas e o oxianion. Estas duas ligações são mais fortes nesta etapa de transição em contraponto às demais.^{55,92}

Em outros estudos, tanto o tripsinogênio quanto o quimotripsinogênio, proteínas zimógenas da tripsina e quimotripsina, respectivamente, apresentaram baixa atividade quando comparadas com as enzimas ativadas correlatas.^{93,94} A tal efeito associou-se como causa a ausência da cavidade oxiônica.⁹⁵ Com isso, não há formação de um estado de transição tetraédrico, impedindo a ocorrência da reação de acilação.

Estudos computacionais envolvendo a acetilcolinesterase também forneceram resultados interessantes sobre o papel da cavidade oxiônica durante

a ação desta enzima.⁹⁶ Esta proteína atua na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, inativando-o. O mecanismo pelo qual este processo ocorre é dividido em duas etapas, sendo elas uma acilação seguida por uma posterior desacilação. O referido modelo é exatamente igual ao mecanismo canônico adotado na ação enzimática pela quimotripsina. Neste estudo, mostrou-se que, conforme a reação ocorre, a distância entre o oxigênio da carbonila - proveniente do substrato - e os resíduos da cavidade oxiônica diminui. Assim, esta região sustenta o estado de transição tetraédrico por meio do estabelecimento de interações intermoleculares entre as duas espécies. O conhecimento deste mecanismo pode auxiliar o desenvolvimento de inibidores de acetilcolinesterase, os quais foram considerados promissores no tratamento da miastenia grave, glaucoma, demência e Alzheimer.^{97,98}

Neste ponto, mesmo não havendo nenhum estudo mecanístico acerca do papel químico explícito da cavidade oxiônica durante a inibição da quimotripsina pelo BTCl, pode-se supor que a eficácia do processo está diretamente associada à presença dos resíduos Gly¹⁹³ e Ser¹⁹⁵ na enzima. Adotando ou não a forma de um intermediário tetraédrico, a participação destes resíduos pode provocar ao menos a distorção à meio caminho de um complexo intermediário tetraédrico.

Tendo sido feito um breve sumário dos mecanismos envolvidos nos processos enzimáticos e inibitórios, é necessário correlacioná-lo com o método *in silico* utilizado neste trabalho, mostrando a utilidade da metodologia semiempírica.

O sítio reativo do BTCl é formado pelos resíduos Phe⁵³ e Ser⁵⁴. Esta região, mesmo não possuindo nenhum tipo de íon, é dotada de certo caráter aniônico proveniente das cadeias laterais destas espécies - conferido tanto pela alta densidade eletrônica oriunda do anel aromático da Phe⁵³, quanto da hidroxila derivada da Ser⁵⁴. Não só no BTCl, mas nos inibidores da família Bowman-Birk e na classe dos inibidores de serinoproteases de um modo geral, estes resíduos são altamente conservados e, quando muito, alternados com semelhantes.

Por meio da utilização do método semi-empírico PM6-D3H4/COSMO, foi possível corroborar a importância primaz da Phe⁵³ ao conferir-lhe a maior contribuição energética dentre os resíduos provenientes do BTCl, com valor de aproximadamente 16,00 kcal.mol⁻¹. Outrossim, a abordagem adotada também

permitiu identificar a Ser⁵⁴ como um dos maiores responsáveis pela energia de interação, atribuindo a este resíduo cerca de 3,00 kcal.mol⁻¹.

Por mais discrepantes que sejam as contribuições provenientes da Phe⁵³ e da Ser⁵⁴, o ponto mais importante é a discriminação ordenada destes resíduos, colocando-os em foco dentre os demais com base em um critério quantitativo que bem representa a realidade advinda de evidências empíricas.²⁹

Para confirmar os resultados obtidos com o uso da metodologia semi-empírica, utilizou-se como referência cálculos realizados com a rotina SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO.

O uso desta metodologia mais robusta apontou para o que já era esperado: a Phe⁵³, com uma participação da ordem de 18,50 kcal.mol⁻¹, é o resíduo que mais contribui energeticamente para a interação entre o BTCl e a quimotripsina. A Ser⁵⁴, tal-qualmente outrora verificado, também é um dos resíduos mais colaborativos para o processo inibitório, com um total de 3,50 kcal.mol⁻¹. A única diferença entre esta metodologia e a anterior é somente a ordem dos resíduos mais contributivos – aqui, a Ser⁵⁴ ocupa a sexta posição; enquanto lá, a quarta.

Com isso, conclui-se que o protocolo utilizado foi satisfatório ao evidenciar corretamente os resíduos do sítio reativo do BTCl. A importância deste resultado deve ser evidenciada não só por seu papel corroborativo em relação ao trabalho experimental realizado por Barbosa *et al*, mas por um outro aspecto de igual importância.²⁹ De forma geral, os inibidores da família Bowman-Birk possuem uma estrutura muito semelhante entre si. Entre algumas espécies, o nível de identidade das sequências chega a ser de 80%, como é o caso do que ocorre entre o BTCl e o inibidor de serinoproteases extraído de sementes de feijão-manteiga (*Phaseolus lunatus*). Com isso, pode-se dizer que este protocolo é de elevada importância ao considerar sua aplicabilidade em outros sistemas formados por diferentes inibidores.

Para se enfatizar ainda mais esta conclusão, deve-se retomar o fato de existir uma intercambialidade dos resíduos localizados no sítio reativo não só do BTCl, mas dos inibidores de sua família de um modo geral. Isso significa que, ao substituir uma fenilalanina por uma lisina, por exemplo, a especificidade do inibidor pode mudar drasticamente. Deste modo, sabendo que o protocolo aqui desenvolvido quantifica a contribuição dos resíduos para a energia de interação,

sua utilização pode ser útil para descrever e mensurar os impactos de uma mutação específica. Esta etapa é valiosa dentro de um contexto experimental, pois ao se adotar previamente uma etapa *in silico*, a fase em bancada pode ser melhor projetada, contribuindo até para a otimização da alocação de recursos.

Uma das características mais notáveis do BTCl são suas 7 ligações dissulfeto. A ligação mais importante para o processo inibitório da quimotripsina é a que ocorre entre os resíduos Cys⁵¹ e Cys⁵⁹, dada a proximidade do sítio reativo do BTCl. O método PM6-D3H4/COSMO ratificou a importância desta ligação ao identificar corretamente a Cys⁵¹ como um dos resíduos mais colaborativos para a energia de interação do sistema enzima-inibidor. Quantitativamente, o valor aferido foi de 2,89 kcal.mol⁻¹. Com isso, este resíduo foi o quinto mais importante dentre todos os avaliados.

A utilização da abordagem SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO validou esses resultados. Por meio dela, foi calculada uma contribuição energética de 6,33 kcal.mol⁻¹ para esse resíduo. Se por um lado a determinação numérica da energia divergiu em relação ao modelo semi-empírico, por outro a conclusão qualitativa é assertiva: a Cys⁵¹ é o terceiro resíduo mais colaborativo para processo inibitório. Portanto, o protocolo aqui utilizado mais uma vez foi eficaz para identificar em um ambiente *in silico* o que preteritamente era somente resultado de bancada.

Há um outro aspecto relevante no qual a Cys⁵¹ é essencial. O primeiro contato envolvendo as superfícies do BTCl e da quimotripsina se dá na parte mais externa do bolsão catalítico. Aqui, ocorrem os primeiros eventos moleculares que proporcionam o surgimento do complexo. Por meio de uma das fitas antiparalelas onde se localiza o sítio reativo do BTCl, é estabelecida uma rede de ligações de hidrogênio. Uma destas ligações é proporcionada justamente pela Cys⁵¹. Estando seu nitrogênio a uma distância de 2,8 Å do oxigênio carbonílico da Gly²¹⁶ e o oxigênio a 2,8 Å do nitrogênio deste mesmo resíduo, duas ligações de hidrogênio são formadas (figura 20).

Outro ponto importante a ser salientado foi a capacidade de a metodologia SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO ter atribuído à Cys⁵⁹ uma colaboração energética não desprezível em comparação ao protocolo PM6-D3H4/COSMO. Este valor, de aproximadamente 3,00 kcal.mol⁻¹, foi

responsável por identificar este resíduo como o nono mais colaborativo para a energia de interação. Se por um lado este valor é menos da metade daquele aferido para a Cys⁵¹, por outro a Cys⁵⁹ se encontra mais distante do sítio reativo do BTCL e, conseqüentemente, da interface de interação, o que pode justificar esta discrepância.

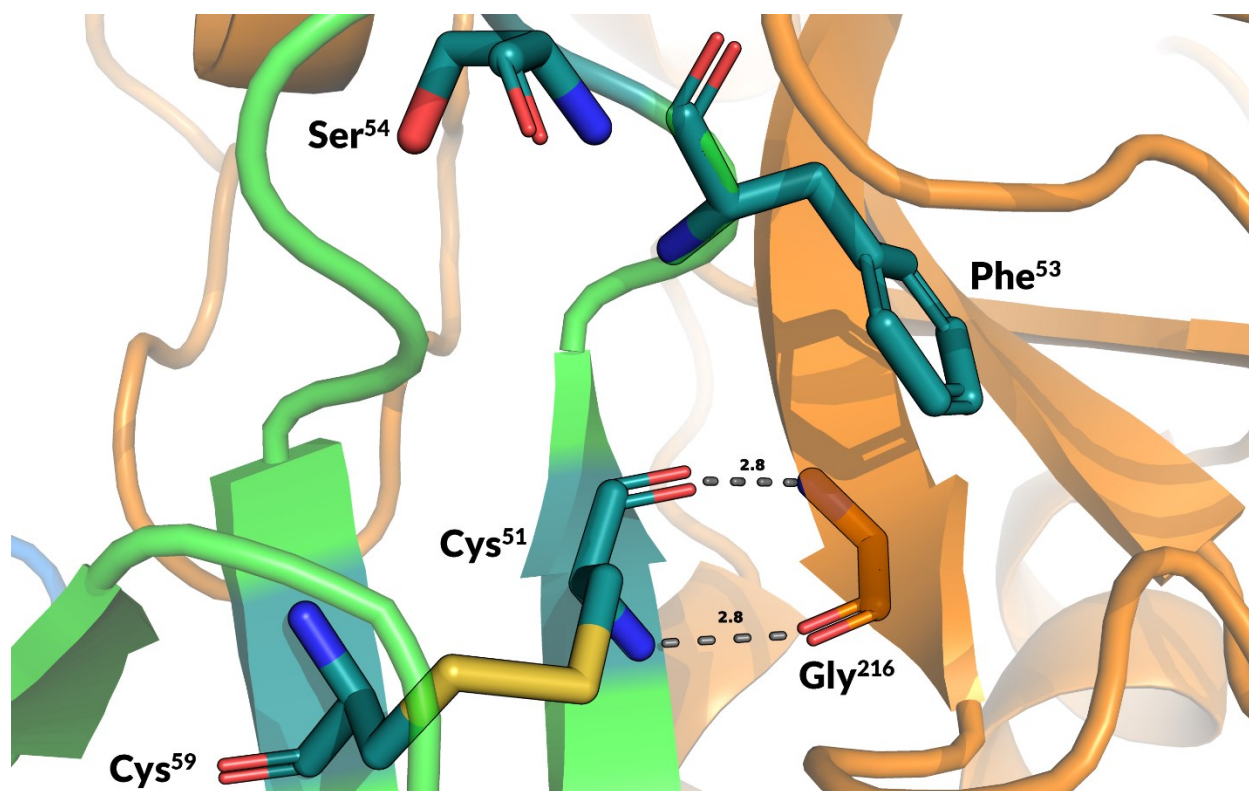


Figura 20. Ligações de hidrogênio entre a Cys⁵¹ e a Gly²¹⁶ no complexo BTCL-quimotripsina

Também aqui, a presença destas sete ligações dissulfeto não é característica singular do BTCL. Na grande maioria dos inibidores da família Bowman-Birk, além de estarem presentes, suas posições na estrutura primária são altamente conservadas. Assim sendo, a utilização deste protocolo pode ser relevante não só dentro do contexto BTCL-quimotripsina, como também em diversos outros sistemas similares.

Os resultados obtidos para quimotripsina foram semelhantes. Em um primeiro momento, a região mais relevante da enzima é o seu centro ativo devido a presença da tríade catalítica, formada pelos resíduos His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵. A partir do método PM6-D3H4/COSMO foi possível verificar a importância desta

região. Os resíduos lá contidos foram os mais significativos, em termos energéticos, quando comparados com os de outras regiões - como o bolsão catalítico e a cavidade oxidônica. A His⁵⁷ foi o primeiro resíduo cuja substituição mais afetou a energia de interação. A magnitude da desestabilização provocada pela mutação por glicina foi de 12,70 kcal.mol⁻¹. Por sua vez, sendo a Ser¹⁹⁵ o segundo mais colaborativo, ela o faz com uma contribuição da ordem de 5,80 kcal.mol⁻¹.

Posteriormente, por meio do protocolo SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO, resultados semelhantes foram obtidos, comprovando os anteriores. Em um primeiro momento, nota-se que a His⁵⁷ foi o resíduo que mais colaborou, em termos energéticos, para estabilização da interface BTCl-quimotripsina, com 12,30 kcal.mol⁻¹. A Ser¹⁹⁵ aparece logo após, com um valor de 6,40 kcal.mol⁻¹.

Tão importante quanto apontar assertivamente estes dois resíduos da tríade catalítica, o outro fato que deve ser aqui ressaltado foi a convergência numérica entre as energias aferidas por esta e aquela metodologia. Para a His⁵⁷, os valores foram praticamente idênticos; enquanto para a Ser¹⁹⁵ a divergência não foi elevada. Ambas metodologias possibilitaram a análise dos resíduos da região catalítica da quimotripsina, evidenciando de modo quantitativo o que anteriormente era resultado somente qualitativo.

Os efeitos decorrentes da interação entre o sítio reativo do BTCl e o sítio ativo da quimotripsina ocorrem como consequência posterior de interações prévias que ocorrem no *bolsão catalítico* da enzima. Por meio do método PM6-D3H4/COSMO, a relevância desta região pôde ser constatada. Ao serem realizadas mutações por glicina, 3 resíduos substituídos se mostraram mais colaborativos para a energia de interação. O primeiro deles, já abordado anteriormente, foi a Ser¹⁹⁵; o segundo, a Met¹⁹², com uma quantia de 4,20 kcal.mol⁻¹; e o terceiro, o Trp²¹⁵ com 3,10 kcal.mol⁻¹.

Ao ser aplicada a rotina SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO, os resultados qualitativos foram semelhantes aos obtidos pelo método PM6-D3H4/COSMO, diferindo apenas por ligeiras variações nas energias de interação. Para a Met¹⁹², o valor foi de 5,30 kcal.mol⁻¹; enquanto para o Trp²¹⁵, 4,50 kcal.mol⁻¹.

Ambas metodologias permitiram identificar outros 4 resíduos do bolsão catalítico: Ser²¹⁸, Cys¹⁹¹, Ser¹⁹⁰ e Cys²²⁰. Todavia, suas participações não se

deram de modo tão intenso como nos três outrora mencionados. As contribuições energéticas foram na faixa de 1,00 à 1,80 kcal.mol⁻¹ para o protocolo PM6-D3H4/COSMO e de 1,0 à 2,40 kcal.mol⁻¹ para a rotina SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO.

Os resultados mostraram que somente 3 dos 18 resíduos do bolsão catalítico foram energeticamente relevantes para a constituição total da energia de interação. De fato, observa-se que os outros que sofreram mutação não afetaram a representação integral do sistema em termos energéticos, e por isso não aparecem nas figuras 15 e 17 - à exceção da Ser²¹⁸.

Uma explicação plausível advém da análise referente às posições relativas destes resíduos. De todos os que constituem o bolsão catalítico, os mais próximos da cadeia principal do sítio reativo do BTCl são justamente a Ser¹⁹⁵, Met¹⁹² e Trp²¹⁵. Deste modo, quanto mais afastados desta região, menos relevantes serão para a energia de interação.

Com isso, conclui-se que o protocolo aqui utilizado possibilitou identificar os resíduos relevantes que constituem o bolsão catalítico, bem como ordená-los de acordo com a ordem de importância para a energia de interação.

Por fim, a última região envolvida nos mecanismos enzimáticos e de inibição da quimotripsina é a cavidade oxiônica, formada pela Gly¹⁹³ e Ser¹⁹⁵. Pelo uso da metodologia PM6-D3H4/COSMO, a Ser¹⁹⁵ foi identificada como um dos resíduos mais relevantes para a energia de interação. Sua importância pôde ser observada em todas as etapas realizadas até aqui. Fazendo parte da tríade catalítica, do bolsão catalítico e da cavidade oxiônica, pode-se concluir que este resíduo apresenta elevado grau de reatividade ao ser comparado com os demais, sendo sua presença indispensável para que ocorra tanto uma clivagem enzimática pela quimotripsina quanto a inibição da mesma pelo BTCl ou por outro inibidor correlato. Deste modo, ambos os mecanismos são sensíveis a quaisquer alterações neste resíduo. Sua cadeia lateral forma o grupo alcóxi, que interage com o sítio reativo de um inibidor ou de uma proteína a ser clivada, por meio de um ataque nucleofílico ou até de um contato íon-dipolo. Ademais, o grupo amina de cadeia principal deste resíduo participa diretamente da estabilização que ocorre na cavidade oxiônica. Assim sendo, para o correto estabelecimento destas interações, é de suma importância que este resíduo seja

orientado de modo que sua conformação possibilite todos estes arranjos moleculares. Portanto, a Ser¹⁹⁵ está relacionada com equilíbrio de todos estes processos, uma vez que quaisquer mudanças de orientação poderiam afetar o mecanismo catalítico ou de inibição.

Aplicado o protocolo SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO, constatou-se a importância da Ser¹⁹⁵ para a energia de interação, sendo que ambas metodologias computacionais a qualificaram como o segundo resíduo mais energeticamente colaborativo. Em relação ao outro resíduo da cavidade oxidônica, a determinação dos termos energéticos da Gly¹⁹³ não pôde ser efetuada, uma vez que este procedimento é realizado por meio de mutações por glicina.

Após a análise dos resíduos mais colaborativos para a energia de interação e a posterior correlação com o mecanismo de inibição, emerge daí uma nova pergunta. Ao serem observadas as contribuições residuais para o BTCl, tanto por meio da metodologia PM6-D3H4/COSMO quanto da SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO há uma discrepância quantitativa entre os resíduos de uma mesma região. Este efeito é observado quando comparados os dois resíduos de seu sítio reativo. A Phe⁵³ foi o de maior influência energética. Contudo, mesmo a Ser⁵⁴ tendo sido, de fato, um dos resíduos mais contributivos, ela o fez de modo muito menos pronunciado. Pelo protocolo PM6-D3H4/COSMO, a Phe⁵³ e a Ser⁵⁴ apresentaram uma contribuição energética de aproximadamente 16,00 e 3,00 kcal.mol⁻¹, respectivamente; ou seja, uma é 5 vezes menor que a outra. Esta é exatamente a mesma proporção encontrada pela abordagem SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO. É necessária, então, uma explicação química ou física plausível para este fato.

Todavia, as diferenças não se limitaram às regiões do BTCl. Efeito semelhante foi observado no centro ativo da quimotripsina. Os resíduos Ser¹⁹⁵ e a His⁵⁷ foram identificadas como os de maior importância pelos dois protocolos computacionais utilizados. Todavia, a correlação energética entre eles foi destoante. Por ambas metodologias, a colaboração foi mais intensa na His⁵⁷ do que na Ser¹⁹⁵ (a desta foi aproximadamente a metade daquela). Portanto, é fundamental interpretar estes resultados em termos químicos.

3.5 Efeitos não covalentes associados aos resíduos da interface BTCl-quimotripsina

Com o uso da metodologia PM6-D3H4, pôde ser determinada a magnitude de algumas interações não covalentes. Este tipo de atração química é composto pelas forças de Keeson, Debye, dispersão de London e ligações de hidrogênio. A primeira ocorre a partir do surgimento de dipolos permanentes; a segunda, pela interação entre um dipolo permanente e um dipolo induzido; a terceira, entre dois dipolos instantâneos. Todas estas interações são geradas por grupos ao interagirem, ainda que à distância, com outras espécies ao seu redor. Deste modo, a natureza destas propriedades químicas é eminentemente intermolecular. Observa-se que, em estruturas proteicas, os efeitos oriundos destas interações são notados de modo muito mais pronunciado em resíduos cujas cadeias laterais são compostas por grupos polares ou de grande extensão.

De modo geral, as interações de van der Waals e as ligações de hidrogênio ocorrem em curtas distâncias, sendo que, conforme esta variável intermolecular diminui, sua força aumenta significativamente. Desta maneira, uma correta descrição, em termos energéticos, de fenômenos moleculares, deve levar em consideração as contribuições de curta distância que ocorrem mediante a aproximação de duas espécies. Em se tratando de proteínas, a participação destas forças pode ser claramente observada em processos de agregação em solução, adsorção em superfícies e em reconhecimento molecular.⁹⁹

Os cálculos deste trabalho foram realizados com e sem solvatação. A análise das séries de dados referentes ao sistema completo e ao *cluster* r4 mostra uma correlação, em termos numéricos absolutos, praticamente perfeita (figuras 14 e 15). Para se ter uma ideia da dimensão desta identidade, a maior diferença energética encontrada foi de 0,16 kcal mol⁻¹ na Ile⁵⁵. Por outro lado, a média destas dessemelhanças foi de 0,02 kcal.mol⁻¹ para um conjunto cujo desvio padrão é de 0,400. Sendo assim, pode-se dizer que as duas estruturas utilizadas forneceram resultados congêneres. Por isso, os resultados sobre os efeitos não covalentes, apresentados na figura 21, são exibidos por meio de uma curva para o sistema completo utilizando o modelo de solvatação implícito. As inferências mais pertinentes foram realizadas ao se observar a correspondência entre os

efeitos dispersivos por resíduo (em amarelo, cinza e vermelho) e a contribuição para a energia de interação (em azul).

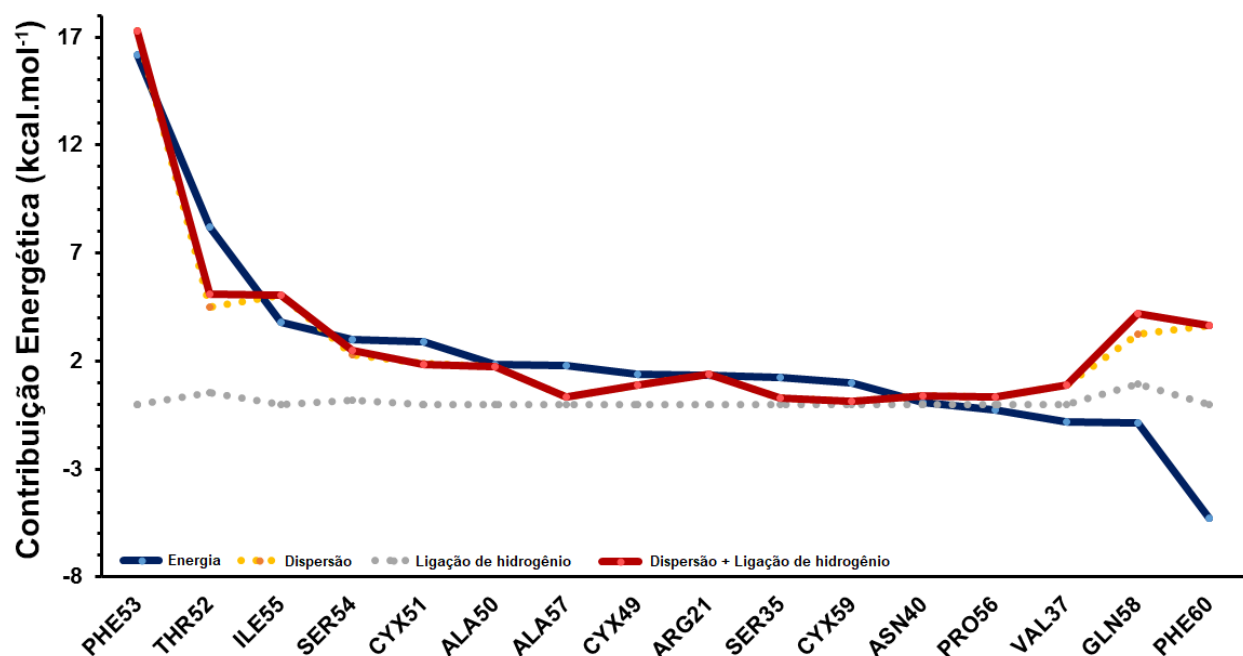


Figura 21. Contribuições para a energia de interação (em azul) e interações não covalentes (em amarelo, cinza e vermelho) associadas aos resíduos do BTCI na interface BTCI-quimotripsina

Ao serem considerados os resíduos do BTCI, a Phe⁵³ foi o mais relevante para a estabilização energética da interface, de modo que de sua mutação por glicina advém uma enorme perda energética – da ordem de 16,00 kcal mol⁻¹. Paralelamente, a contribuição dos efeitos não covalentes (dispersão e ligação de hidrogênio – curva vermelha) para a Phe⁵³ também foi a maior, quantificada em aproximadamente 17,20 kcal mol⁻¹.

Em seguida, há uma considerável perda de contribuição no segundo resíduo mais colaborativo. A Thr⁵², com uma fração energética da ordem de 8,30 kcal mol⁻¹, participa desta estabilização com um pouco mais da metade daquela mensurada para a Phe⁵³. Ademais, uma diminuição ainda mais pronunciada é observada nos efeitos não covalentes. Aqui, esta importância energética chega a ser quase a quarta parte da Phe⁵³. A correspondência entre estas duas propriedades segue de modo semelhante por toda a curva, com algumas exceções.

Depois da Thr⁵², a Ile⁵⁵ é o terceiro resíduo mais colaborativo. Todavia, a amplitude de sua participação é cerca da metade daquela observada para a Thr⁵², com uma contribuição de aproximadamente 4,00 kcal.mol⁻¹. Esta perda drástica de relevância energética não é, todavia, seguida pelas contribuições não covalentes. De modo adverso, são ligeiramente maiores que as da Thr⁵², com um incremento aproximado de 0,50 kcal.mol⁻¹. Com isso, pode-se dizer que, ou a perda de energia de interação é decorrente da eliminação de outras forças atrativas que não as não covalentes; ou a metodologia aqui empregada não foi capaz de correlacionar a influência dos efeitos não covalentes da região circunvizinha à Ile⁵⁵.

A partir da Ile⁵⁵, as quatro posições posteriores, onde estão os resíduos Ser⁵⁴, Cys⁵¹, Ala⁵⁰ e Ala⁵⁷, seguiram o comportamento padrão descrito inicialmente, onde a diminuição da contribuição energética ocorre em paralelo com perda de interações de não covalentes. Depois da Ala⁵⁷, a influência dos outros resíduos (Cys⁴⁹, Arg²¹, Ser³⁵ e Cys⁵⁹) na energia de interação passa a ser mínima, tornando a correlação com as contribuições não covalentes pouco confiáveis.

Partindo da Pro⁵⁶, a mutação por glicina nos demais resíduos causou a diminuição da energia de interação, indicando que a exclusão destes resíduos tende a propiciar uma maior coesão do sistema BTCl-quimotripsina. Conforme a energia de interação decresce – aumentando a estabilidade do sistema –, forças não covalentes são perdidas.

A partir destas observações, pode-se inferir que existe uma aparente correlação entre a contribuição para a energia de interação e as forças não covalentes. A correspondência entre estas duas quantidades é expressa de modo diferente para as duas regiões distintas do gráfico. Entre os resíduos mais adjuvantes do sistema BTCl-quimotripsina, a redução da estabilidade, aferida pela energia de interação, é acompanhada da minoração das forças não covalentes, de forma que se pode afirmar que uma é motriz da outra. Assim sendo, conforme a magnitude da perda destas interações é reduzida, se nota um reflexo imediato na dimensão do declínio da energia de interação, de modo que o decréscimo desta é atenuado conforme aquela.

Por outro lado, a parte oposta do gráfico revela um importante contraponto. A mutação dos resíduos desta região acarretou a diminuição da energia de interação, ou seja, maior estabilização do complexo enzima-inibidor. Contudo, este ganho de estabilidade foi acompanhado por uma perda das forças não covalentes. Deste modo, ao se admitir a confiabilidade dos resultados obtidos para esta região, o ganho de estabilidade em paralelo à atenuação de interações dispersivas somente poderá ser explicado ao serem tomadas outras contribuições que não aquelas aqui analisadas, as quais podem ou dar origem a outros tipos de interações que estabilizam o sistema ou atenuar as forças repulsivas já pré-existentes.

Finalmente, sugere-se que, devido ao fato de a Phe⁵³ estabelecer mais interações não covalentes, sua participação na energia de interação se dá de modo mais intenso quando comparada com o outro resíduo do sítio reativo, a Ser⁵⁴.

Em relação à quimotripsina, as séries de dados referentes ao sistema completo e ao *cluster* r4 apresentaram elevada identidade (figura 15). Entre elas, a máxima diferença entre as contribuições não covalentes (dispersão e ligação de hidrogênio somadas) foi de 0,01 kcal.mol⁻¹ para Lys²²⁶. A média aritmética da diferença dos valores destes dois sistemas foi igual 0,01 kcal.mol⁻¹, sendo aferido 0,003 kcal.mol⁻¹ para o desvio padrão de todo este conjunto. Deste modo, pode-se afirmar que as duas séries são equivalentes. Assim sendo, os resultados apresentados na figura 22 são referentes ao sistema completo. Nele podem ser observados padrões semelhantes àqueles da figura 21.

Como mencionado em seções anteriores, a participação da Ser¹⁹⁵, em termos mecanísticos, é, de certo modo, mais pronunciada do que a His⁵⁷. Todavia, percebe-se que a mutação por glicina afeta de um modo mais intenso a His⁵⁷. A substituição deste resíduo faz com que o sistema perca mais intensamente a coparticipação das forças dispersivas e das oriundas de ligações de hidrogênio quando comparado à mutação da Ser¹⁹⁵.

A serina é um aminoácido cuja cadeia lateral possui uma hidroxila ácida. A histidina, por sua vez, um grupo imidazol. Esta diferença acarreta em diversas mudanças físico-químicas, como o caráter ácido ou básico, por exemplo. A histidina é uma espécie básica, enquanto a serina é ácida. Assim sendo, as

variadas interações não covalentes podem explicar a diferença da contribuição destes resíduos para a energia de interação.

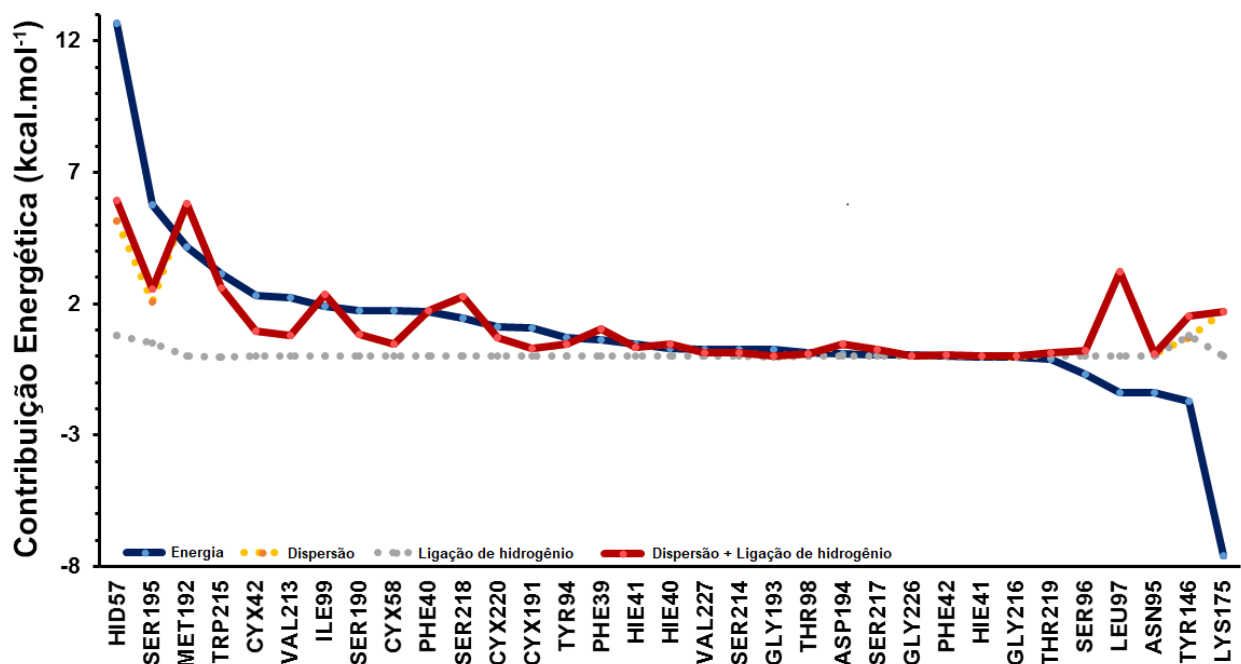


Figura 22. Contribuições para a energia de interação (em azul) e interações não covalentes (em amarelo, cinza e vermelho) associadas aos resíduos da quimotripsina na interface BTCl-quimotripsina

A análise dos outros pontos das curvas na figura 22 possibilita abordar o papel de cada resíduo na interface enzima-inibidor. A Met¹⁹⁵ é um bom exemplo disso. Curiosamente, seu comportamento é muito similar àquele de igual posição do BTCl (Ile⁵⁵ - figura 21). Aqui, os efeitos energéticos da substituição por glicina na Met¹⁹⁵ foram menos intensos em relação à His⁵⁷ e à Ser¹⁹⁵.

Quando comparada com os dois resíduos precedentes, a perturbação nas interações não covalentes com a substituição por glicina foi mais intensa justamente na Met¹⁹². Deste modo, era de se esperar que, pelo fato de este resíduo ter perdido um elevado grau de forças atrativas, o reflexo desta perda na contribuição para a energia de interação fosse mais pronunciado em relação a Ser¹⁹⁵. Como não é este o comportamento observado, uma das possíveis explicações para este fenômeno é a possibilidade de, concomitantemente a esta grande atenuação das forças não covalentes, ocorrer, mediante a mutação, um abrandamento das forças repulsivas outrora presentes. Assim sendo, há um

balanço entre estes dois efeitos, sendo que a perda das interações contributivas é compensada pelo decréscimo das influências repulsivas.

De fato, ao se observar o arranjo molecular da região ao redor da Met¹⁹² (figura 23), nota-se que esta proposição não é distante da realidade. A Met¹⁹² é formada por uma longa cadeia lateral de 4 átomos – com exceção dos hidrogênios -, sendo um deles o enxofre. Superado apenas pelo selênio, dentre todos os átomos que mais comumente constituem estruturas proteicas, o enxofre é o segundo mais volumoso. Com um raio atômico e de van der Waals de 1,0 e 1,8 Å respectivamente, o enxofre presente em cisteínas e em metioninas pode gerar tensões estéricas a depender da estrutura molecular adotada quando do enovelamento proteico ou de alterações conformacionais oriundas de interações com outras proteínas.

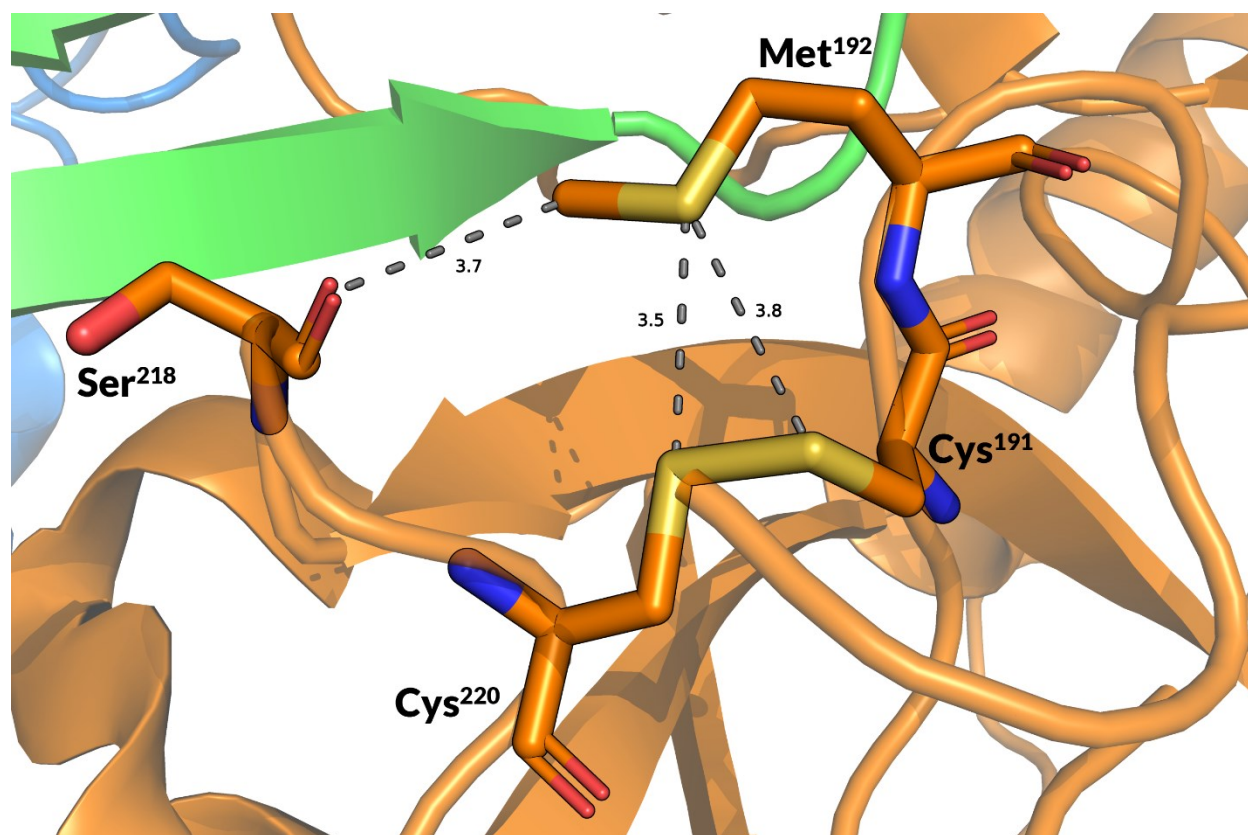


Figura 23. Possível centro de tensões estéricas na quimotripsina envolvendo os resíduos Met¹⁹², Cys¹⁹¹, Cys²²⁰ e Ser²¹⁸

Próximos à Met¹⁹² se encontram a Cys¹⁹¹ e a Cys²²⁰. Aqui, há um sítio de onde se podem emergir possíveis interações repulsivas. A distância entre os

átomos de enxofre da Met¹⁹² e da Cys¹⁹¹ é de 3,8 Å, sendo ela semelhante para os mesmos átomos da Met¹⁹² e da Cys²²⁰ (3,5 Å). Sabendo que há uma ligação dissulfeto entre estas duas cisteínas, tem-se, nesta região, uma concentração de grupos cuja densidade eletrônica é negativa, de onde podem emergir tensões conformacionais, dado que a distância entre estes grupos não é grande o suficiente para serem desprezadas por completo. Ademais, a distância entre o átomo de carbono do grupo metil terminal da Met¹⁹² e o oxigênio da carbonila presente na Ser²¹⁸ é de 3,7 Å. Portanto, a Met¹⁹² pode ser um centro de onde surgem, em maior ou menor grau, certas interações repulsivas.

Para cada ponto nas curvas das figuras 21 e 22, deve existir uma correspondência entre a estrutura e as interações químicas. Esta abordagem é ainda mais necessária ao se correlacionar as contribuições para a energia de interação e as interações não covalentes. Opostamente a um comportamento previsível, onde a diminuição de uma é acompanhada pela diminuição da outra, a Met¹⁹² não é um ente idiossincrático em meio a todos os outros resíduos; mas elemento relevador de uma tendência geral não-linear.

A região final do gráfico apresenta uma tendência similar àquela da figura 21, para o inibidor. Nela, a substituição por glicina estabilizou estrutura, posto que ocorreu uma diminuição da energia de interação. Entretanto, esta constatação foi acompanhada da minoração das contribuições não covalentes.

A figura 24 apresenta a diferença percentual dos 5 resíduos mais e menos colaborativos ao se comparar as energias de interação obtidas pelos métodos PM6-D3H4/COSMO com aquelas consideradas referência, aferidas pelo protocolo DFTB3-D3H4X/COSMO. A partir dele, percebe-se que a variabilidade na região final do gráfico é maior. Isto indica que os métodos aqui utilizados são mais propícios para identificar os resíduos que mais colaboram para a energia de interação; ou seja, estas rotinas computacionais são mais indicadas para resíduos cujas interações são majoritariamente atrativas. Para a análise dos resíduos onde há preponderância de forças repulsivas, o uso combinado das rotinas PM6-D3H4/COSMO e DFTB3-D3H4X/COSMO, precedido de um processo de fragmentação, parece não ser suficiente.

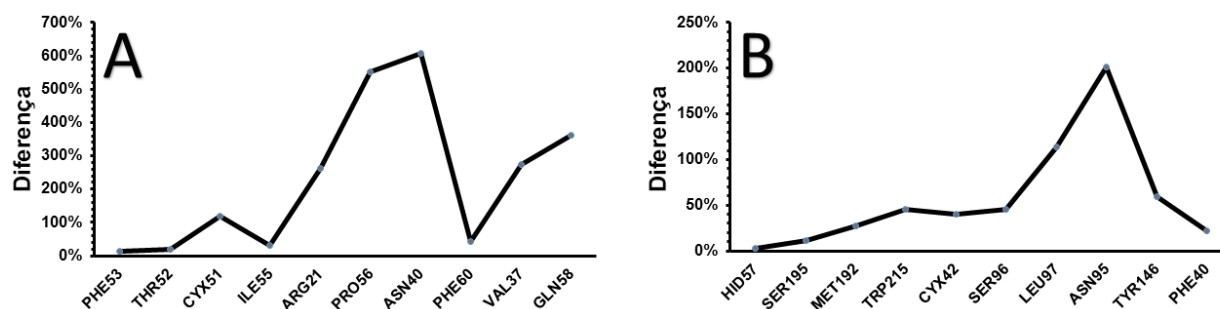


Figura 24. Diferença percentual entre as energias obtidas pelos métodos PM6-D3H4/COSMO (A) e DFTB3-D3H4X/COSMO (B) dos 5 resíduos mais e menos colaborativos para a energia de interação

Por fim, conclui-se então que, para o sistema BTCl-quimotripsina, com a metodologia aqui adotada foi possível identificar os resíduos que mais participam do processo inibitório.

3.6 Curva de fragmentação do sistema BTCl-tripsina

O sistema ideal para estudar a interação BTCl-tripsina foi escolhido a partir da construção de uma curva de fragmentação, apresentada na figura 25. De modo semelhante, objetivou-se a obtenção de um sistema cujo tamanho representasse a melhor relação entre a quantidade de átomos e a representatividade das interações presentes, dada pelo conteúdo energético.

Os pontos localizados nas extremidades da curva de fragmentação representam a interface BTCl-tripsina e o sistema enzima-inibidor completo. Ao se comparar estas duas estruturas, o valor da diferença energética entre elas foi de $16,78 \text{ kcal mol}^{-1}$. Mesmo a interface tendo aproximadamente 83% da energia de todo o complexo, esta quantidade mostra que as estruturas em questão não são energeticamente equivalentes. Sendo assim, a exclusão de 3099 átomos, mesmo representando uma diminuição de aproximadamente 77%, não seria vantajosa, tendo em vista a perda de representatividade de algumas interações. Mesmo que isso represente um ganho de tempo computacional, é pertinente buscar uma outra estrutura que sirva de ponto de partida para os cálculos de propriedade.

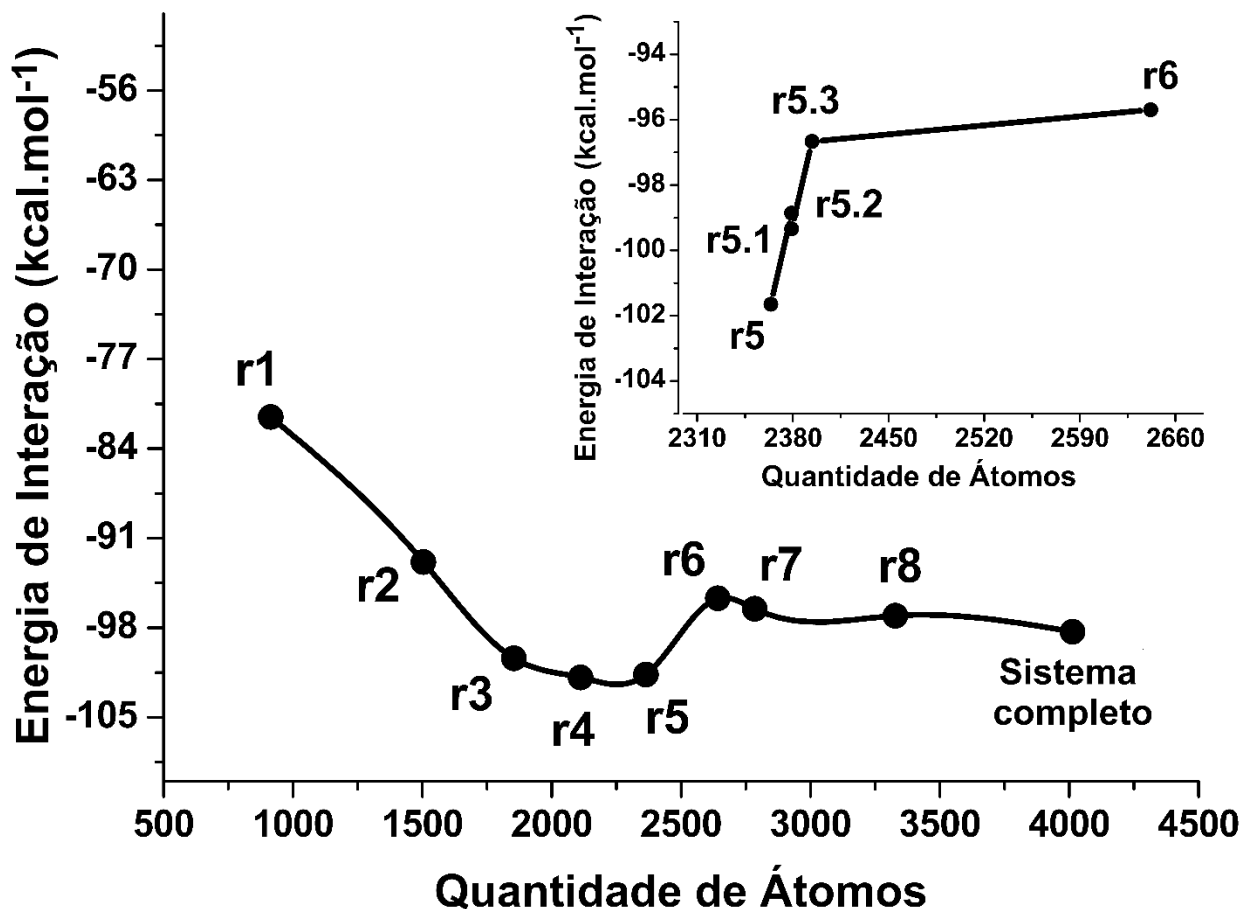


Figura 25. Curva de fragmentação BTCl-tripsina

O perfil deste gráfico é diferente daquele relativo ao sistema BTCl-quimotripsina (figura 12). Em relação aquele sistema, a adição de aproximadamente 1000 átomos à interface praticamente não alterou a energia de interação. Todavia, a curva de fragmentação do sistema BTCl-tripsina mostra que, mediante o acréscimo desta mesma quantidade de átomos, um aumento de aproximadamente 20,00 kcal mol⁻¹ foi observado.

A alteração das taxas de variação pode significar que o conteúdo energético de um sistema é mais concentrado em uma dada região, ou ainda ser uma resposta aos diferentes tipos de interações que ocorrem nas interfaces e ao redor delas. Uma justificativa para essa mudança está no processo de interação do BTCl com as proteases. Em 2007, Barbosa *et al* resolveram a estrutura do complexo BTCl-tripsina (código 2G81). No modelo cristalográfico, observa-se que o processo de inibição da tripsina é guiado por forças eletrostáticas e

mediado por duas moléculas de água.^{16,29} Por sua vez, o complexo tripsina-BTCl-quimotripsina, resolvido por Freitas *et al*, mostra que as interações do BTCl com a quimotripsina ocorrem primordialmente por meio de um contato não polar hidrofóbico localizado sob o resíduo Phe⁵³. Deste modo, sabendo que interações eletrostáticas apresentam maior conteúdo energético em relação às interações oriundas de dispersão, sugere-se que diferença entre as taxas de variação se dê pelo fato de a inibição da tripsina pelo BTCl ser dirigida por resíduos hidrofílicos, enquanto a da quimotripsina por resíduos hidrofóbicos – resultado este suportada por evidências experimentais.^{29,16}

Outro aspecto que merece atenção são os pontos *r3*, *r4* e *r5*. Eles estão localizados em uma região de mínimo, sendo seus valores energéticos inferiores aos do sistema nativo, indicando que as interações repulsivas não estão representadas.

Os pontos referentes ao sistema completo e à estrutura de menor energia (*r5*) são energeticamente similares, distando $3,34 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em termos absolutos (aproximadamente 6%). Esta diferença energética está associada justamente com as interações repulsivas não representadas.

Todavia, há um salto abrupto entre a estrutura *r5* e seu vizinho adjacente de maior tamanho (*r6*). A diferença energética entre estes dois pontos é de $5,96 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Sabendo que a alteração da quantidade de átomos entre estes dois pontos é de 278, é possível que esta quantidade de energia esteja associada a um número restrito de resíduos, ou até mesmo a um só. Deste modo, uma pequena diferença energética se faz relevante, considerando que tal região concentra mais interações em um espaço reduzido. Portanto, a exploração das possíveis estruturas presentes entre esses dois pontos foi realizada.

Os resíduos do BTCl que estavam presentes na estrutura *r6* e não na *r5* foram identificados. Considerando esta seleção e sabendo que a ancoragem do BTCl à tripsina é dirigida por forças eletrostáticas, os resíduos polares ausentes foram adicionados à estrutura *r5*.

A primeira estrutura obtida é representada pelo ponto *r5.1* (figura 25), a qual foi construída pela simples adição da Lys⁷⁰. Com isso, houve um ganho de $2,30 \text{ kcal.mol}^{-1}$, representando cerca de 39% da diferença energética entre os pontos *r5* e *r6*.

Logo após, outro resíduo polar foi adicionado à estrutura *r5*, originando a forma *r5.2* (nela não está presente a Lys⁷⁰). A inclusão da Lys⁴⁷ acarretou um ganho energético ainda maior, da ordem de 2,79 kcal.mol⁻¹ - aproximadamente 47% da diferença em questão.

Os dois resíduos adicionados melhoraram substancialmente a representatividade da fragmentação. Portanto, são essenciais para os fatores repulsivos que dão origem a essa diferença. O somatório destas duas contribuições é igual a 5,09 kcal.mol⁻¹, ou seja, aproximadamente 86% do salto energético entre os pontos *r5* e *r6*.

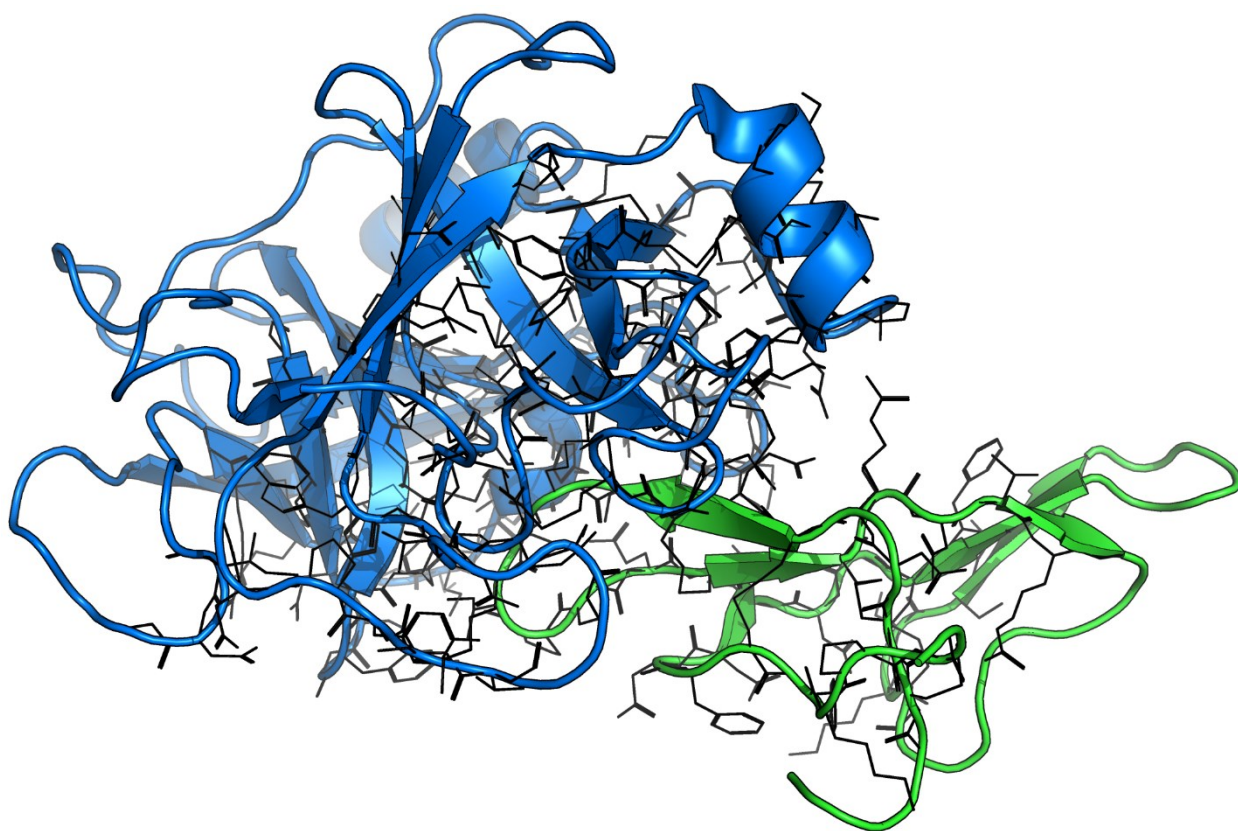


Figura 26. Representação estrutural do cluster escolhido, em linhas pretas, comparado com o sistema nativo, colorido (em verde o BTCl e em azul a tripsina)

Um terceiro sistema foi construído (*r5.3*), sendo ele formado pelos dois resíduos descritos e a Cys⁴⁶. Por meio da análise da curva de fragmentação, conclui-se que o ponto *r5.3* apresenta a melhor relação entre a quantidade de átomos e a representatividade das interações. A diferença de energia entre o

ponto *r5.3* e o sistema proteico nativo é de 1,65 kcal.mol⁻¹. Por conseguinte, este *cluster* representa energeticamente mais de 98% da estrutura nativa. Portanto, essas duas estruturas são, de um ponto de vista energético, praticamente indiferenciáveis. Deste modo, tem-se que, a partir de um processo de fragmentação, a adoção do sistema representado pelo ponto *r5.3* como partida para os cálculos posteriores não excluirá as contribuições mais energeticamente relevantes do sistema nativo. A figura 26 exhibe um comparativo entre as estruturas do sistema nativo e aquela do *cluster r5.3*.

Também vale ressaltar que a estrutura *r5.3* representa uma redução de aproximadamente 40% da quantidade de átomos em relação ao sistema nativo. Enquanto este possui 4013, aquele tem 2394. Este fator contribui para a redução do tempo computacional. Entretanto, a validação desta estrutura requer que a resposta à mutação por glicina de cada resíduo da interface seja compatível com o observado para o sistema nativo.

3.7 Cluster BTCl-tripsina versus sistema completo

O gráfico comparativo entre a estrutura nativa e o *cluster r5.3* (figura 27) foi semelhante ao do sistema BTCl-quimotripsina (figura 14). A mutação por glicina acarretou a perda de energia de interação em 11 dos 19 resíduos analisados, tanto no sistema nativo quanto no fragmentado. Os 11 resíduos em questão são importantes para a estabilização da estrutura do complexo – mais especificamente da interface. É importante ressaltar que a contribuição energética média por resíduo foi maior que a obtida no sistema BTCl-quimotripsina.

A mutação realizada nos resíduos restantes revelou uma tendência de aumento da energia de interação, com destaque para um deles, a Arg³³. Com isso, tem-se que a presença destas estruturas desestabiliza a interface.

Observa-se que não há discrepâncias energéticas entre a estrutura nativa e a fragmentada. Dentre os seis resíduos que mais estabilizam a estrutura em complexo, constatou-se um desvio máximo de aproximadamente 9%, referente à Lys²⁶. Analisando todo o conjunto de dados, a maior diferença foi da ordem de 18%, relativa ao Asp²⁰. Diferentemente do sistema BTCl-quimotripsina, não

houveram tendências contrárias, para um mesmo resíduo, entre o sistema original e o *cluster* como resposta à mutação. Sendo assim, conclui-se que, pelo menos para a região da interface correspondente ao inibidor, a estrutura obtida pelo processo de fragmentação representou coerentemente o conjunto das principais interações do sistema nativo.

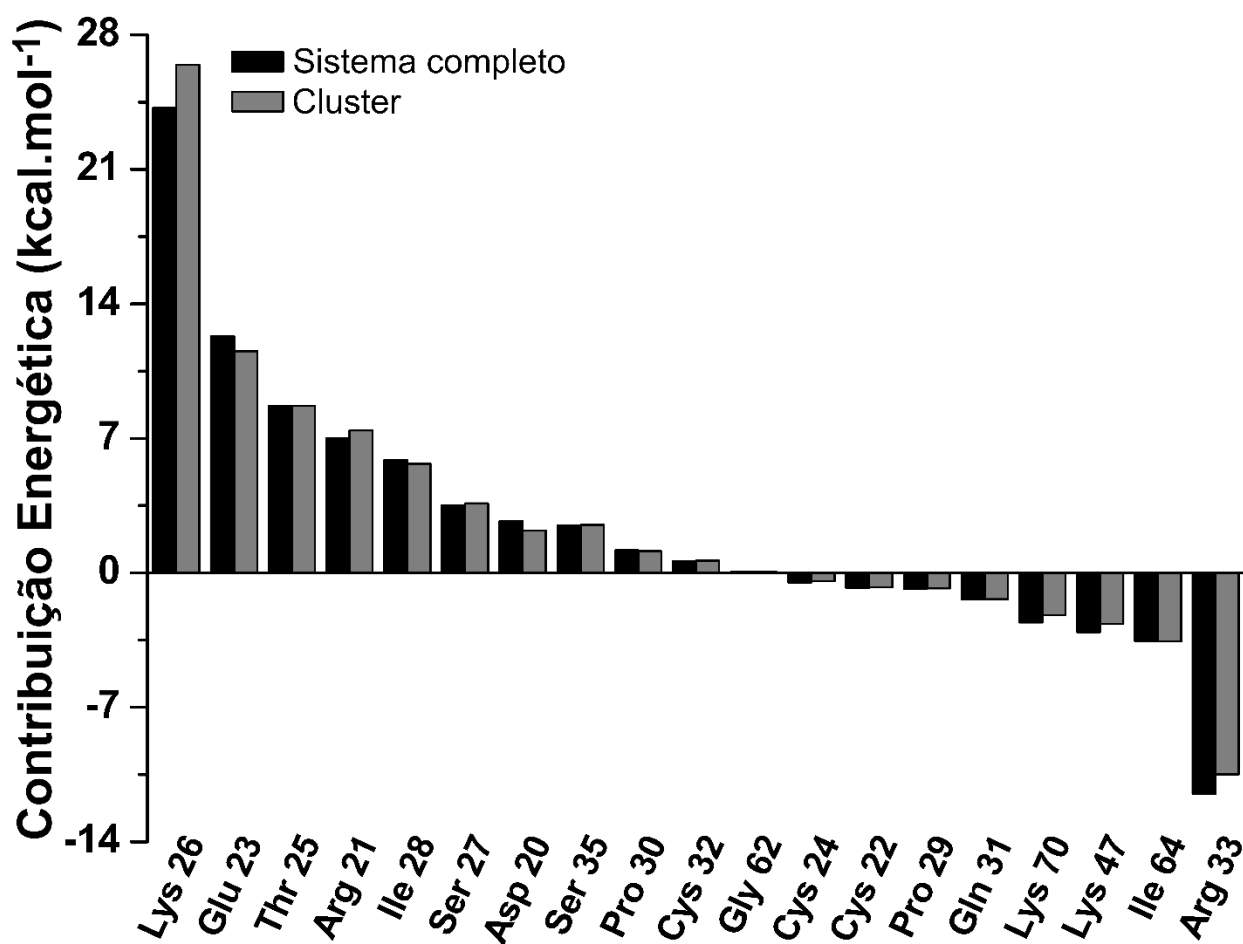


Figura 27. Contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCL relativos ao sistema completo (em preto) e ao cluster r5.3 (em cinza) para a interface BTCL-tripsina utilizando o método PM6-D3H4X/COSMO

Os resíduos da tripsina submetidos à mutação por glicina apresentaram comportamento similar (figura 28). A série de dados mostra duas regiões nitidamente distintas, sendo que na primeira delas em 30 dos 36 resíduos do sistema fragmentado e em 31 do sistema nativo a resposta à mutação resultou

na perda de energia de interação – sendo eles então responsáveis por estabilizar a interface.

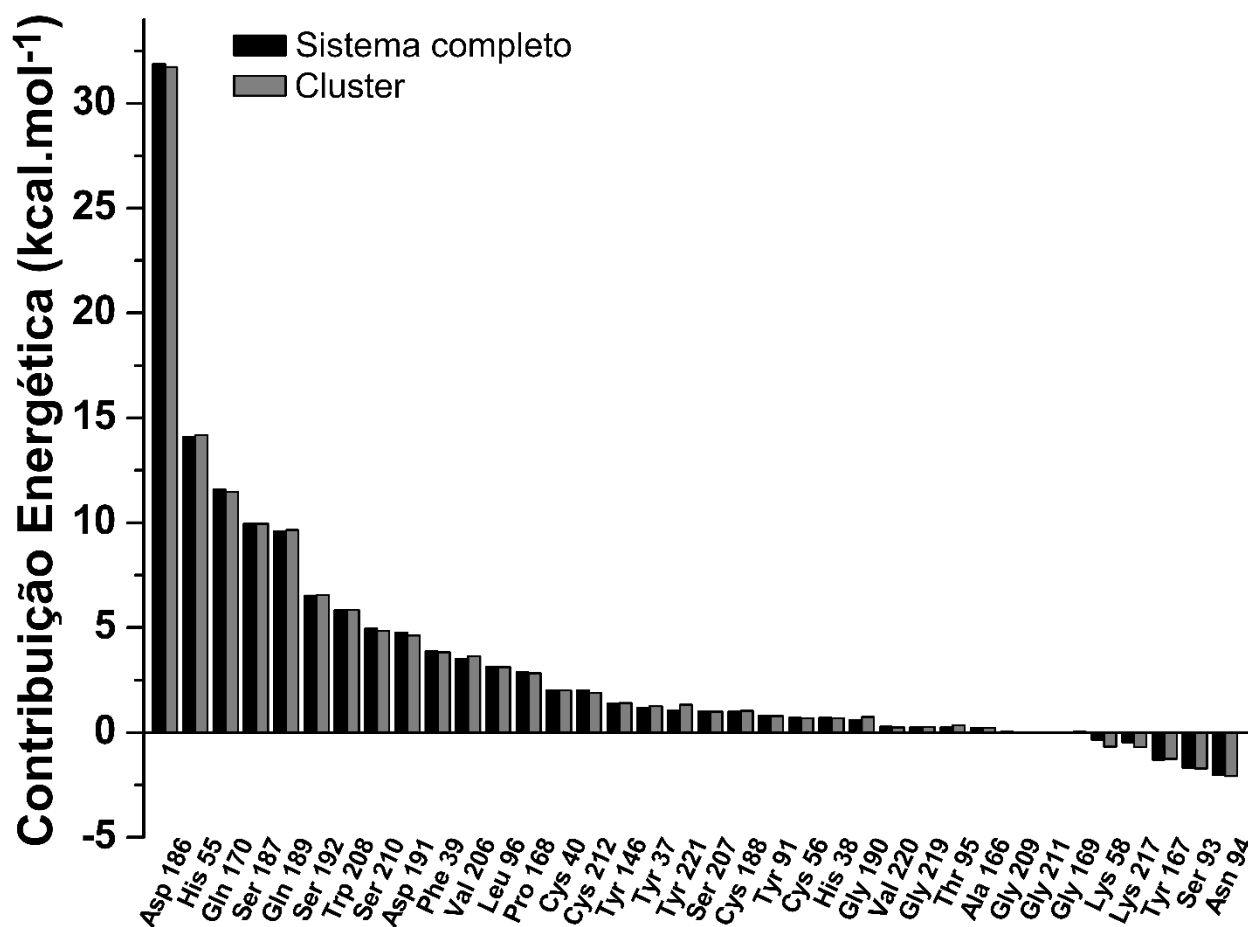


Figura 28. Contribuições para a energia de interação dos resíduos da tripsina relativos ao sistema completo (em preto) e ao cluster r5.3 (em cinza) para a interface BTCl-tripsina utilizando o método PM6-D3H4X/COSMO

Diferentemente do comportamento observado no sistema BTCl-quimotripsina, a magnitude da perda de energia é maior para alguns dos resíduos da protease. Nela, o de maior contribuição (Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾) gerou uma desestabilização da ordem de 31,00 kcal.mol⁻¹. Já os maiores valores para o inibidor, referente à Lys²⁶, foram cerca de 24,00 e 26,00 kcal.mol⁻¹ para o sistema nativo e o *cluster*, respectivamente.

Este fator poderia sugerir que a tripsina apresenta maior contribuição para a energia de interação. Contudo, a média das perdas energéticas contraria este resultado, uma vez que esta foi estimada em 4,00 kcal.mol⁻¹ para a tripsina

em $6,00 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o BTCl. Deste modo, entende-se que a energia de interação entre o inibidor e a protease apresenta maior contribuição originária do BTCl, mesmo que localmente, entre resíduos Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ e Lys²⁶, a tripsina seja mais determinante.

A análise da outra parte do gráfico também forneceu resultados pouco divergentes. Tanto para o sistema nativo quanto para o fragmentado, a mutação dos resíduos restantes acarretou o aumento da energia de interação. Porém, diferentemente das análises anteriores, não houve preponderância de um resíduo exclusivamente. Somado a isto o fato de as energias desta parte terem sido baixas, tem-se que estes resíduos desfavorecem ligeiramente a interação BTCl-tripsina.

A partir da comparação entre as duas séries de dados, pode-se concluir que as perturbações energéticas advindas do processo de substituição por glicina são semelhantes tanto na estrutura nativa quanto na fragmentada. Portanto, a adoção da estrutura r5.5 para os cálculos posteriores não irá afetar a qualidade dos resultados.

3.8 Cálculo SCC-DFTB3-D3H4X para o *cluster* BTCl-tripsina

O *cluster* obtido na etapa de fragmentação foi submetido ao mesmo processo de mutação por glicina realizado anteriormente, desta vez pelo método SCC-DFTB3-D3H4X. O resultado desta análise, para a parte referente ao BTCl, é apresentado na figura 29, comparando-o com aquele obtido pelo método PM6-D3H4X.

O perfil energético dos resíduos segue o mesmo padrão já constatado anteriormente. Na maior parte, a substituição resultou na perda de energia de interação, indicando que tais resíduos são importantes para o processo inibitório, estabilizando a interface. Os resíduos mais importantes foram a Lys²⁶, Glu²³, Thr²⁵, Ile²⁸ e Asp²⁰, similares àqueles obtidos pela rotina PM6-D3H4X.

A outra parte do gráfico também exibe comportamento convergente. Para a rotina SCC-DFTB3-D3H4X, os resíduos de maior contribuição foram, nessa ordem: Lys⁴⁷, Arg³³, Lys⁷⁰ e Ile⁶⁴. Pelo método PM6-D3H4X, Arg³³, Ile⁶⁴, Lys⁴⁷ e Lys⁷⁰. Esses resíduos, quando substituídos por glicina, provocaram um ganho de

energia de interação, mostrando que a sua presença desestabiliza a interface entre essas duas proteínas.

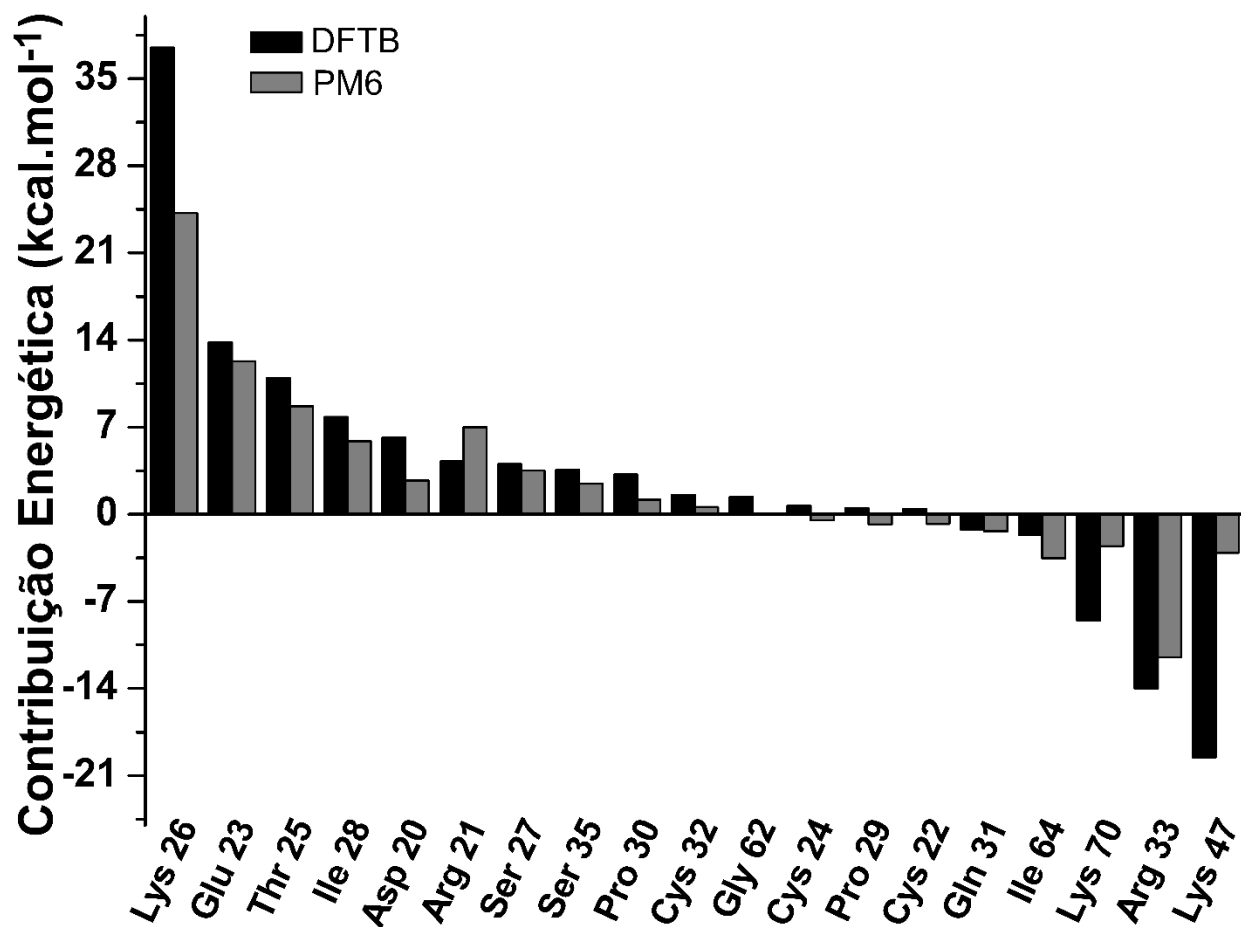


Figura 29. Contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCL relativos cluster r5.3 pelas metodologias PM6-D3H4X/COSMO (em cinza) e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO (em preto)

Nos pontos onde a mutação por glicina acarretou a perda de energia de interação, a convergência energética foi de 87%, considerando os 4 resíduos mais colaborativos. Todavia, para os outros cuja tendência é oposta, algumas diferenças foram superiores a 100%. Isto também foi observado no sistema BTCL-quimotripsina, onde a maior discrepância energética ocorreu nos resíduos que desestabilizam a interface.

Para os resíduos da tripsina, os resultados dos cálculos SCC-DFTB3-D3H4X são mostrados na figura 30. Nota-se aqui uma diferença crucial em relação a todos os outros obtidos anteriormente. Neles, não obstante a

diferença energética existente em um mesmo ponto, as metodologias comparadas apresentaram o mesmo perfil. Contudo, para o sistema BTCl-tripsina, mais especificamente na parte relativa à tripsina, a metodologia PM6-D3H4X indicou que 86% dos resíduos, quando mutados, diminuía a energia de interação. Por outro lado, este índice para o modelo SCC-DFTB3-D3H4X foi de 25%. Os dados mostraram tendências iguais somente nas partes inicial e final do gráfico.

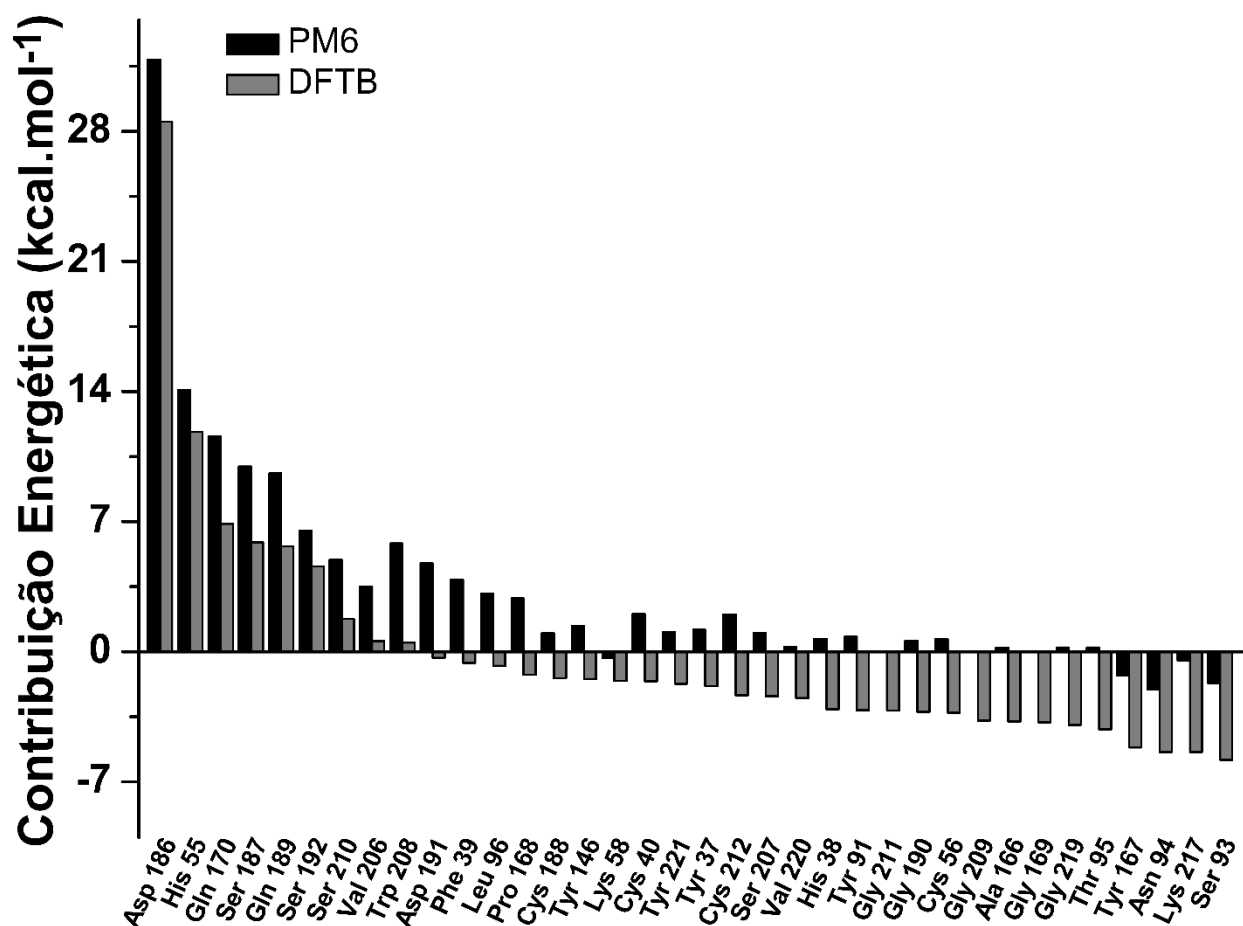


Figura 30. Contribuições para a energia de interação dos resíduos da tripsina relativos cluster r5.3 pelas metodologias PM6-D3H4X/COSMO (em preto) e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO (em cinza)

As duas séries não se correlacionaram em quase toda extensão dos pontos analisados. No entanto, houve uma boa identidade energética nos dois resíduos que mais estabilizam a interface (Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ e His⁵⁵⁽⁵⁷⁾). A diferença entre eles foi de somente 10% e 16%, respectivamente.

Estes valores foram consideravelmente maiores nos 4 últimos resíduos, os quais desestabilizam a formação do complexo BTCl-tripsina. A média das diferenças percentuais destes 4 pontos foi da ordem de 400%. É importante salientar que divergências percentuais também foram obtidas nos resíduos que contribuem consideravelmente para a energia de interação. A partir do oitavo mais colaborativo este efeito já é observado. Por isso, conclusões mais assertivas são obtidas quando analisados somente os primeiros pontos.

3.9 Análise mecanística da interface BTCl-tripsina

O BTCl inibe a tripsina por um processo mecanístico similar àquele descrito para a quimotripsina. Estas descrições foram depreendidas quando da obtenção da estrutura tridimensional destes complexos por Barbosa *et al.*²⁹

O centro reativo do BTCl para a tripsina apresenta propriedades estruturais similares ao seu equivalente homólogo, referente à quimotripsina. O sítio reativo é formado pelos resíduos Lys²⁶ e Ser²⁷. A ligação peptídica estabelecida entre eles está localizada na extremidade de um *loop* que conecta duas fitas beta. Isto faz com que a Lys²⁶, assim como a Phe⁵³, adote uma conformação de modo que sua cadeia lateral se estenda para a superfície proteica, minimizando possíveis impedimentos estéricos e tornando a ligação à tripsina mais propícia.

Diferentemente da Phe⁵³, a Lys²⁶ apresenta uma cadeia lateral com 4 carbonos, tendo em sua extremidade uma amina. Em condições fisiológicas, este grupo se encontra carregado positivamente, dada a ligação com um H⁺.

Um dos fatores que possibilita a formação do complexo ternário é a sua capacidade de manter coesos os *loops* que contém os dois sítios reativos. Mais próximos ao sítio para tripsina estão os dois resíduos cruciais para esta estabilidade: a Cys²⁴ e a Cys³². Tais resíduos formam uma ligação dissulfeto que auxilia a manutenção da estrutura terciária.

Por sua vez, a tríade catalítica da tripsina é formada por resíduos iguais aos da quimotripsina: His⁵⁵⁽⁵⁷⁾, Asp⁹⁹⁽¹⁰²⁾ e Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾. O papel desempenhado por cada um deles também aqui é idêntico: o hidrogênio ácido da Ser¹⁹⁵ é removido

pelo grupo imidazol da His⁵⁵⁽⁵⁷⁾, formando a espécie alcóxi que irá promover o ataque nucleofílico ao inibidor ou a proteína a ser clivada.

O bolsão catalítico da tripsina, em comparação com a quimotripsina, possui um resíduo a menos, a Ser²¹⁸. Dos 17 restantes, 14 são invariáveis, o que proporciona a estas regiões uma identidade de 82%. Todavia, os 3 resíduos dissemelhantes alteram o caráter químico desta cavidade reacional, conferindo-lhe uma seletividade completamente diferente.

O resíduo que mais influência esta drástica mudança é o Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾. Na quimotripsina, o que ocupa esta posição é a Ser¹⁸⁹ (figura 31). Pelo fato da cadeia lateral da serina ser curta e não possuir carga, também considerando a hidrofobicidade do bolsão catalítico onde ela se encontra, esta enzima se complexa preferencialmente a proteínas cujo sítio reativo seja formado por resíduos grandes, não carregados, hidrofóbicos e contendo grupos aromáticos.

Ao ser substituída por um aspartato na tripsina, o ambiente químico da região é alterado sensivelmente. A densidade eletrônica negativa advinda da carboxila ionizada deste resíduo faz com a tripsina tenha preferência por proteínas cujo sítio reativo apresente cadeias laterais longas e carregadas positivamente, como ocorre com a lisina e a arginina. Por isso, o BTCl, através da Lys²⁶, se liga fortemente a esta protease.

Os outros resíduos distintos são os que ocupam as posições 192 e 219 na estrutura primária de ambas proteínas (figura 31). No lugar de uma metionina há um glutamato, e ao invés de uma treonina é encontrada uma glicina, respectivamente. A respeito desta última mudança, os grupos hidroxil e metil da cadeia lateral da Thr²¹⁹ se dispõem externamente ao bolsão catalítico. Ao serem substituídos pela Gly²¹¹⁽²¹⁹⁾, a princípio a cavidade reacional não seria modificada. Todavia, tal mudança altera a disposição da cadeia principal do resíduo que ocupa esta posição. A carbonila da glicina se volta diretamente para o centro da cavidade, aumentando assim as possibilidades de interação com diferentes espécies químicas.

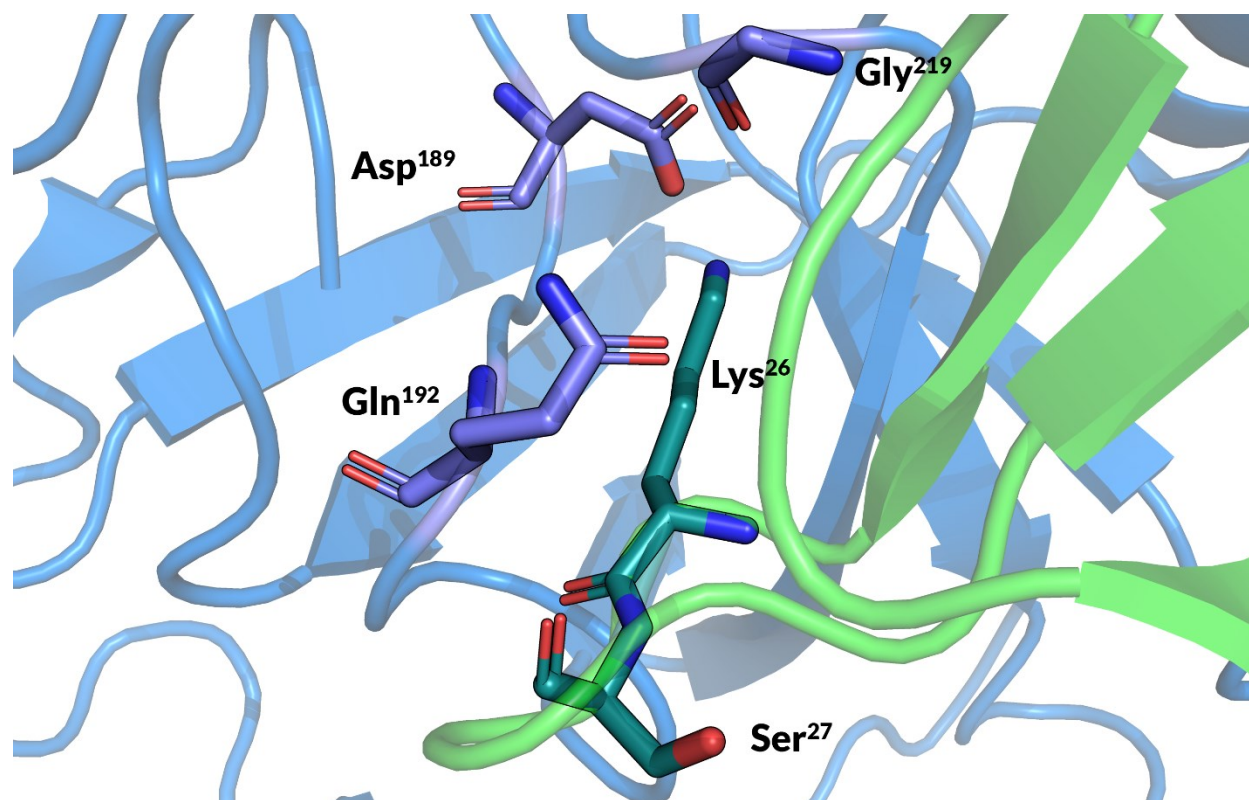
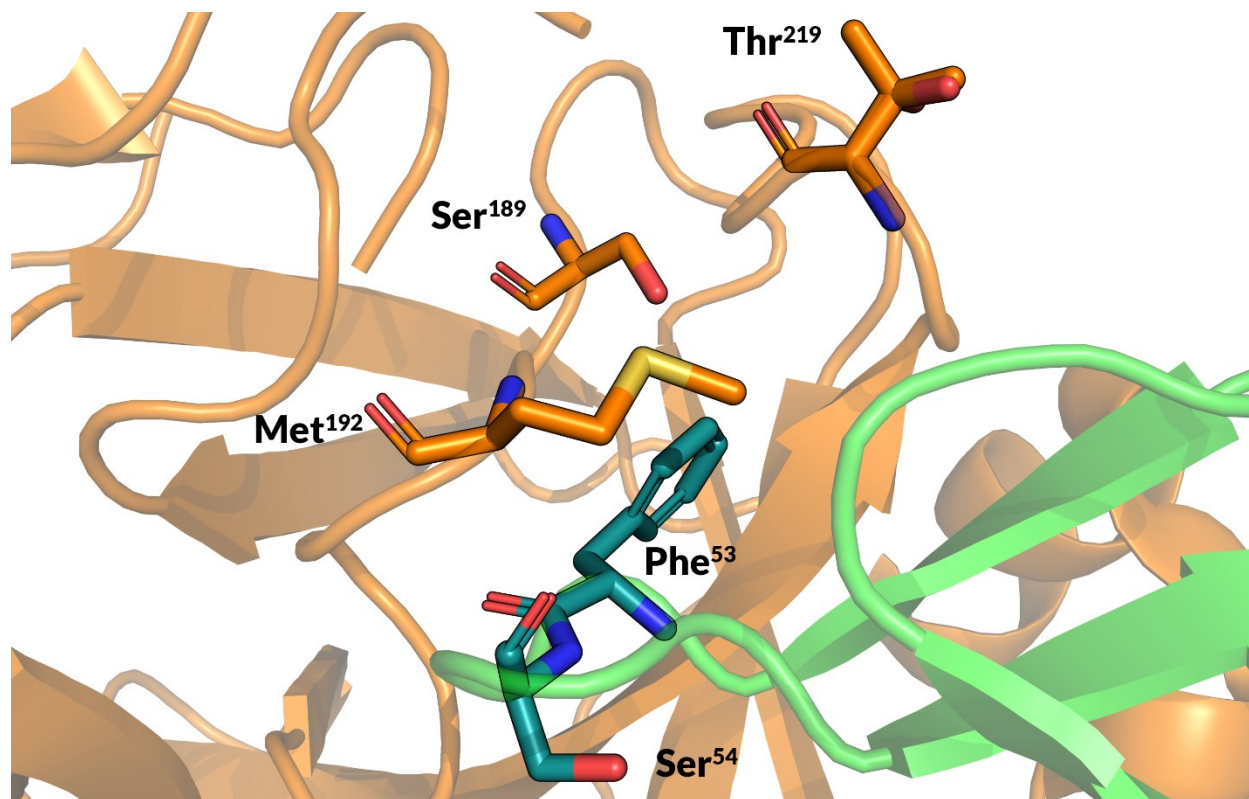


Figura 31. Resíduos diferentes dos bolsões catalíticos da quimotripsina (em laranja) e da tripsina (em azul), respectivamente

Em relação à alteração na posição 192, um resíduo neutro e hidrofóbico (metionina) é trocado por outro cuja cadeia lateral é igualmente neutra, mas polar (glutamato), dando origem ao mesmo efeito observado anteriormente.

Todas essas substituições combinadas modificam o ambiente eletrostático interno da tripsina quando comparado ao da quimotripsina, alterando as preferências reacionais. A mais importante delas é o aumento do caráter hidrofílico da região, o que causa a variação, já mencionada, em relação aos resíduos que lá adentram. Não obstante, existe outra implicação crucial que é originária desta nova preferência química: o bolsão catalítico da tripsina é muito mais susceptível à entrada de moléculas de água em sua cavidade reacional, as quais irão participar mais efetivamente não só no sítio ativo onde se dá a formação do nucleófilo alcóxi, como também na estabilização da cadeia lateral da Lys²⁶.²⁹ Além disso, uma rede de ligações de hidrogênio é estabelecida entre o BTCl e a tripsina. Pode ser destacada aquela que ocorre entre a cadeia lateral da Ser²¹⁰⁽²¹⁷⁾, por meio do grupo hidroxila, e a cadeia principal da Cys²², no oxigênio. A distância entre estes dois elementos é de 2,7 Å. A Gly²⁰⁹⁽²¹⁶⁾, em conjunto com a Cys²⁴, também forma duas outras ligações entre os oxigênios e os grupos amina, com distâncias de 2,8 Å e 3,1 Å. Juntas, estas três estruturas dão origem a uma rede ligações de hidrogênio que se assemelha àquela existente em uma folha beta, como pode ser visto na figura 32.¹⁰³ Posto isso, conclui-se que o arranjo molecular e a maior hidrofiliçidade daí advinda favorece a afinidade do inibidor à enzima, contribuindo para o aumento da constante de associação do sistema BTCl-tripsina em comparação com o complexo BTCl-quimotripsina.

Uma vez ancorado à tripsina e formando um complexo estável, o centro reativo do BTCl é submetido a uma forte influência da tríade catalítica, que possui alto grau de reatividade oriundo da Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾. Em reações enzimáticas convencionais, o efeito deste influxo é a formação de uma espécie intermediária tetraédrica, a qual é gerada duas vezes durante a rota reacional - sendo ela efetivamente um estado de transição pertencente das etapas de acilação. Em contrapartida, considerando os processos inibitórios, a ação da tríade catalítica não é tão pronunciada, haja vista que, a tomar o exemplo do BTCl, as ligações químicas entre P1 e P1' não são facilmente desfeitas.

De fato, há na literatura relatos onde inibidores de tripsina sofrem uma clivagem enzimática pela ação desta mesma proteína.¹⁰¹ Todavia, também neste caso dá-se a formação de um intermediário tetraédrico.¹⁰² De todo modo, a influência da tríade catalítica proveniente da tripsina é relevante, ainda que não haja modificações estruturais no inibidor, que permanece no bolsão catalítico. Experimentalmente, em algumas situações, verifica-se que o carbono da carbonila desta ligação peptídica do sítio reativo se encontra distorcido a meio caminho de um tetraédro.⁸⁵ Sendo assim, é fundamental a existência de uma estabilização estrutural de modo a favorecer a formação do complexo e iniciar o processo catalítico.

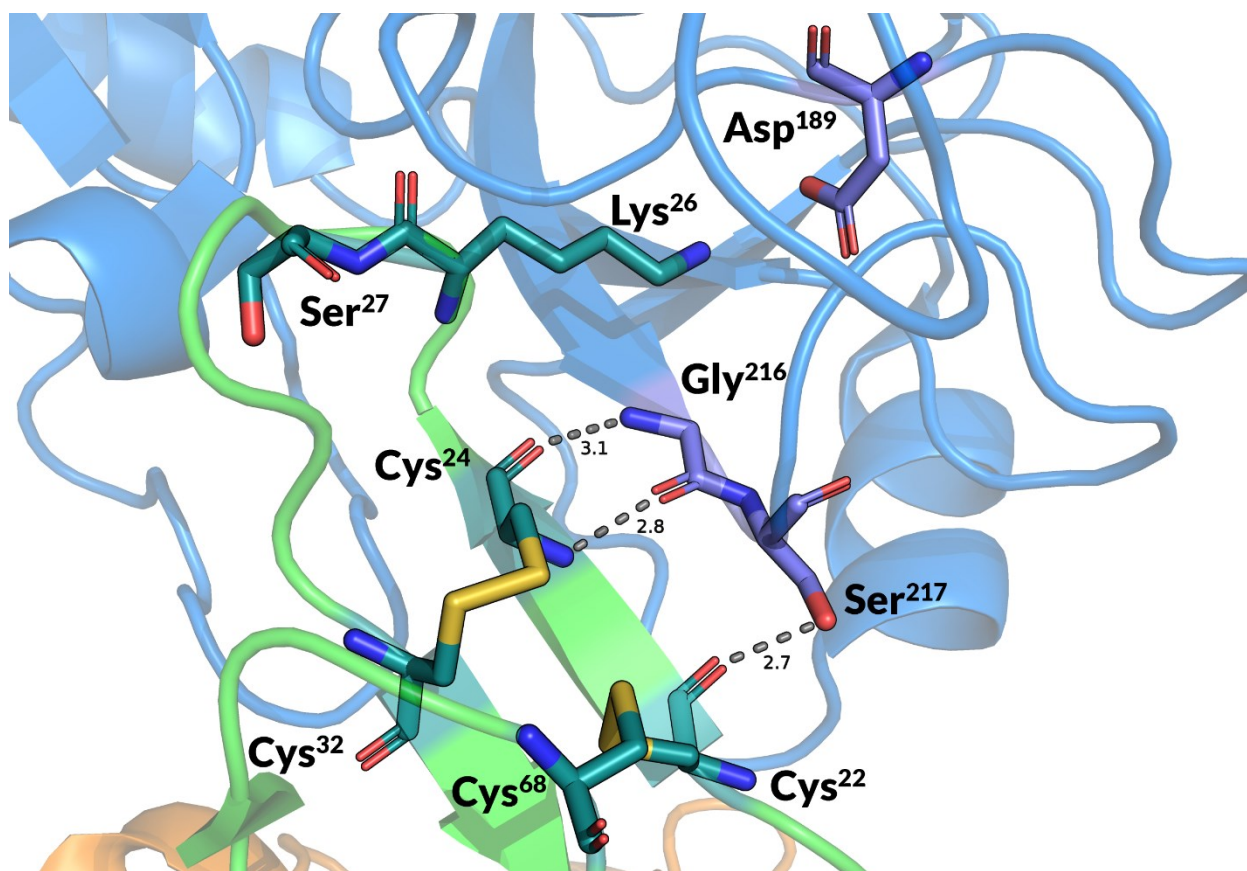


Figura 32. Ligações de hidrogênio entre uma fita beta do BTCI e alguns resíduos do bolsão catalítico da tripsina

A tripsina é dotada de uma região chamada de cavidade oxiônica, assim como a quimotripsina. Este segmento é composto pela Gly¹⁹⁰⁽¹⁹³⁾ e Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾. Tais resíduos são o objeto pelo qual se dá a estabilização das espécies geradas

sob a ação da tríade catalítica da enzima no sítio reativo do inibidor. São formadas ligações de hidrogênio entre eles e o oxigênio carbonílico da Lys²⁶. Este dista 2,7 Å do nitrogênio da Gly¹⁹⁰⁽¹⁹³⁾ e 2,8 Å deste mesmo tipo atômico da Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾. O arranjo entre estes átomos, ilustrado na figura 33, é fundamental para o início de ambos processos catalíticos e inibitórios - nos casos enzima/substrato e enzima/inibidor, respectivamente.

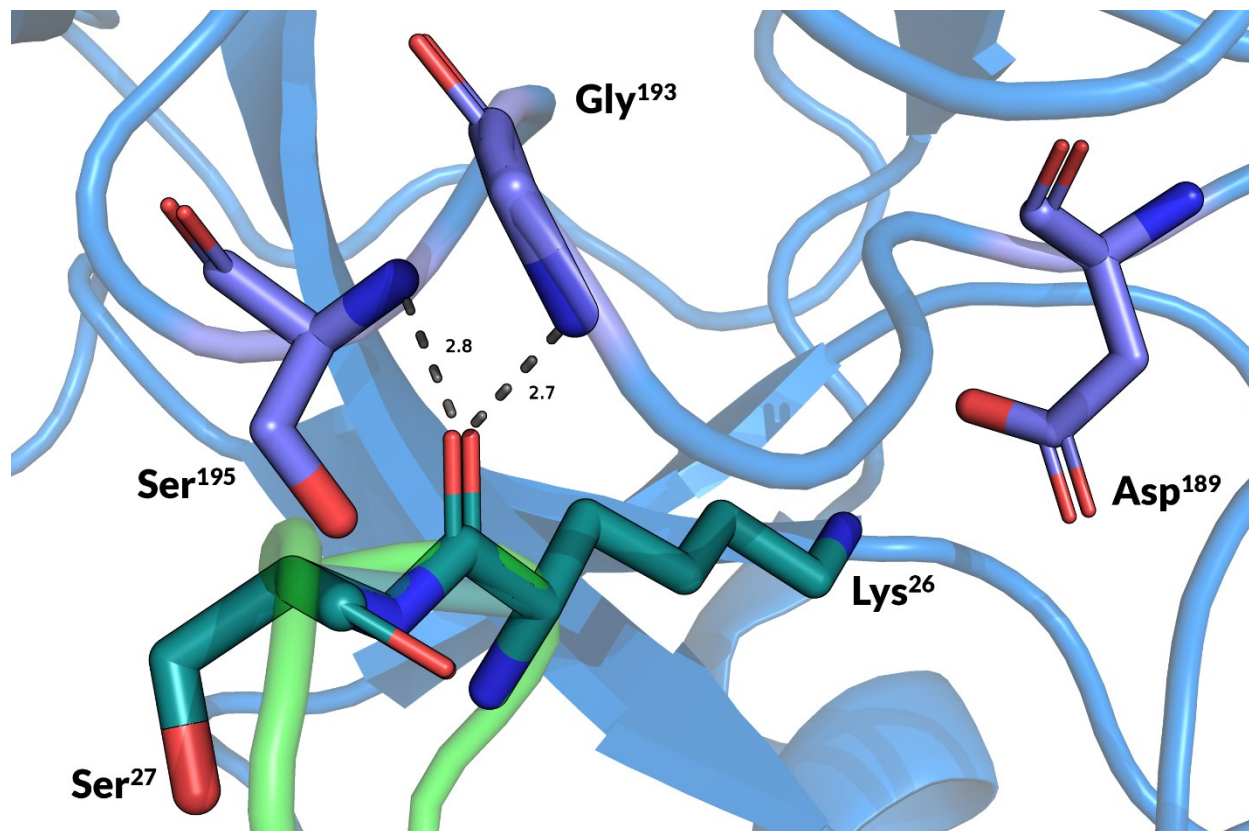


Figura 33. Ligações de hidrogênio entre o sítio reativo do BTCl e a cavidade oxiónica da tripsina

Os resultados obtidos *in silico* e a sua importância para a interpretação do mecanismo catalítico da tripsina são descritos a seguir, de modo a estabelecer uma correspondência entre as informações experimentais e dados computacionais.

A metodologia PM6-D3H4/COSMO permitiu identificar a Lys²⁶ como o resíduo mais colaborativo para a energia de interação (figura 29). Com uma participação de 28,80 kcal mol⁻¹, ela se destacou perante os demais, até mesmo

em relação ao outro resíduo do sítio reativo. A Ser²⁷, com uma importância de 5,30 kcal mol⁻¹, se mostrou o sexto mais relevante em termos energéticos.

O protocolo DFTB3-D3H4X/COSMO corroborou os resultados anteriores (figura 29). A participação da Lys²⁶ é da ordem de 37,50 kcal mol⁻¹. Deste modo, também aqui foi qualificada como o resíduo mais colaborativo para interface BTCl-tripsina. A Ser²⁷, por sua vez, foi a sétima, com uma participação de 4,00 kcal mol⁻¹. Posto isso, verifica-se efetivamente a importância dos dois resíduos que constituem o sítio reativo do inibidor.

Mediante a ancoragem do BTCl à tripsina, a Cys²⁴ e a Cys²² desempenham um papel significativo quando da formação do complexo, dado que por elas há o estabelecimento de ligações de hidrogênio na parte mais externa do bolsão catalítico, contribuindo para a estabilidade da interface.

Tanto a metodologia PM6-D3H4/COSMO quanto a DFTB3-D3H4X/COSMO não atribuíram a estes resíduos grandes valores de energia. Todavia, a Cys³², que juntamente com a Cys²⁴ forma uma ligação dissulfeto que mantém coeso o *loop* que contém o sítio reativo, contribui para a energia de interação com 2,30 kcal.mol⁻¹. Deste modo, também aqui, a rotina computacional utilizada corroborou, ainda que de modo incipiente, algumas evidências experimentais a respeito da estabilidade estrutural do BTCl.⁵⁰

Ambas abordagens também conferiram elevado grau de importância aos resíduos Glu²³ e Arg²¹, do inibidor (figura 29). O Glu²³ foi o segundo mais colaborativo para a energia de interação, com aproximadamente 13,00 kcal.mol⁻¹; a Arg²¹, o quarto ou o sexto, a depender do método, com contribuições da ordem de 9,00 e 4,00 kcal.mol⁻¹.

O Glu²³ não participa diretamente no sítio reacional. Todavia, por intermédio de sua cadeia lateral, realiza um contato polar com a Gln¹⁷⁵ da tripsina, na forma de uma ponte salina. Este contato existente entre o Glu²³ e a Gln¹⁷⁰⁽¹⁷⁵⁾ ocorre por meio dos oxigênios terminais de ambas cadeias laterais, os quais estão separados por uma distância de 2,9 Å, como se pode observar pela figura 34. Deste modo, mesmo estes resíduos não estando contidos em uma região que participa ativamente do mecanismo reacional, a interação existente entre eles pode colaborar para a estabilidade da interface. Além disso, o Glu²³ estabelece ligações de hidrogênio, por meio da Arg³³, entre as duas fitas beta

antiparalelas de onde surge o *loop* que contém o sítio reativo do BTCl. Assim sendo, o Glu²³ colabora para estabilidade da estrutura secundária, tão importante durante o processo inibitório.

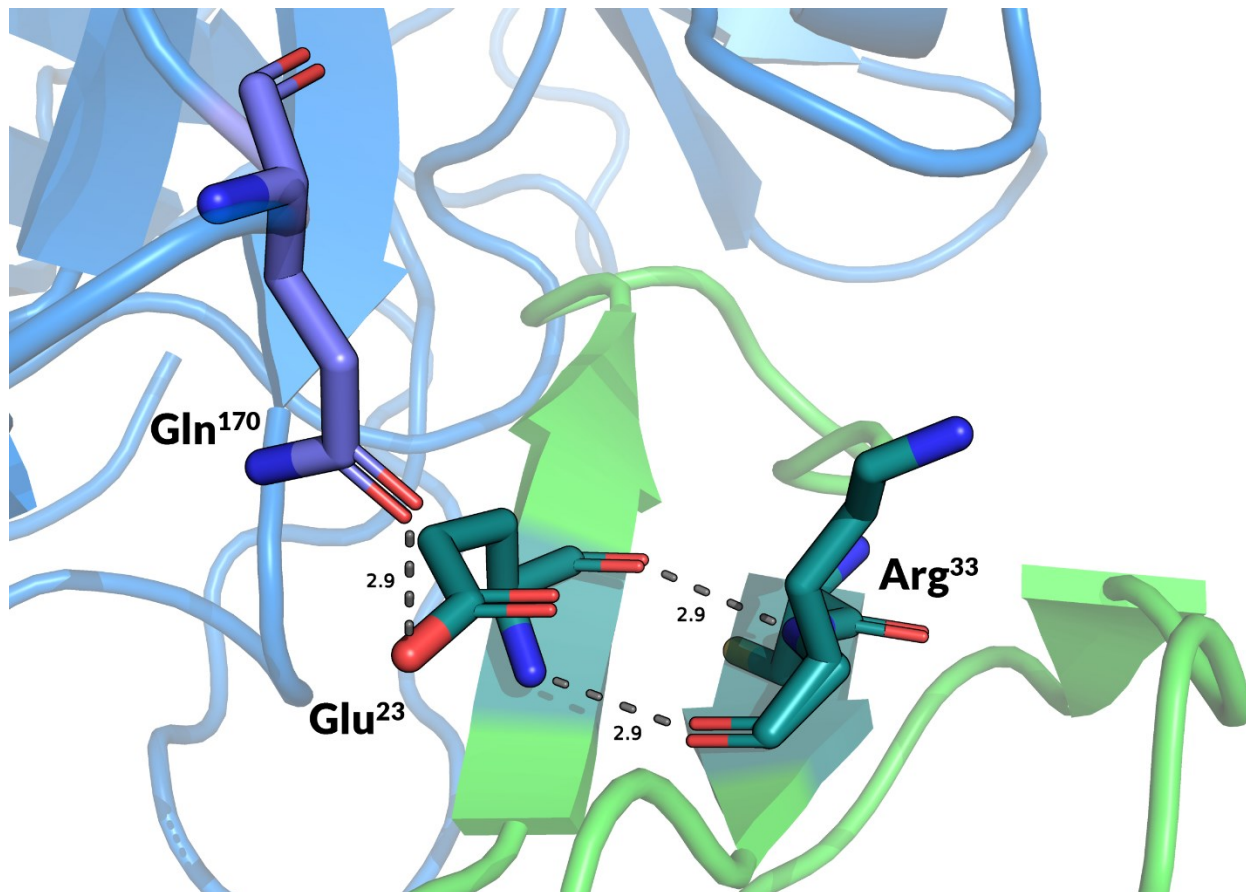


Figura 34. Interações mediadas pelo Glu²³ no complexo BTCl-tripsina

A Arg²¹ possui certa semelhança com o Glu²³. A depender da orientação de sua cadeia lateral, pode estabelecer uma ponte salina ou formar uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da cadeia principal da Pro¹⁶⁸⁽¹⁷³⁾, como ilustrado na figura 35.

Por fim, pode-se afirmar que o uso combinado das metodologias PM6-D3H4/COSMO e DFTB3-D3H4X/COSMO foi fundamental para correlacionar as contribuições para a energia de interação dos resíduos do BTCl com suas respectivas participações no mecanismo de inibição.

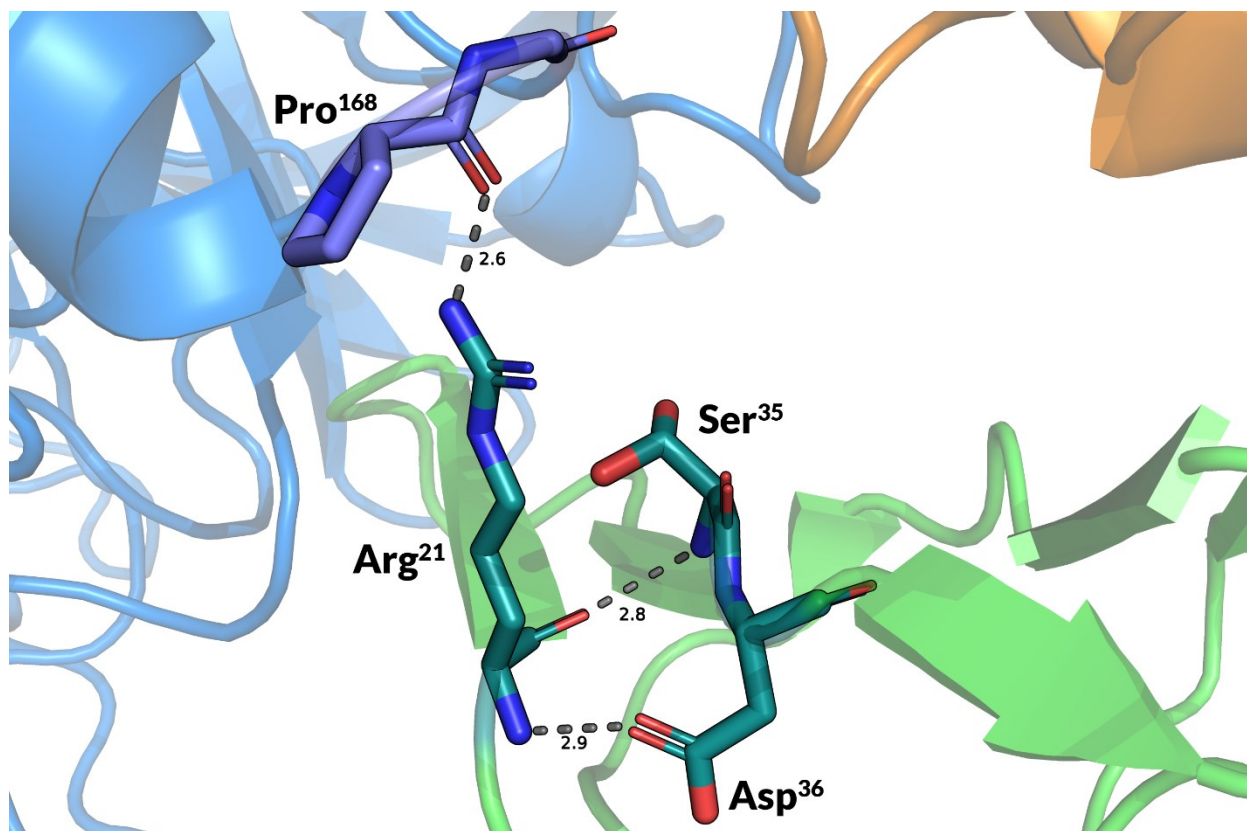


Figura 35. Interações mediadas pela Arg²¹ no complexo BTCl-tripsina

Os resultados obtidos para a tripsina foram igualmente satisfatórios. A região mais participativa no mecanismo reacional é o seu sítio ativo, composto pela tríade catalítica His⁵⁵⁽⁵⁷⁾, Asp⁹⁹⁽¹⁰²⁾ e Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾. A disposição destes resíduos é representada na figura 36. Pelo método PM6-D3H4/COSMO, a importância deles na interface do complexo foi devidamente evidenciada. A His⁵⁵⁽⁵⁷⁾ foi o segundo resíduo mais colaborativo para a energia de interação, visto que sua substituição por glicina causou uma perturbação no sistema da ordem de 14,10 kcal mol⁻¹ (figura 30). Por outro lado, esta mesma quantificação para a Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾ foi de 6,52 kcal mol⁻¹, fazendo-a o sexto resíduo mais influente.

Ao se utilizar o protocolo DFTB3-D3H4X/COSMO, a metodologia anterior foi corroborada, dado que o valor da contribuição energética da His⁵⁵⁽⁵⁷⁾ foi de 28,52 kcal.mol⁻¹, tornando-a o segundo resíduo mais importante para a estabilização da interface (figura 30). Da mesma maneira, ao se quantificar a

participação da Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾ em 4,60 kcal mol⁻¹, constata-se que este foi o sexto resíduo mais colaborativo para a energia de interação.

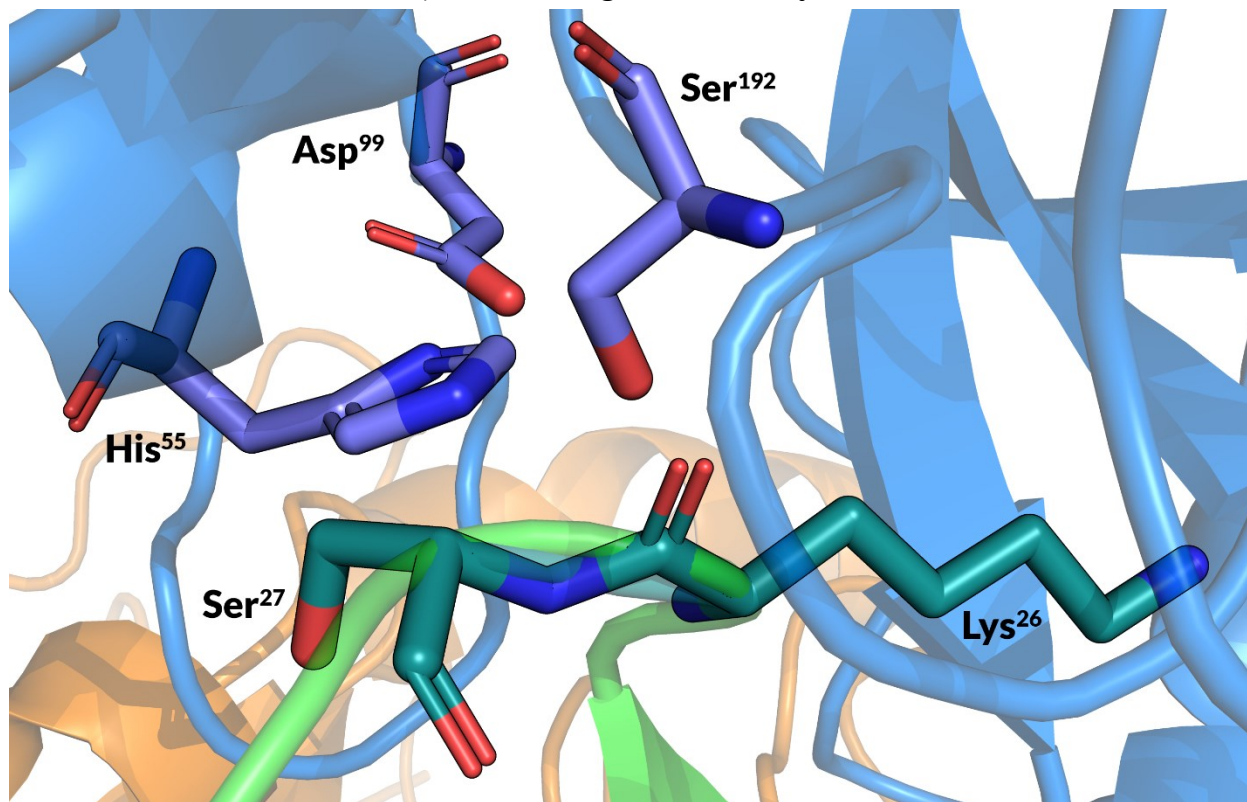


Figura 36. Tríade catalítica da tripsina e sua proximidade com o sítio reativo do BTCL

As divergências metodológicas nestes dois resíduos foram da ordem de 10% para o primeiro e 30% para o segundo. Se por um lado esta diferença não pode ser desprezada, por outro ela não altera o que de mais importante pode ser daqui extraído. Sendo a parte inicial das duas séries de dados convergente em relação à ordenação dos resíduos mais importantes, o uso combinado das duas metodologias foi fundamental para identificar a contribuição dos dois resíduos da tríade catalítica. Este resultado está de acordo com o que foi relatado experimentalmente por Barbosa *et al* para a estrutura tridimensional do complexo BTCL-tripsina.²⁹

A ação da tríade catalítica dar-se-á somente após o contato prévio do inibidor à enzima no bolsão catalítico, ativando a Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾. Esta região da tripsina possui maior caráter hidrofílico em comparação com a da quimotripsina. Pelo uso da metodologia PM6-D3H4/COSMO, este fato pôde ser ressaltado.

Toda a dissimilaridade em relação à quimotripsina advém de três posições na estrutura primária cujos resíduos são diferentes.

A primeira e mais importante delas é a posição 186(189). Na tripsina, o resíduo que ocupa este lugar é o Asp¹⁸⁶. O método computacional aferiu 31,87 kcal mol⁻¹ para sua participação na energia de interação, apontando-o como o resíduo mais colaborativo desta enzima (figura 30).

A segunda é a posição 189(192), onde uma metionina é substituída por um glutamato. Aqui, a mutação da Gln¹⁸⁹ acarretou um reflexo na energia de interação de 9,60 kcal mol⁻¹ (figura 30). Com isso, tal resíduo foi o quinto mais colaborativo em relação aos demais.

A terceira e última é a 211(219), onde há uma glicina ao invés da treonina. Por razões já mencionadas, o procedimento de mutação por glicina não é capaz de aferir contribuição da Gly²¹¹⁽²¹⁹⁾.

Com o intuito de comprovar estes resultados, utilizou-se o protocolo DFTB3-D3H4X/COSMO. Por meio dele, as mesmas constatações foram observadas, muito embora, quantitativamente, os valores encontrados tenham sido diferentes. O Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ proveu 28,52 kcal mol⁻¹ para a energia de interação, enquanto a Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾, 5,67 kcal mol⁻¹ (figura 30). Por mais que, numericamente, os dados anteriores não sejam iguais a estes, aqui, foi obtido o mesmo padrão de ordenamento dos resíduos – o Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ e a Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾ foram o primeiro e o segundo mais colaborativos, respectivamente.

Assim sendo, foi evidenciado o papel primordial do Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾, Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾ e, por extensão, da Gly²¹¹⁽²¹⁹⁾ para o processo inibitório. Modificações nestes resíduos comprometem a estabilidade da interface ao alterar as interações químicas que aí ocorrem. Este resultado está de acordo com o descrito experimentalmente por Barbosa *et al*, indicando novamente uma boa reprodutibilidade de fatores observados em bancada.²⁹

Os demais resíduos do bolsão catalítico, comuns a ambas proteases, também foram devidamente evidenciados. Dentre eles, o mais importante foi a Ser¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾, com contribuições da ordem de 9,96 e 5,89 kcal mol⁻¹ pelos métodos PM6-D3H4/COSMO e DFTB3-D3H4X/COSMO, respectivamente (figura 30). Por ambas abordagens este foi o quarto mais colaborativo para a energia de interação.

Por fim, outros quatro resíduos desta região merecem destaque. A rotina PM6-D3H4/COSMO aferiu ao Trp²⁰⁸⁽²¹⁵⁾, Ser²¹⁰⁽²¹⁷⁾, Asp¹⁹¹⁽¹⁹⁴⁾ e Cys²¹²⁽²²⁰⁾ importâncias energéticas significativas: 5,83, 4,95, 4,76 e 2,00 kcal.mol⁻¹, respectivamente (figura 30).

Entretanto, ao serem comparadas com aquelas calculadas pelo método DFTB3-D3H4X/COSMO, os resultados foram convergentes somente para a Ser²¹⁰⁽²¹⁷⁾. Seu grupo hidroxila terminal estabelece uma importante ligação de hidrogênio com oxigênio carboxílico da Cys²². Portanto, o método utilizado neste trabalho possibilitou identificar este resíduo de considerável contribuição energética.

A última região da tripsina de vital importância para o processo inibitório é o bolsão oxidônico. Sendo formado pelos resíduos Gly¹⁹⁰⁽¹⁹³⁾ e Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾, esta área de pequena dimensão apresenta densidade eletrônica positiva, localizada na cadeia principal destes dois resíduos. Tal descrição eletrostática, por sua vez, está sob os dois hidrogênios do grupo amina, os quais, formando um dipolo, dão origem a interações do tipo íon-dipolo ou a ligações de hidrogênio com espécies circunvizinhas.

O oxigênio da cadeia principal da Lys²⁶ está a uma distância ideal da Gly¹⁹⁰⁽¹⁹³⁾ e da Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾ para a formação de ligações de hidrogênio. Estas, podem estabilizar possíveis distorções no carbono ligado a ele. Tal efeito pode ser refletido também na energia de interação.

A utilização da metodologia computacional PM6-D3H4/COSMO, juntamente com a DFTB3-D3H4X/COSMO, permitiu quantificar a importância da Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾ para a energia de interação, qualificando-a como um dos resíduos mais colaborativos para o processo inibitório. Dado que a Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾ também integra o já discutido sítio ativo da enzima, sua contribuição foi abordada anteriormente. A partir daí, conclui-se que a estratégia utilizada neste trabalho foi adequada para abordar o bolsão oxidônico.

3.10 Efeitos não covalentes associados aos resíduos da interface BTCl-tripsina

Quando um resíduo é substituído por glicina, diversas alterações conformacionais podem ocorrer ao redor da região que sofreu mutação. O método aqui utilizado não é capaz de detectar mudanças desta espécie, haja vista que, durante os cálculos, o sistema não foi otimizado – ou seja, se manteve rígido. De outro modo, os custos computacionais seriam elevados.

Entretanto, a intensidade da perda (ou ganho) de interações não covalentes pode ser utilizada para explicar a constituição dos gráficos que representam as contribuições para a energia de interação. Este dado, facilmente obtido pela metodologia PM6-D3H4, reflete o comportamento de tais interações considerando a mutação por glicina.

A figura 37 mostra a relação entre a contribuição para a energia de interação (em azul) e as interações não covalentes dos resíduos do BTCl (em amarelo, cinza e vermelho), utilizando a estrutura não fragmentada com o modelo de solvatação implícita COSMO.

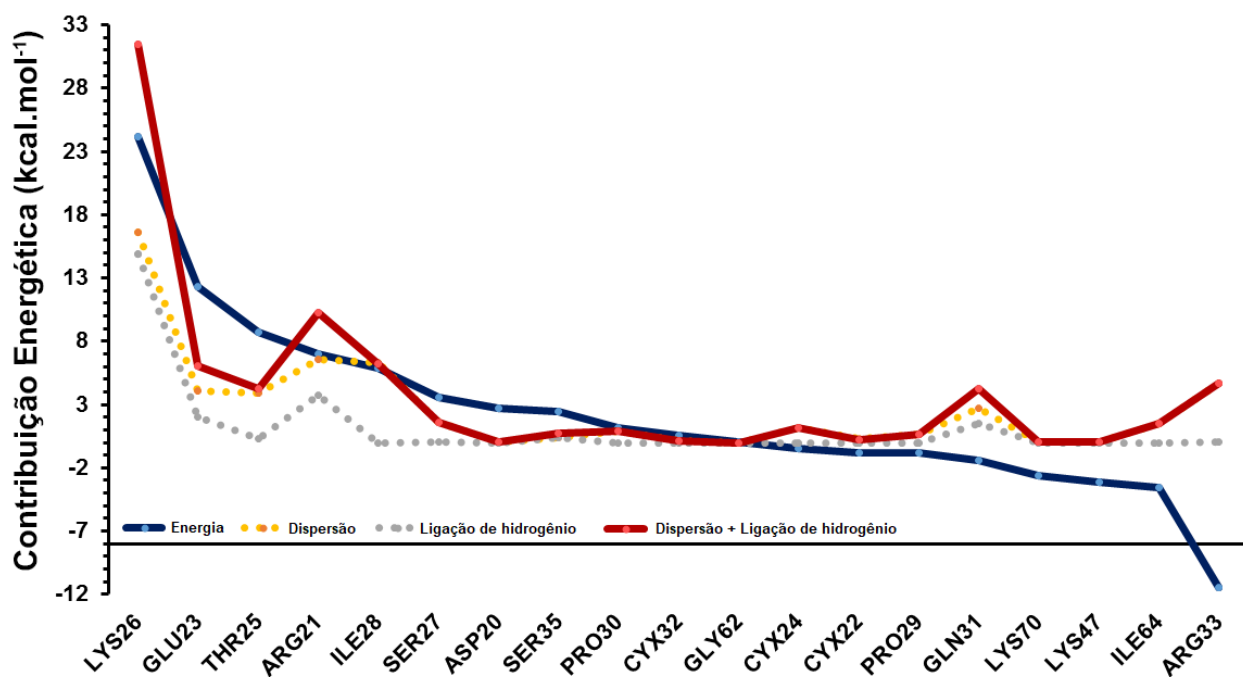


Figura 37. Contribuições para a energia de interação (em azul) e interações não covalentes (em amarelo, cinza e vermelho) associadas aos resíduos do BTCl na interface BTCl-tripsina

O resíduo do BTCl mais colaborativo para a estabilidade do sistema é a Lys²⁶. Quando da sua substituição por glicina, a energia do sistema foi acrescida uma quantidade de aproximadamente 25,00 kcal mol⁻¹. Concomitantemente, houve uma perda de interações não covalentes da ordem de 16,50 kcal mol⁻¹. Este resultado está de acordo com o esperado, posto que a Lys²⁶ é um dos resíduos constituintes do sítio reativo do BTCl e, em decorrência, participa ativamente do mecanismo reacional mediante o estabelecimento de diversas interações não covalentes.

O segundo ponto da curva foi ocupado pelo Glu²³, com 12,00 kcal mol⁻¹ para a energia de interação. Esta contribuição é aproximadamente a metade da relativa a Lys²⁶. Sendo assim, percebe-se que a mutação do Glu²³ afeta a estrutura de um modo menos pronunciado. Este comportamento é observado após a análise das interações não covalentes. Todavia, enquanto para a energia de interação a substituição do primeiro resíduo acarretou um prejuízo energético duas vezes maior que o segundo, aqui, esta diferença foi de quatro vezes.

Para os resíduos seguintes da curva, o paralelismo entre as duas variáveis analisadas não se mostrou linearmente correspondente aos primeiros. Em relação à Arg²¹ e à Ile²⁸, enquanto as contribuições para a energia de interação continuam diminuindo e causando cada vez menos impacto da estabilidade do sistema, há uma maior perda das forças não covalentes. Este fenômeno aparentemente contraditório somente pode ser explicado se outros fatores forem considerados.

Tomando como exemplo a Arg²¹, sua cadeia lateral é grande e volumosa. Sendo constituída por três carbonos, mesmo possuindo uma extremidade hidrofílica também apresenta certo caráter hidrofóbico. Então, além deste resíduo ser fonte de possíveis impedimentos estéricos devido ao seu tamanho, a partir dele também podem ser geradas forças repulsivas. De fato, a extremidade polar da Ser³⁵ está a 2,7 Å do carbono hidrofóbico presente na cadeia lateral da Arg²¹ (figura 38). Além disso, uma relação de igual natureza também ocorre entre a Arg²¹ e o Glu²³, a 3,2 Å.

Dessa forma, ainda que a perda das forças não covalentes se dê em um maior grau na Arg²¹ - o que tende a desestabilizar o sistema -, a diminuição do

impacto na energia de interação pode ser justificada pela exclusão concomitante de interações desfavoráveis pré-existentes.

Ainda que este exemplo não corresponda a totalidade dos efeitos que podem ocorrer em consequência da mutação, serve para ilustrar como o reflexo na energia de interação é uma composição de vários elementos além dos não covalentes. Não obstante, estes ainda são úteis para a interpretação de outros aspectos da curva.

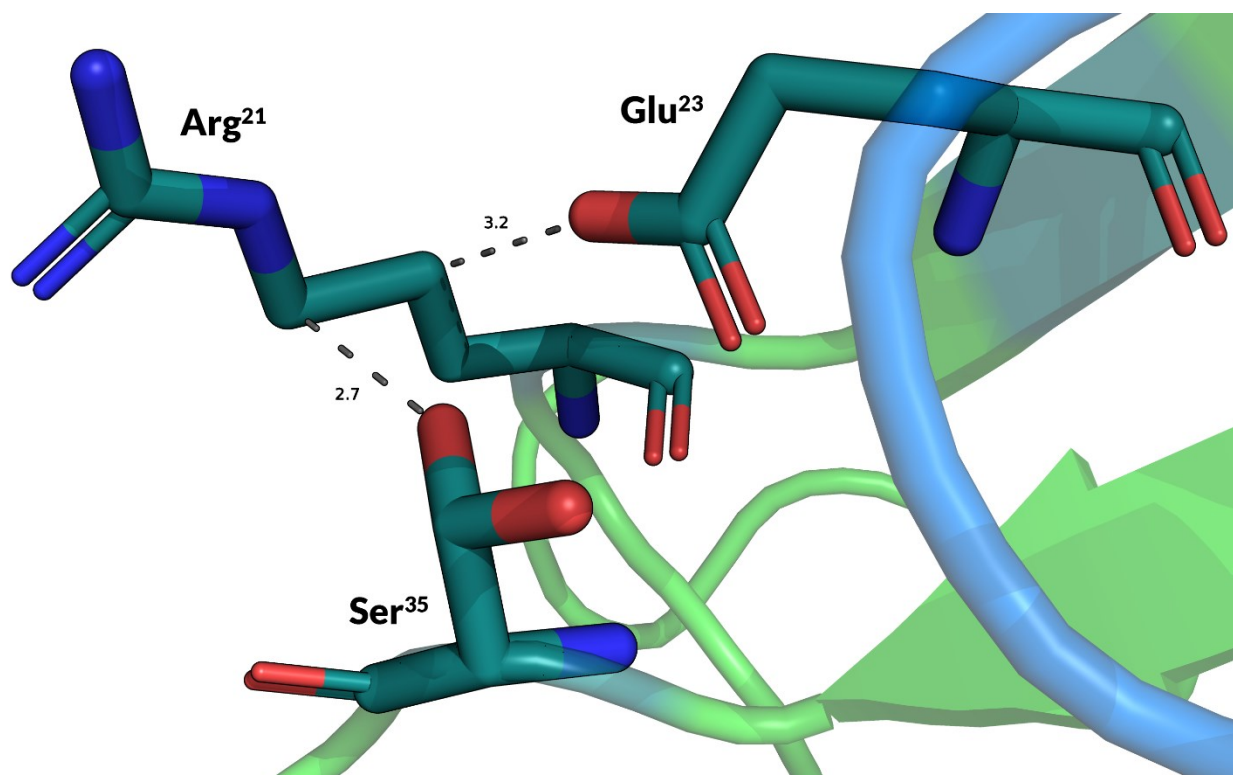


Figura 38. Possíveis tensões estéricas entre os resíduos Arg²¹, Glu²³ e Ser³⁵ do BTCl

Esperava-se que o sítio reativo do BTCl correspondesse a região de onde surgem as interações mais significativas para o processo de inibição e, conseqüentemente, mais impactantes na energia de interação. Como bem atestado, a Lys²⁶ atende verdadeiramente a esta expectativa, sendo o primeiro resíduo mais colaborativo. Contudo, a exceção é dada pela Ser²⁷. Diferentemente da Lys²⁶, a Ser²⁷ foi elencada na sexta posição. As interações não covalentes podem ser um dos fatores que explicam esta dissemelhança.

A magnitude da perda de interações dispersivas e de ligações de hidrogênio foi, respectivamente, 11 e 20 vezes maior para a Lys²⁶. Este fato, quando analisado em um contexto estrutural, ganha ainda mais relevância. As evidências experimentais de Barbosa *et al* mostraram que a Ser²⁷ estabelece contatos polares somente com a Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾.²⁹ A Lys²⁶, em contrapartida, apresenta uma quantidade muito maior destas interações. A partir de sua cadeia lateral surgem duas, uma com o Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ e outra com a Ser¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾. A cadeia principal também dá origem a quatro outras: três com a cavidade oxidônica, por intermédio da Gly¹⁹⁰⁽¹⁹³⁾ e da Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾, e uma com a Ser²⁰⁷⁽²¹⁴⁾ do bolsão catalítico. Todas estas interações são representadas na figura 39.

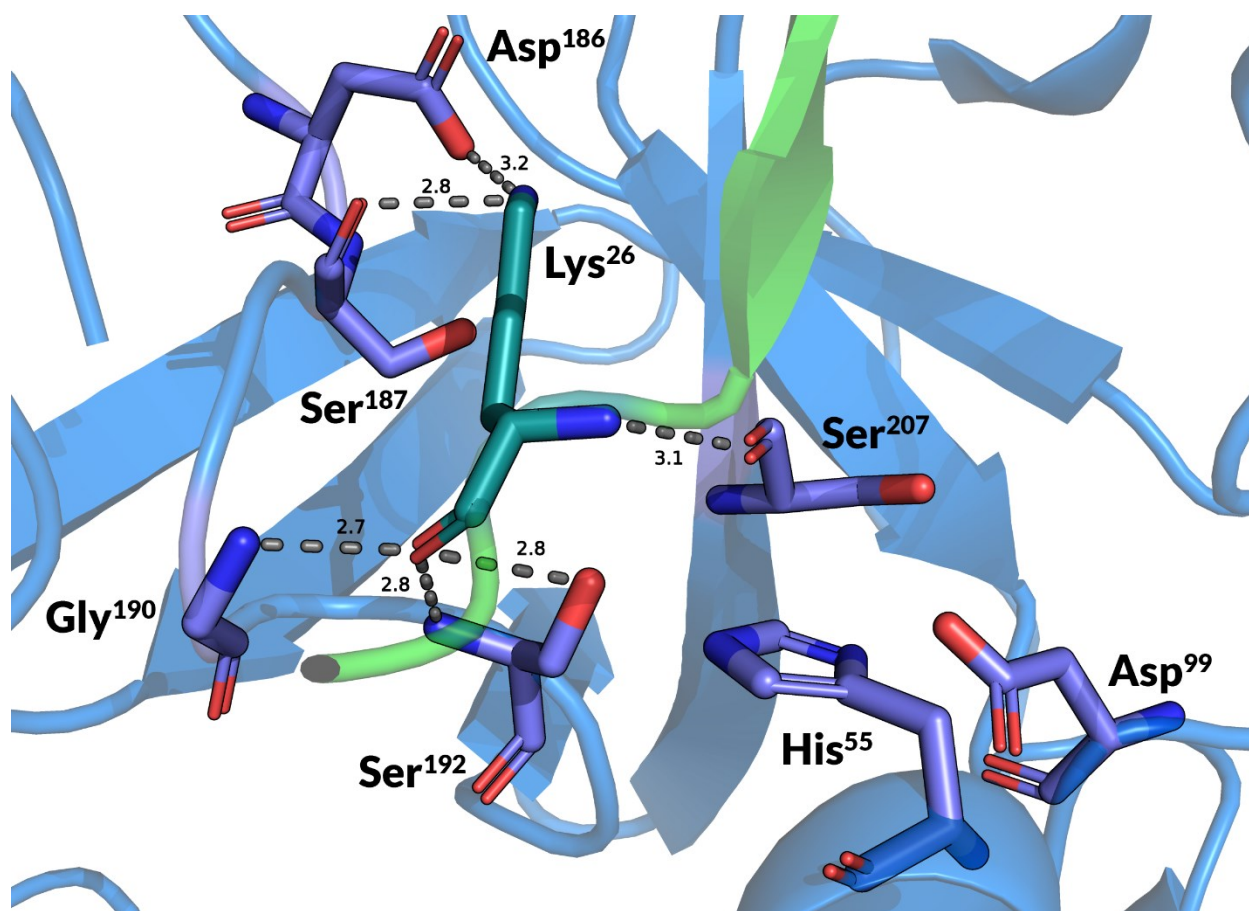


Figura 39. Contatos polares da Lys²⁶ do BTCI

Ainda que distante da cavidade reativa, o Glu²³ realiza mais interações de natureza não-covalente do que a Ser²⁷. Duas delas intramoleculares, com a Arg³³, e outra intermolecular, com a Gln¹⁷⁰⁽¹⁷⁵⁾ (figura 34). Por isso, sua

colaboração para a energia de interação foi maior, o que não é contraditório com a elevada participação da Ser²⁷ no mecanismo reacional.

Uma hipótese que pode justificar este resultado é a de o protocolo utilizado ser mais sensível para detectar interações não covalentes, refletindo-as na energia de interação. Com isso, ainda que um determinado resíduo participe ativamente do processo inibitório, esta participação não irá necessariamente afetar a energia de interação. Este é o caso da Ser²⁷. Mesmo sendo constituinte do sítio reativo do BTCl, sua importância foi decrescida em detrimento de outros resíduos. Tal fato reflete somente uma situação pontual oriunda da abordagem adotada, e não uma imagem realística do que de fato ocorre, uma vez que os cálculos foram realizados sem relaxamento. Deste modo, quanto mais um processo mecanístico for guiado por interações de natureza não covalente, melhor será sua representação pela metodologia PM6-D3H4/COSMO e DFTB3-D3H4X/COSMO. Isto é exatamente o que se dá em um grande número de processos bioquímicos, onde a interação entre duas proteínas é modulada por interações químicas fracas em suas respectivas superfícies. Este é um dos motivos pelos quais os resultados deste trabalho bem se correlacionam com o que se observa experimentalmente.

Em contrapartida, a seção final da curva mostrou uma tendência diferente daquela obtida no segmento inicial (figura 37). Aqui, a substituição por glicina causou uma diminuição da energia de interação. Ou seja, a mutação tornou o complexo mais estável, indicando que os resíduos nativos são desestabilizantes. Todavia, este ganho de estabilidade foi acompanhado de uma perda das interações não-covalentes, principalmente aquelas advindas de dispersão.

Para estes resultados serem coerentes, devem ser eliminadas tensões conformacionais pré-existentes quando da mutação por glicina, favorecendo o surgimento de novas interações atrativas. Confrontando esta possibilidade com a estrutura tridimensional do complexo, não foi possível identificar nenhum ganho, em termos de estabilização química, proveniente da mutação destes resíduos, que justifique uma diminuição de energia da ordem de 11,00 kcal.mol⁻¹. Assim sendo, o método pode ser impreciso para esta região.

Em relação aos resíduos da tripsina, a figura 40 mostra a contribuição para a energia de interação (em azul) e as interações não covalentes (em amarelo, cinza e vermelho).

Percebe-se que a correlação entre estas variáveis se dá de um modo mais complexo em relação ao que foi obtido anteriormente. A curva das energias de interação decresce com regularidade. Todavia, não é observada esta mesma tendência na do somatório das interações não covalentes.

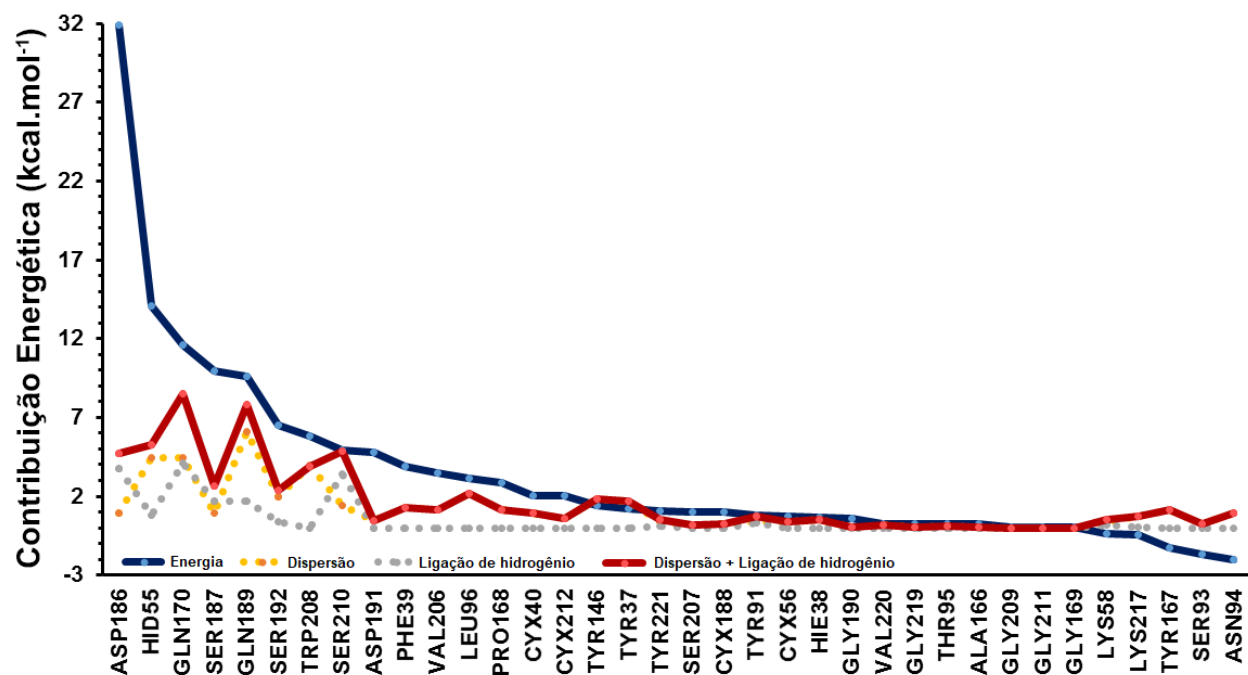


Figura 40. Contribuições para a energia de interação (em azul) e interações não covalentes (em amarelo, cinza e vermelho) associadas aos resíduos da tripsina na interface BTCl-tripsina

A região da tripsina mais participativa do processo inibitório é a tríade catalítica, com maior destaque para a Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾. Porém, pela metodologia aqui utilizada, a His⁵⁵⁽⁵⁷⁾ foi duas vezes mais colaborativa para a energia de interação quando comparada com a Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾. A soma das contribuições não covalentes pode justificar esta discrepância, posto que este valor é mais que o dobro para a His⁵⁵⁽⁵⁷⁾ - 5,27 kcal.mol⁻¹ para esta e 2,34 kcal.mol⁻¹ para aquela.

Um outro resíduo que merece atenção é a Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾. Fazendo parte do bolsão catalítico, é um dos primeiros pontos de contato com o BTCl. Sua posição na estrutura primária não é análoga à quimotripsina. Lá, o resíduo que ocupa esta

posição é uma metionina. Esta troca confere à cavidade reacional da tripsina um maior caráter hidrofílico. Tal efeito foi corroborado pela soma das interações não-covalentes. A Met¹⁹² e a Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾ exibem valores de 5,80 kcal.mol⁻¹ e 7,82 kcal.mol⁻¹, respectivamente. Com isso, comprova-se que, de fato, a troca de uma por outra acarreta em um aumento das interações atrativas advindas de contatos polares, favorecendo a ligação de espécies cujo centro reativo é hidrofílico.

Energeticamente, a Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾ e a Ser¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾ são equivalentes, diferenciando-se por apenas 0,36 kcal.mol⁻¹. Entretanto, a Ser¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾ é afetada de modo menos intenso pela perda das interações não covalentes. Deste modo, esperava-se que sua participação na energia de interação fosse consideravelmente menor que a da Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾. O que poderia, em tese, justificar esta divergência é a perda de algum outro elemento contributivo para a estabilidade da região mediante a mutação da Ser¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾ (que não aqueles advindos de interações não covalentes); ou a eliminação de forças repulsivas quando substituída a Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾.

Todas estas correlações são feitas com base em um modelo estático. Às vezes, a perda de interações se dará de modo claro e visível estruturalmente, como é o caso da Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾. Em outras situações, esta abordagem rígida dificilmente detectará tais alterações. No entanto, em ambas perspectivas, o que poderá fornecer mais embasamento para as análises é a realização de cálculos com os sistemas relaxados, ainda que em poucos pontos devido ao alto custo computacional envolvido.

Por fim, a última parte da figura 40 exibe um comportamento muito similar aquele encontrado em análises anteriores. A substituição por glicina estabilizou a interface, indicando que estes resíduos participam de interações repulsivas. Nota-se que esta mutação também é acompanhada da diminuição das forças atrativas não covalentes.

É importante salientar que, a partir do oitavo resíduo mais colaborativo para a energia de interação, os métodos PM6-D3H4/COSMO e DFTB3-D3H4X/COSMO divergiram em relação à magnitude desta colaboração. Grandes variações percentuais foram obtidas para resíduos que contribuem consideravelmente. O Asp¹⁹¹⁽¹⁹⁴⁾, por exemplo, apresentou valor aproximado de

5,00 kcal.mol⁻¹ pela metodologia PM6-D3H4/COSMO e -0,33 kcal.mol⁻¹ pela abordagem DFTB3-D3H4X/COSMO. Portanto, a análise das interações não covalentes é razoável somente para os primeiros resíduos do gráfico.

3.11 Análise da hidrofiliçidade da interface BTCl-tripsina

A hidrofiliçidade do bolsão catalítico da tripsina contribui para a seletividade das proteínas que irão a ela se ancorar. Além disso, como o ambiente eletrostático interno da tripsina é propício ao estabelecimento das mais fortes interações não covalentes (como as ligações de hidrogênio), há uma maior entrada de moléculas de água em sua cavidade reativa. Lá alocadas, podem desempenhar diversas funções, até mesmo estruturais.⁷⁷ Todavia, a mais relevante delas para o presente trabalho é a no mecanismo de reação.

Limitações técnicas dificultam o estudo pormenorizado do papel destas moléculas de água. Metodologias convencionais, como a difração de raios-x, dificilmente conseguem determinar com precisão a orientação e os estados rotacionais dos átomos de hidrogênio. Por ser difícil o acesso às respectivas coordenadas espaciais, muitas vezes se recorre ao uso de rotinas computacionais para estimar a localização destas moléculas e a posterior participação no mecanismo reacional. A primeira destas etapas é a dinâmica molecular; a segunda, uma combinação de abordagens na qual ao menos uma delas envolve cálculos de estrutura eletrônica, ainda que para uma região restrita do complexo – são os chamados métodos QM/MM. Este último estágio, adotado cada vez mais frequentemente, se tornou possível graças aos avanços tecnológicos que reduziram os custos computacionais. Em épocas passadas, todo o sistema era tratado de forma clássica.

Mesmo com o advento de ferramentas cada vez mais robustas, a primeira etapa de dinâmica molecular pode representar um gargalo metodológico. Por fornecer a estrutura inicial do ciclo quântico, uma geometria distante da realidade poderá dar origem a resultados incoerentes.

No início deste trabalho, adotou-se a estrutura do complexo ternário tripsina-BTCl-quimotripsina (ID 3RU4) como fonte das coordenadas espaciais necessárias para o desenho de todos os outros subsistemas binários. A resolução

deste sistema é de 1,68 Å. Com isso, as moléculas cristalográficas de água presentes na cavidade reacional podem ser perfeitamente observadas - com exceção dos átomos de hidrogênio.

A distribuição destas moléculas pode revelar o modo de participação no processo inibitório. Aqui, há duas regiões distintas. A primeira delas forma uma espécie de corredor hidrofílico, no qual a seção interna é exposta a grupos polares. Sendo formado pela Ser²¹⁰⁽²¹⁷⁾, Ala^{213(221A)}, Gln²¹⁴⁽²²¹⁾, Lys²¹⁷⁽²²⁴⁾, e Pro²¹⁸⁽²²⁵⁾, a disposição conformacional destes resíduos faz com que haja uma possível comunicação com o solvente, além de gerar um verdadeiro reservatório de moléculas de água (figura 41). Especialmente, nota-se que este segmento se encontra disposto quase que exclusivamente na parte mais externa da tripsina.

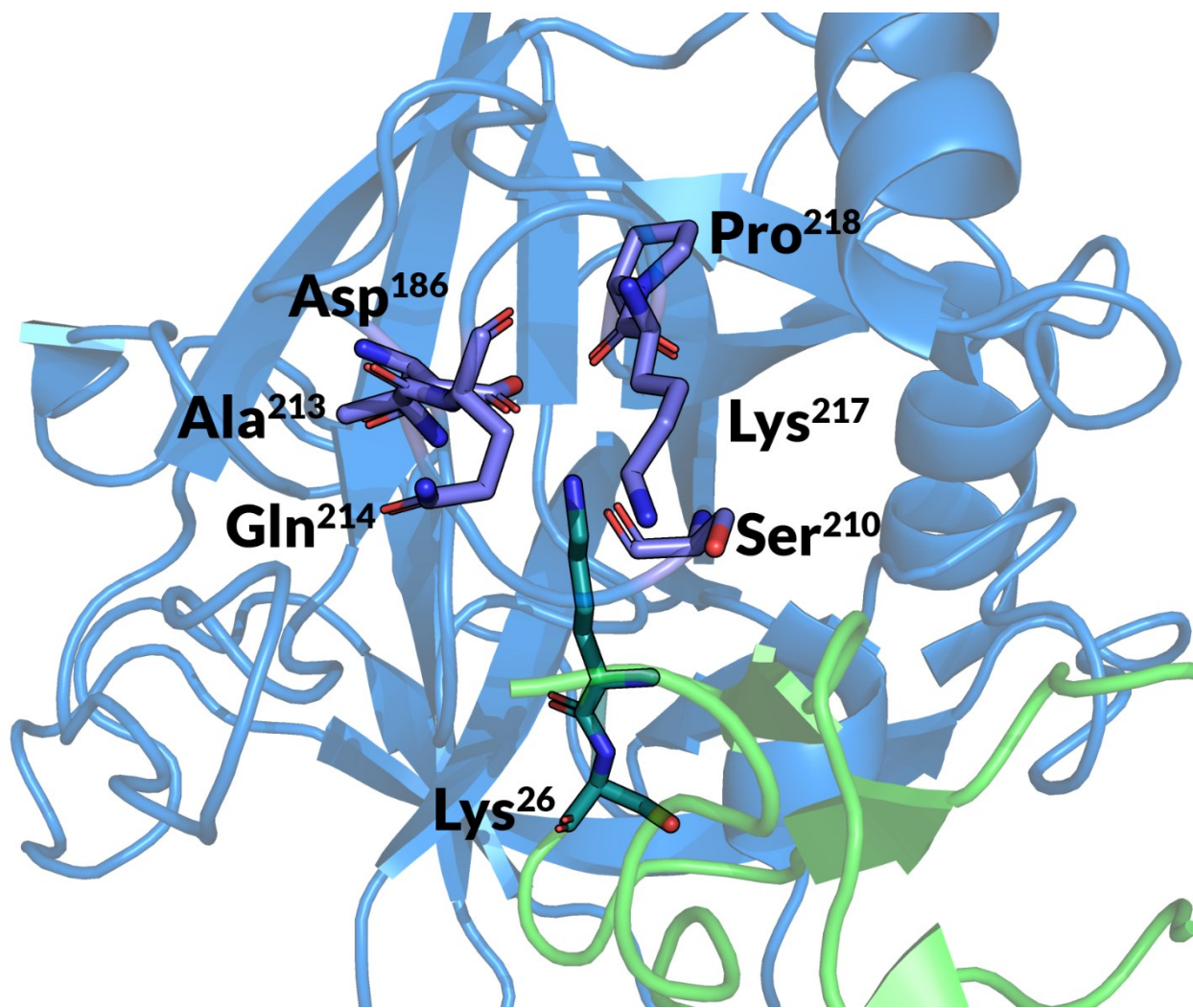


Figura 41. Corredor hidrofílico da tripsina exposto ao solvente, por onde podem entrar moléculas de água. É formado pelos resíduos Ser²¹⁰⁽²¹⁷⁾, Ala^{213(221A)}, Gln²¹⁴⁽²²¹⁾, Lys²¹⁷⁽²²⁴⁾, e Pro²¹⁸⁽²²⁵⁾

Na outra região, os resíduos Ser¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾, Val²²⁰⁽²²⁷⁾ e Tyr²²¹⁽²²⁸⁾, constitutivos do bolsão catalítico, diferentemente do que ocorre com a maioria dos citados anteriormente, estão localizados na parte mais interna (figura 42), dispendo seus grupos polares próximos da interação Lys²⁶-Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾. Como consequência, as moléculas de água próximas participam de um modo mais intenso do mecanismo reacional.

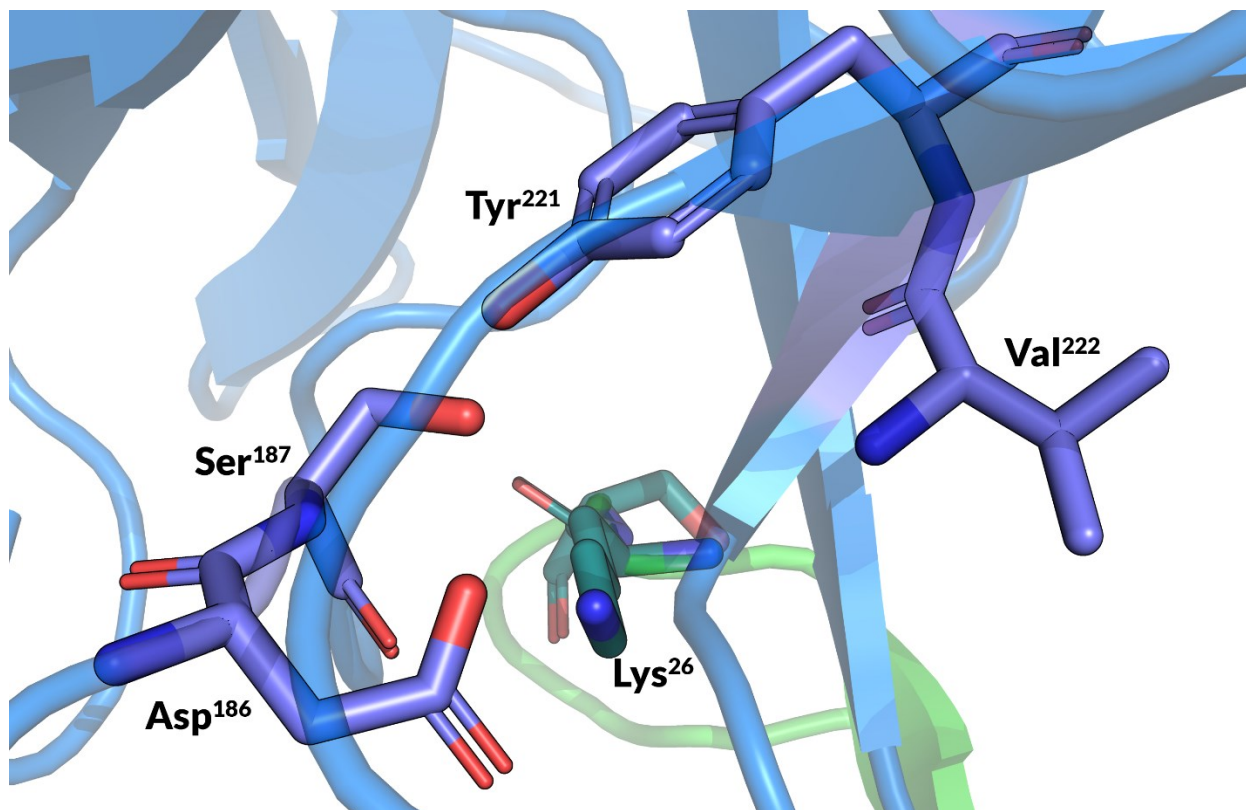


Figura 42. Sítio hidrofílico próximo da interação Lys²⁶-Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾, formado pelos resíduos Ser¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾, Val²²⁰⁽²²⁷⁾ e Tyr²²¹⁽²²⁸⁾

A análise dos resíduos mais importantes para a energia de interação, na tripsina, mostra uma tendência diferente das duas outras proteínas. Nelas, os mais relevantes foram da tríade catalítica ou do sítio reativo. Já na tripsina, o mais colaborativo - Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ - pertence ao bolsão catalítico. O resíduo da tríade mais próximo dele é a Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾, distando 10,2 Å (medida entre as porções mais extremas de ambas cadeias laterais).

Em vista disso, buscou-se quantificar o modo pelo qual a maior presença de moléculas de água no interior da tripsina pode influenciar os resíduos mais

importantes para a energia de interação, avaliando se estas moléculas apresentam alguma relação com o comportamento adverso mencionado anteriormente.

Em um primeiro momento, avaliou-se a variação da energia de interação mediante a adição das moléculas de água que se encontram próximas tanto do BTCl quanto da tripsina, a uma distância compatível com aquela necessária para o estabelecimento de ligações de hidrogênio. Deste modo, foram adicionadas 7 moléculas, identificadas pela numeração 11, 261, 264, 360 e 436, referentes à sequência da tripsina; bem como as moléculas 102 e 230, do BTCl. Na figura 43 percebe-se que três delas estão em vias de entrar no corredor hidrofílico (102, 261 e 264), enquanto uma outra já está presente (11). Por fim, também se observa uma próxima da interação $\text{Lys}^{26}\text{-Asp}^{186(189)}$ (436) e duas outras distantes do centro reativo (230, 360).

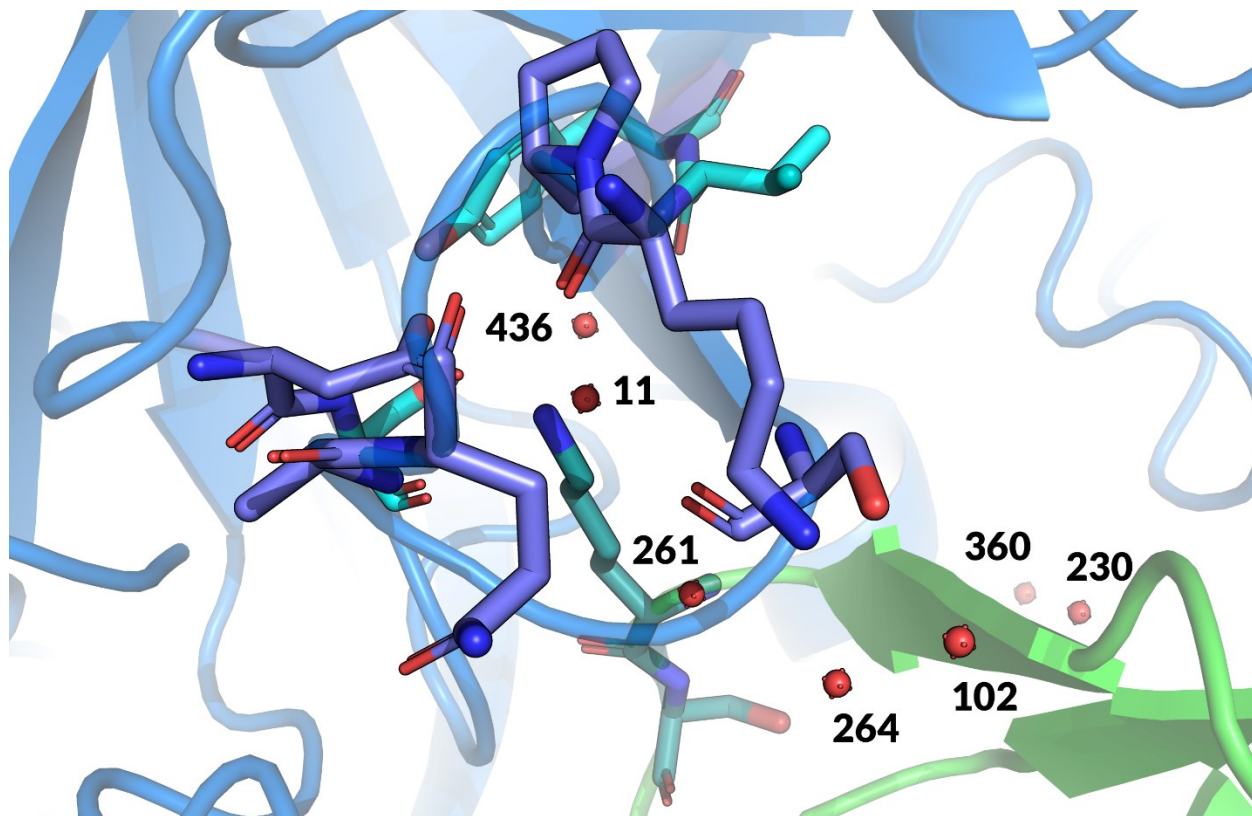


Figura 43. Representação das 7 moléculas de água adicionadas ao sistema BTCl-tripsina

Nos cálculos de energia para o sistema enzima-inibidor, foi utilizado o método PM6-D3H4/COSMO. A inclusão explícita de moléculas de água foi responsável por uma estabilização adicional de 47,49 kcal.mol⁻¹. Surpreendentemente, a contribuição destas poucas moléculas foi maior do que a de todos os resíduos quando analisados individualmente.

A presença de moléculas de água ao redor do Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ é uma característica altamente conservada em sistemas onde a tripsina é inibida ou atua cataliticamente. Em outras abordagens *in silico*, percebe-se que a presença destas moléculas, em serinoproteases de um modo geral, afeta drasticamente a entalpia de ligação. O mínimo descolamento em suas posições é refletido nesses valores de energia.¹⁰⁶ Em tais estudos, nota-se que este sítio de hidratação é uma das regiões mais energéticas em enzimas similares à tripsina, como a trombina e os fatores VIIa e Xa. Espécies capazes de promover um deslocamento nas moléculas de água deste sítio as inibem fortemente. Dessarte, os resultados aqui obtidos são correspondentes com o de outros estudos, evidenciando a forte participação energética das moléculas de água na inibição da tripsina pelo BTCl.

Uma vez demonstrada a alta contribuição da água para energia de interação, é importante determinar quais resíduos são mais influenciados por ela. Com isso, objetiva-se conhecer as regiões mais afetadas pelo estabelecimento de interações com as moléculas provenientes do solvente.

Para este tipo de estudo, o protocolo adotado nos outros cálculos deste trabalho pode ser utilizado. Foram realizadas, no novo sistema hidratado, mutações por glicina nos mesmos resíduos outrora analisados. Então, mediante um cálculo de energia, pela metodologia PM6-D3H4/COSMO, os efeitos da solvatação com as 7 moléculas de água são dados pela expressão:

$$CERh_x = (EiS_x - EiS_n) - CER_x$$

onde $CERh_x$ é a energia adicionada ou subtraída do resíduo x quando da hidratação, EiS_x a energia de interação do sistema hidratado que sofreu a mutação por glicina em x, EiS_n a energia de interação do sistema hidratado nativo e CER_x a contribuição energética do resíduo x, obtida nas etapas anteriores. É importante notar que a expressão entre parênteses representa a contribuição

energética de cada resíduo para o sistema hidratado. Deste modo, o termo $CERh_x$ expressa a influência das moléculas de água nessas espécies. Quanto maior for esta energia, maior será a interação existente entre a água e o resíduo analisado.

Os resultados destes cálculos, para a parte do BTCl, são expressos na figura 44. Nela, observa-se que muitos resíduos foram energeticamente beneficiados com a presença de moléculas de água, possivelmente por meio do surgimento de novas interações químicas. Pode-se inferir que estas interações são de natureza atrativa, posto que a hidratação acarretou ganho de estabilidade para o sistema como um todo, conforme exposto anteriormente.

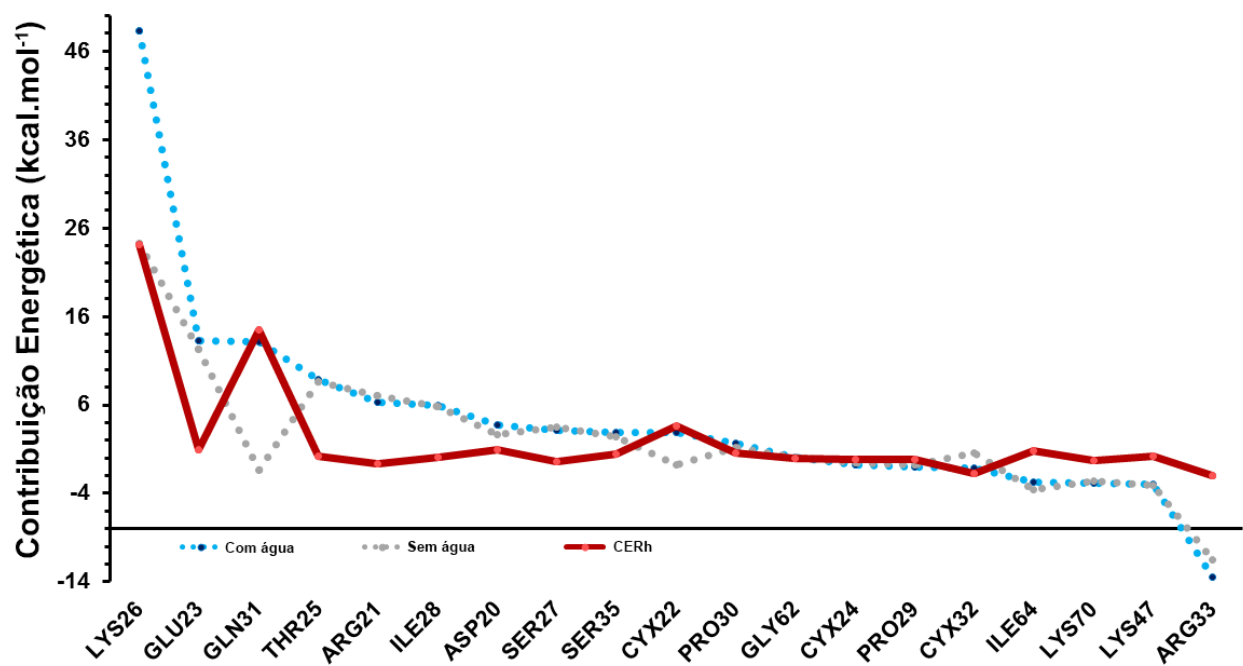


Figura 44. Efeitos energéticos da solvatação pelas 7 moléculas de água nos resíduos do BTCl na interface BTCl-tripsina (em vermelho), juntamente com a energia de interação do sistema com e sem solvatação (em azul e cinza, respectivamente)

A análise da figura 44 revela um ponto interessante. A Gln³¹, antes da solvatação, não era um centro que muito colaborava para a energia de interação. Incluídas as moléculas de água, uma delas foi posicionada entre as cadeias laterais da Gln³¹ e da Tyr⁹¹⁽⁹⁴⁾. Estando as partes mais externas destes grupos separadas por 4,1 Å, ligações de hidrogênio não são favorecidas. A partir da inserção da água, torna-se possível a formação de duas dessas ligações, posto que as distâncias entre ela e os oxigênios carbonílico e fenólico da Gln³¹ e

Tyr⁹¹⁽⁹⁴⁾ é de 2,6 Å e 2,4 Å, respectivamente (figura 45). Estas ligações intermediam o contato entre os dois resíduos, estabilizando a região.

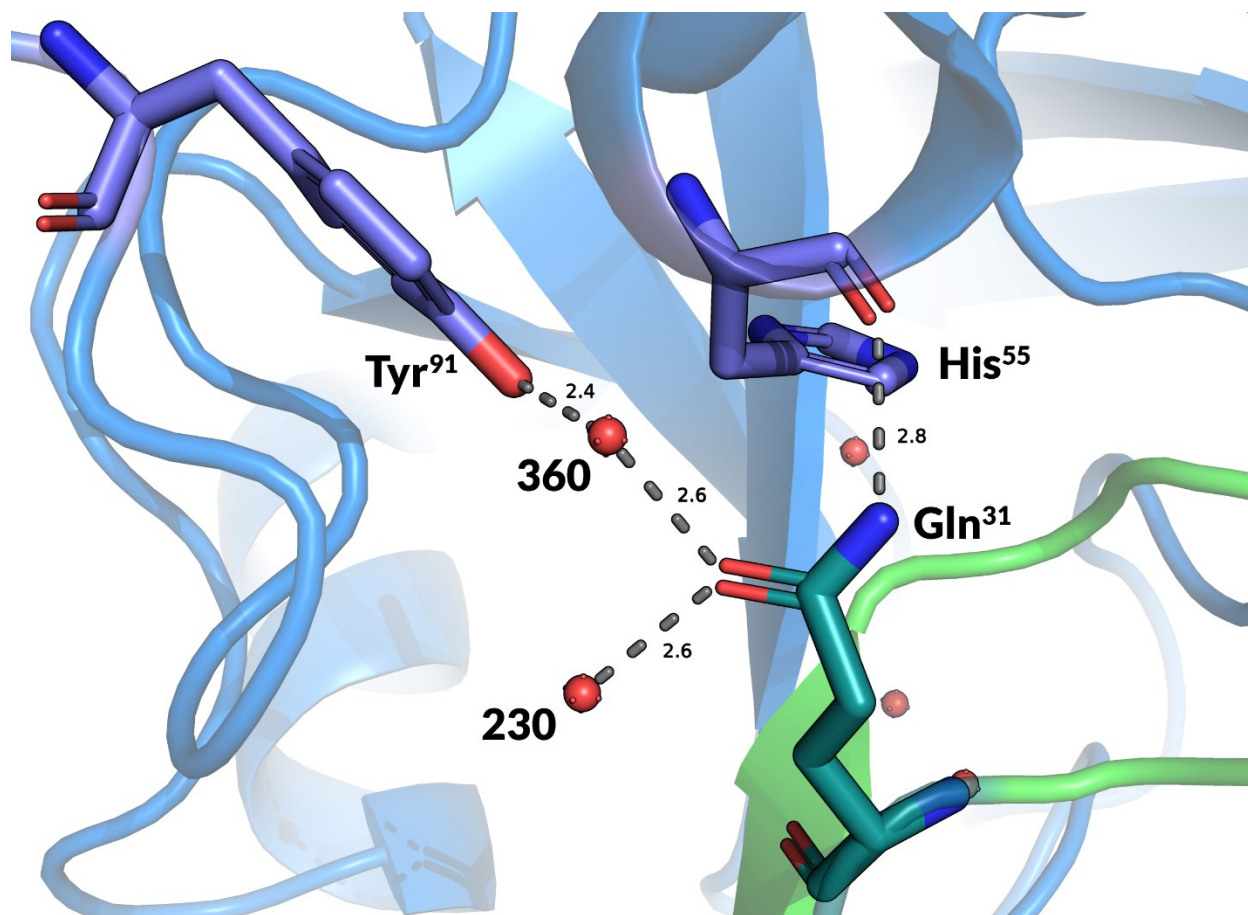


Figura 45. Interações próximas a Gln³¹ no sistema hidratado do complexo BTCL-tripsina

A estabilidade advinda dessas duas ligações de hidrogênio é refletida na contribuição para a energia interação. Após a hidratação, a participação da Gln³¹ aumenta em 13,11 kcal.mol⁻¹. Este efeito pode ser repercutido até na interação entre a Gln³¹ e a His⁵⁵⁽⁵⁷⁾. Uma vez que o oxigênio terminal da Gln³¹ se encontra ligado não covalentemente a duas moléculas de água, os hidrogênios de seu grupo amina podem, então, interagir mais fortemente com oxigênio da His⁵⁵⁽⁵⁷⁾, favorecendo a coesão à região (figura 45).

O resíduo onde são observadas as maiores reverberações da hidratação é justamente a Lys²⁶. A inspeção estrutural da região pode justificar não só este

resultado, mas também o resíduo mais colaborativo da tripsina, Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾, pertencente ao bolsão catalítico e não à tríade catalítica.

A partir da cadeia lateral da Lys²⁶, são estabelecidas importantes interações de natureza não-covalente (figura 46). Aqui, a mais relevante delas é a ponte salina com o Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾, podendo ser mediada por uma molécula de água. Esta molécula é observada cristalograficamente na estrutura do complexo ternário, quimotripsina-BTCI-tripsina (ID 3RU4); e binário, BTCI-tripsina (ID 2G81). Deste modo, a interação Lys²⁶-Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ é ainda mais reforçada quando o sistema é hidratado. Por isso, quando moléculas de água são adicionadas, a Lys²⁶ apresenta elevadíssima afinidade por elas, o que pode ser corroborado pelo efeito energético de 24,14 kcal.mol⁻¹ (figura 44, curva vermelha). Este é o motivo pelo qual ligações de hidrogênio passam a ter maior participação nas posições mais contributivas do sistema BTCI-tripsina (figuras 37 e 40, resíduos Lys²⁶ e Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾, curvas cinzas).

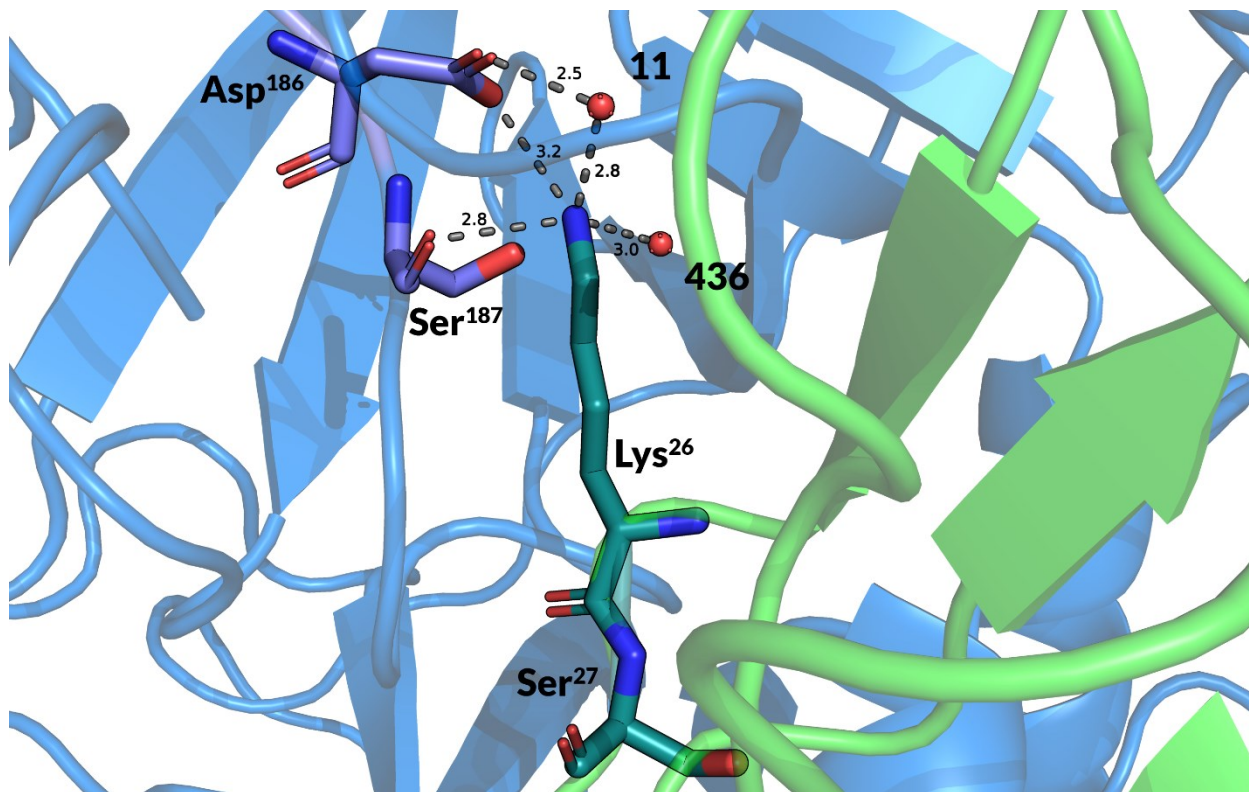


Figura 46. Interações entre a Lys²⁶, Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ e Ser¹⁸⁷⁽¹⁹⁰⁾, no sistema hidratado do complexo BTCI-tripsina

A influência das moléculas de água nesta região é tão intensa que são observados indícios de sua atuação determinando a taxa de entrada dos ligantes no sítio ativo da protease.¹⁰⁸ Além disso, a partir do primeiro contato entre a enzima e o inibidor, o arranjo destas moléculas será parcialmente alterado. Este fator é crucial para descrever o comportamento cinético e termodinâmico do processo de inibição.¹⁰⁸

Por tudo isso, pode-se dizer que o fato de a Lys²⁶ ser o resíduo mais contributivo do BTCl não é devido a sua presença no sítio reativo, mas sim às importantes interações estabelecidas por meio de sua cadeia lateral. É precisamente este argumento que pode justificar o resíduo mais colaborativo da tripsina, haja vista que as interações descritas são realizadas exatamente com o Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾, pertencente ao bolsão catalítico.

Os efeitos energéticos da solvatação para os resíduos da tripsina são apresentados na figura 47. De modo geral, as moléculas de água pouco influenciaram os resíduos da protease, de onde segue que a maior parte da estabilização advinda da adição destas moléculas é decorrência da interação entre elas e o BTCl.

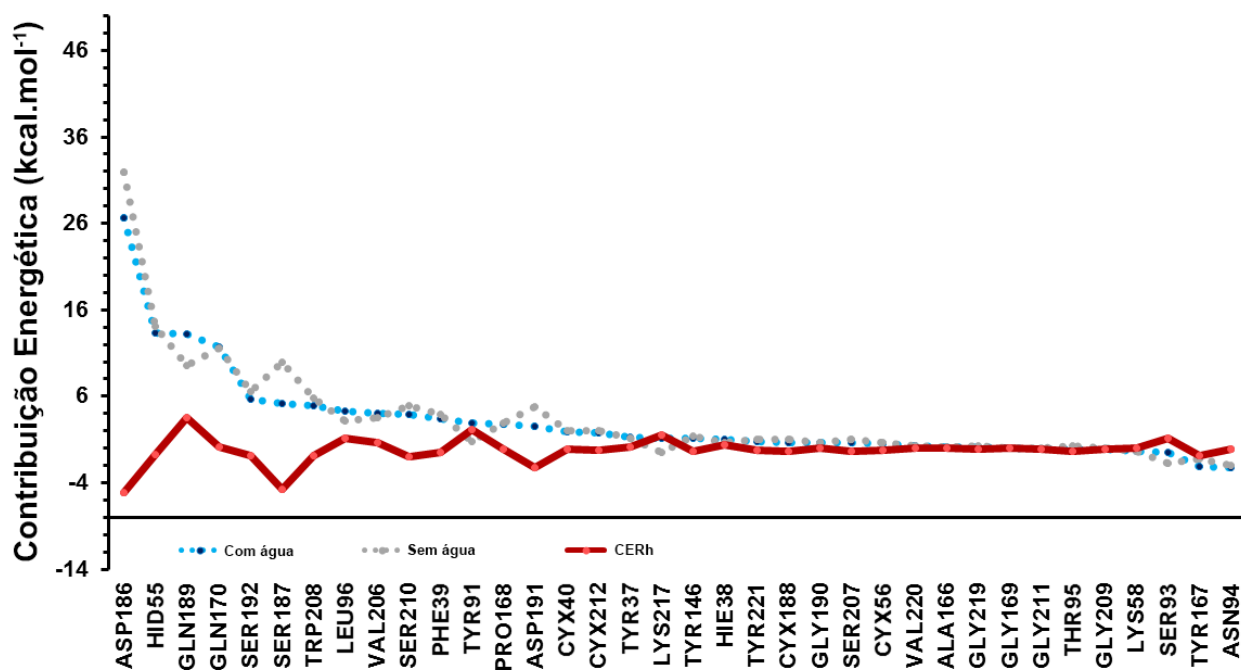


Figura 47. Efeitos energéticos da solvatação pelas 7 moléculas de água nos resíduos da tripsina na interface BTCl-tripsina (em vermelho), juntamente com a energia de interação do sistema com e sem solvatação (em azul e cinza, respectivamente)

Esta conclusão não contradiz que foi proposto anteriormente para o Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾, da tripsina. Mesmo que a adição de moléculas de água não resulte em consideráveis alterações energéticas neste resíduo, ainda assim dele podem surgir outros tipos de interações com as mais diversas espécies que não a água, contribuindo para energia de interação.

Finalmente, é importante ressaltar que uma maior ou menor participação dos resíduos na energia de interação pode não ser necessariamente consequência de uma interação direta com a água. Próxima da Arg³³, por exemplo, não há nenhuma destas moléculas. Contudo, a diferença de contribuição deste resíduo entre os sistemas com e sem solvatação foi de aproximadamente 3,00 kcal.mol⁻¹ (figura 44). Isso se justifica pelo fato de o sistema solvatado ser mais estável como um todo, o que altera a contribuição energética dos resíduos, mesmo eles não estabelecendo nenhuma interação com a água. Por isso, para prever a origem das alterações na energia, é necessária uma avaliação estrutural ao redor dos resíduos mutados, como a que foi aqui realizada.

PARTE V

Considerações Finais

1. Conclusão

O BTCI é um potente inibidor de serinoproteases, com amplas aplicações biotecnológicas. Uma de suas mais importantes características é capacidade de provocar efeitos citotóxicos e citostáticos em células de adenocarcinoma mamário. Neste trabalho, buscou-se amplificar este potencial de dois modos: com experimentos *in vitro*, aumentando sua biodisponibilidade mediante um processo de nanoencapsulamento em quitosana, por meio do método de gelificação iônica; e com experimentos *in silico*, prevendo as interações entre BTCI e proteínas alvo associadas a processos carcinogênicos.

No primeiro contexto, soluções com nanocápsulas de BTCI, em diferentes concentrações, foram aplicadas em culturas de células da linhagem MCF-7. Todos os ensaios apresentaram efeitos na viabilidade celular, mas de modo menos intenso em relação aos resultados na literatura para o tratamento com BTCI livre. Uma das causas sugeridas para a diminuição de atividade foi a obtenção de nanopartículas irregulares.

O uso do BTCI em um contexto oncológico ainda se mostra promissor. Por isso, é importante insistir nesta rota nanotecnológica, seja aprimorando o protocolo utilizado ou adotando um outro.

Nos experimentos computacionais, o uso combinado das metodologias PM6-D3H4/COSMO e SCC-DFTB3-D3H4X/COSMO, conjugado com um processo de fragmentação e posterior mutação por glicina, possibilitou identificar resíduos do BTCI e das serinoproteases mais relevantes para o processo inibitório.

Em um primeiro momento, o sítio reativo do BTCI foi indicado como a região que mais estabiliza a interface BTCI-quimotripsina. Tanto a Phe⁵³ quanto a Ser⁵⁴ foram elencadas como os resíduos mais colaborativos para a energia de interação. Logo após, os resíduos da ligação dissulfeto que auxilia a manutenção da conformação do sítio reativo foram destacados. Dentre as 14 cisteínas que constituem o inibidor, a Cys⁵¹ e a Cys⁵⁹ foram as que mais contribuíram energeticamente.

Na quimotripsina, a tríade catalítica teve sua relevância devidamente enfatizada, pois tanto a His⁵⁷ quanto a Ser¹⁹⁵ ocuparam a primeira e a segunda

posição dentre os resíduos mais colaborativos para a energia de interação, respectivamente. De modo semelhante, a Ser¹⁹⁵, Met¹⁹² e o Trp²¹⁵, resíduos do bolsão catalítico, também foram elencados como alguns dos mais importantes para a formação do complexo enzima-inibidor.

Já na interação entre o BTCL e a tripsina, o sítio reativo do inibidor foi devidamente caracterizado como a região mais influente desta molécula. A Ly^{s26} se mostrou o resíduo mais colaborativo para a energia de interação, e a Ser²⁷, o sétimo. Posteriormente, dois outros resíduos foram destacados. O Glu²³ e a Arg²¹, mesmo não participando diretamente no sítio reacional, formam importantes interações com a tripsina que auxiliam a ancoragem do inibidor. Além disso, o Glu²³ participa da formação das ligações de hidrogênio que dão forma à folha beta onde está localizado o loop no qual se encontra o sítio reativo do BTCL.

Em relação à tripsina, sua região mais ativa é a tríade catalítica, e dois dos resíduos que a compõem foram corretamente destacados. Tanto a Ser¹⁹²⁽¹⁹⁵⁾ quanto a His⁵⁵⁽⁵⁷⁾ colaboraram consideravelmente para a energia de interação, a ponto de serem o segundo e o sexto resíduos mais contributivos, respectivamente. O protocolo aqui utilizado também destacou dois importantes resíduos do bolsão catalítico. O Asp¹⁸⁶⁽¹⁸⁹⁾ e a Gln¹⁸⁹⁽¹⁹²⁾, além de estarem nesta região que é essencial para o processo inibitório, conferem a ela um caráter hidrofílico, determinando a seletividade da tripsina.

Os resultados apresentados formam um conjunto coeso e relevante. Primeiramente, a estratégia computacional é eficaz tanto para fornecer descrições estruturais de processos guiados majoritariamente por forças hidrofóbicas, quanto para identificar corretamente as interações que ocorrem em um ambiente hidrofílico.

Por outro lado, o protocolo computacional utilizado, por meio do qual podem ser descritas com precisão as interações entre as três proteínas analisadas, é aplicável a outros inibidores e proteases cujas estruturas se assemelham àquelas do BTCL, tripsina quimotripsina.

Reforçando essa possibilidade, o modelo estrutural dos sítios ativos da tripsina e da quimotripsina é encontrado em diversas outras proteínas que, por consequência, adotam o mesmo mecanismo conjugado de acetilação e

desacetilação abordado neste trabalho. Deste modo, o uso do protocolo aqui descrito pode ser estendido para diversos outros sistemas, possibilitando a obtenção de resultados que, experimentalmente, seriam por demais custosos.

Por meio de toda a análise realizada até aqui, observando como cada resíduo colabora para a energia de interação, foi possível atribuir significado estrutural a uma série de valores provenientes de uma nova abordagem *in silico*. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos pelos pesquisadores do laboratório de Biofísica da UnB. Portanto, ao transpor o contexto de bancada para uma realidade computacional, novas possibilidades de estudo são criadas, tais como a exploração do processo inibitório do proteassoma 20S pelo BTCl.

A segunda e última etapa do estudo computacional foi a análise da influência das moléculas de água na interface entre o BTCl e a tripsina.

Inicialmente, foi possível detectar um alto grau de estabilização energética a partir da presença de 7 moléculas de água. Este resultado está de acordo com dados experimentais, evidenciando, por meio de cálculos de estrutura eletrônica, o alto impacto de hidratações no processo inibitório. Mais especificamente, as moléculas de água têm papel decisivo no centro reativo. Se forem deslocadas, ainda que minimamente, podem alterar significativamente a taxa de inibição. Neste contexto, a metodologia deste trabalho foi adequada e eficaz para avaliar qualitativamente e quantitativamente as interações que ocorrem entre os resíduos da interface e as moléculas de água.

Dessarte, foi possível identificar a razão pela qual os resíduos do BTCl e da tripsina mais contribuem para a energia de interação, bem como definir de onde surgem as interações mais importantes. Além disso, este método também se mostrou viável para prever o comportamento de um dado resíduo mediante a comparação entre sua forma livre e hidratada, como o que ocorreu para com a Gln³¹.

Todos estes feitos são de elevado valor, posto que a tripsina serve como modelo de estudo de diversas outras proteases.¹⁰⁷ Sendo assim, esta metodologia pode ser, em princípio, aplicada em inúmeros outros sistemas, onde a presença de moléculas de água na cavidade reativa determina a dinâmica de reação e influencia a taxa de inibição.

Por fim, conclui-se que protocolo aqui utilizado poderá também contribuir para o desenho racional de fármacos, otimizando etapas, minimizando gastos e auxiliando na compreensão dos mecanismos reacionais que fazem parte da farmacodinâmica.

2 Referências bibliográficas

- 1 Kunitz, M., Northrop, J. H. (1936). Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J Gen Physiol* 19(6):991-1007.
- 2 Kunitz, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol* 29(3):149-154.
- 3 Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General Properties. *J Gen Physiol* 30(4):291-310.
- 4 Bowman, D.E. (1944). Fractions derived from soy beans and navy beans which retard tryptic digestion of casein. *Proc Soc Exp Biol Med* 57:139-140.
- 5 Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101(2635):668-669.
- 6 Bowman, D.E. (1946). Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 63(3):547-50.
- 7 Birk, Y., Gertler, A., Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochem J* 87(2):281-284.
- 8 Odani, S., Ikenaka, T. (1972). Studies on soybean trypsin inhibitors: IV. Complete amino acid sequence and the anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. *J Biochem* 71(5):839-848.
- 9 Birk, Y. (1968). Chemistry and nutritional significance of proteinase inhibitors from plant sources. *Anal NY Acad Sci* 146, 388-398.
- 10 Haynes, R., Feeney, R.E. (1967). Fractionation and properties of trypsin and chymotrypsin inhibitors from lima beans. *J Biol Chem* 242(22):5378-5385.
- 11 Frattali, V.P., Steiner, R.F. (1968). Soybean inhibitors. I. Separation and some properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry* 7(2):521-530.

12. Millar, D.B.S., Willick, G.E., Steiner, R.F., Frattali, V. (1969). Soybean inhibitors: IV. The reversible self-association of a soybean proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 244(2):281-284.
- 13 Frattali, V. (1969). Soybean inhibitors: III. Properties of a low molecular weight soybean proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 244(2):274-280.
- 14 Mehdad, A., Brumana, G., Souza, A.A., Barbosa, J.A.R.G., Ventura, M.M., Freitas, S.M. (2016). A Bowman–Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. *Cell Death Discovery* 2:15067.
- 15 Joanitti G.A., Azevedo R.B., Freitas S.M. (2010). Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer Letters* 293:73–81.
- 16 Souza, L.C., Camargo, R., Demasi, M., Santana, J.M., Sá, C.M., Freitas, S.M. (2014). Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells. *PLoS ONE* 9(1): e86600.
- 17 Bossola, M., Muscaritoli, M., Costelli, P., Grieco, G., Bonelli, G., Pacelli, F., Fanelli, F.R., Doglietto, G.B., Baccino, F.M. (2003). Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Ann Surg* 237: 384–389.
- 18 Loidl, G., Groll, M., Musiol, H.J., Huber, R., Moroder, L. (1999). Bivalency as a principle for proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(10):5418–5422.
- 19 Kisselev, A.F., Callard, A., Goldberg, A.L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 281(13): 8582–8590.
- 20 Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Löwe, J., Huber, R., Kloetzel, P.M., Schmidt, M. (1996). Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *The EMBO J* 15: 6887– 6898.

- 21 Fachetti, H.C., Mizuta, K., Ventura, M.M. (1984). Thermodynamics of the association of trypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An Acad brasil Cienc* 56 (3): 311-317.
- 22 Ventura, M. M., Xavier Filho, J. (1975). A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.) VI - Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin. *An Acad Brasil Ciênc* 38:553-566.
- 23 Stevens, C.L., Lauffer, M.A. (1965). Polimerization-depolimerization of tobacco mosaic virus protein. IV. The role of water. *Biochemistry* 4(1):31-37.
- 24 Jaenicke, R., Lauffer, M.A. (1969). Polimerization-depolimerization of tobacco mosaic virus protein. XII. Further studies on the role of water. *Biochemistry* 8(7):3083-3092.
- 25 Baugh, R.J., Trowbridge, C.G. (1972). Calorimetry of some trypsin-trypsin inhibitor reactions. *J Biol Chem* 247(23):7498-7501.
- 26 Freitas, S. M., Ikemoto, H., Ventura, M.M. (1999). Thermodynamics of the association of chymotrypsin with black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI) from *Vigna unguiculata* seeds. *Journal of Protein Chemistry* 18(3):307-313.
- 27 Laskowski Jr, M., Sealock, R.W. (1971). Protein proteinase inhibitors - molecular aspects. *The Enzymes* 3:375-473.
- 28 Silva, L.P., Azevedo, R.B., Morais, P.C., Ventura, M.M., Freitas, S.M. (2005). Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. *Proteins* 61(3):642-648.
- 29 Barbosa, J.A.R.G., Silva, L.P., Teles, R.C.L., Esteves, G.F., Azevedo, R.B., Ventura, M.M., Freitas, S.M. (2007). Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with b-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical Journal* 92:1638-1650.

30 Brand, G.D., Pires, D.A., Furtado, J.R.Jr., Cooper, A., Freitas, S.M., Bloch Jr, C. (2017). Oligomerization affects the kinetics and thermodynamics of the interaction of a Bowman-Birk inhibitor with proteases. *Arch Biochem Biophys* 618:9-14.

31 Wedemeyer, W.J., Welker, E., Narayan, M., Scheraga, H.A. (2000). Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry* 39:4207-4216.

32 Ventura, M.M., Xavier Filho, J. (1966). Trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*V. Sinensis* L.) I. Purification and partial characterization. *An Acad Bras Cienc* 38:553-566.

33 Catalano, M., Ragona, L., Molinari, H., Tava, A., Zetta, L. (2003). Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): solution structure and analysis of self association behavior. *Biochemistry*. 42:2836-2846.

34 Ikenaka, T., Norioka, S. (1986). Bowman-Birk family proteinase inhibitors. *Proteinase Inhibitor* 12: 361-374.

35 www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+mama/cancer_mama
Acessado em 10/09/2017

36 www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf
Acessado em 10/09/2017

37 Oliveira, S.A. (2012). Síntese e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo o inibidor de proteinases BTCl e peptídeos derivados. *Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.*

38 www.nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.1.1/
Acessado em 30/01/2017

39 www.molprobit.biochem.duke.edu/
Acessado em 30/01/2017

40 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(4):486-501.

41 Case, D.A., Cerutti, D.S., Cheatham III, T.E., Darden, T.A., Duke, R.E., Giese, T.J., Gohlke, H., Goetz, A.W., Greene, D., Homeyer, N., Izadi, S., Kovalenko, A., Lee, T.S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., Mermelstein, D., Merz, K.M., Monard, G., Nguyen, H., Omelyan, I., Onufriev, A., Pan, F., Qi, R., Roe, D.R., Roitberg, A., Sagui, C., Simmerling, C.L., Botello-Smith, W.M., Swails, J., Walker, R.C., Wang, J., Wolf, R.M., Wu, X., Xiao, L., York, D.M., Kollman, P.A. (2017). AMBER 2017, University of California, San Francisco.

42 Brahmshatriya, P. S., Dobeš, P., Fanfrlík, J., Řezáč, J., Paruch, K., Bronowska, A., Lepšík, M., Hobza, P. (2013). Quantum mechanical scoring: structural and energetic insights into cyclin-dependent kinase 2 inhibition by pyrazolo[1,5-a]pyrimidines. *Curr Comput Aid Drug* 9 (1): 118–129.

43 Rezac, J., Fanfrlik, J., Salahub, D., Hobza, P. (2009). Semiempirical quantum chemical PM6 method augmented by dispersion and H-bonding correction terms reliably describes various types of noncovalent complexes. *J Chem Theory Comput* 5:1749–1760.

44 Rezac, J., Hobza, P. (2012). Advanced corrections of hydrogen bonding and dispersion for semiempirical quantum mechanical methods. *J Chem Theory Comput* 8:141–151.

45 Rezac, J., Hobza, P. (2011). A halogen-bonding correction for the semiempirical PM6 method. *Chem Phys Lett* 506:286–289.

46 Gaus, M., Cui, Q., Elstner, M. (2011). DFTB3: extension of the self-consistent-charge density-functional tight-binding method (SCC-DFTB). *J Chem Theory Comput* 7 (4):931–948.

47 Pecina, A., Haldar, S., Fanfrlík, J., Meier, R., Rezac, J., Lepšík, M., Hobza, P. (2017). SQM/COSMO scoring function at the DFTB3-D3H4 level: unique identification of native protein-ligand poses. *J Chem Inf Model* 57 (2):127-132.

48 Catalano, M., Ragona, L., Molinari, H., Tava, A., Zetta, L. (2003). Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds

(*Medicago scutellata*): solution structure and analysis of self-association behavior. *Biochemistry* 42 (10):2836-46.

49 Song, H.K., Kim, Y.S., Yang, J.K., Moon, J., Lee, J.Y., Suh, S.W. (1999). Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 293 (5):1133-1144.

50 da Silva, L.P., Leite, J.R.S.A., Bloch Jr. C., Freitas, S.M. (2001). Stability of a black eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor (BTCI). *Protein & Peptide Letters* 8 (1):33-38.

51 Voss, R.H., Ermler, U., Essen, L.O., Wenzl, G., Kim, Y.M., Flecker, P. (1966). Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28-nm resolution. *European Journal of Biochemistry* 242 (1):122-131.

52 Esteves, G.F., Teles, R.C.L., Cavalcante, N.S., Neves, D., Ventura, M.M., Barbosa, J.A.R.G., Freitas, S.M. (2007). Crystallization, data collection and processing of the chymotrypsin-BTCI-trypsin ternary complex. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 63 (12):1087-1090.

53 Freitas, S.M., de Mello, L.V., Da Silva, M.C.M., Vriend, G., Neshich, G., Ventura, M. M. (1997). Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor- α -chymotrypsin complex. *FEBS Letters* 409 (2):121-127.

54 Steitz, T.A., Hendekson, R., Blow, D.M. (1969). Structure of crystalline α -chymotrypsin: III. Crystallographic studies of substrates and inhibitors bound to the active site of α -chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology* 46 (2):337-340.

55 Menard, R., Storer, A.C. (1992). Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases. *Biological Chemistry* 373 (2):393-400.

56 Glickman, M.H., Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* 82 (2):373-428.

57 Hershko, A. (1997). Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Current Opinion in Cell Biology* 9 (6):788-799.

- 58 King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., Kirschner, M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 274 (5293):1652-1659.
- 59 Wang, X., Luo, H., Chen, H., Duguid, W., Wu, J. (1998). Role of proteasomes in T cell activation and proliferation. *Journal of Immunology*. 160 (2):788-801.
- 60 Orłowski, R.Z. (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 6:303-313.
- 70 Almond, J.B., Cohen, G.M. (2002). The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 16 (4):433-443.
- 71 Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., Elliott, P.J. (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* (59):2615-22.
- 72 Gordon, C., McGurk, G., Dillon, P., Rosen, C., Hastie, N. D. (1993). Defective mitosis due to a mutation in the gene for a fission yeast 26S protease subunit. *Nature* 366 (6453):355-357.
- 73 Ghislain, M., Udvardy, A., Mann, C. (1993). *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature* 366(6453):358-362.
- 74 Radisky, E.S., Lee, J.M., Lu, C.J.K., Koshland Jr., D.E. (2006). Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (18):6835-6840.
- 75 Filipek, R., Potempa, J., Bochtler, M. (2005). A comparison of stapostatin B with standard mechanism serine protease inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (15):14669-14674.
- 76 Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M., Oleksy, A. (2005). The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J* 24 (7):1303-1310.
- 77 Lei, H., Smith, P.E. (2003). The effects of internal water molecules on the structure and dynamics of chymotrypsin inhibitor 2. *The Journal of Physical Chemistry B* 107 (6):1395-1402.

78 Guinto, E.R., Rose, T., Caccia, S., Futterer, K. (1999). Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (5):1852-1857.

79 Moreira, I.S., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2007). Hot spots - a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins* 68 (4)803-812.

80 Finkenstadt, W.R., Laskowski Jr, M. (1965). Peptide bond cleavage on trypsin-trypsin inhibitor complex formation. *J Biol Chem* 240:962-963.

81 Finkenstadt, W.R., Laskowski Jr, M. (1967) Resynthesis by trypsin of the cleaved peptide bond in modified soybean trypsin inhibitor. *J Biol Chem* 242:771-73.

82 Luthy, J.A., Praissman, M., Finkenstadt, W.R., Laskowski Jr, M. (1973). Detailed mechanism of interaction of bovine β -trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz): I. Stopped flow measurements. *J Biol Chem* 248(5):1760.

83 Quast, U., Engel, J., Steffen, E., Tschesche, H., Kupfer, S. (1978). Kinetics of the interaction of alpha-chymotrypsin with trypsin kallikrein inhibitor (Kunitz) in which the reactive-site peptide bond Lys¹⁵-Ala¹⁶ is split. *Eur J Biochem* 86:353-360.

84 Ozawa, K., Laskowski Jr, M. (1966). The reactive site of trypsin inhibitors. *J Biol Chem* 241(17):3955-3961.

85 Laskowski Jr, M., Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 49:593-626.

86 Laskowski, M., Sealock, R. W. (1971). 11 protein proteinase inhibitors – molecular aspects. *The Enzymes* 3:375-473.

87 Jering, H., Tschesche, H. (1975). Replacement of lysine by arginine, phenylalanine and tryptophan in the reactive site of the bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz) and change of the inhibitory properties. *European Journal of Biochemistry* 61 (2):453-463.

88 Ma, W., Tang, C., Lai, L. (2005). Specificity of trypsin and chymotrypsin: loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant. *Biophysical Journal* 89(2):1183-1193.

89 Vajda, T., Szabó, T. (1975). Specificity of trypsin and alpha-chymotrypsin towards neutral substrates. *Acta Biochimica et Biophysica* 11 (4):287-294.

90 Huber, R., Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc Chem Res* 11(3):114-122.

91 Ako, H., Foster, R.J., Ryan, C.A. (1974). Mechanism of action of naturally occurring proteinase inhibitors. Studies with anhydrotrypsin and anhydrochymotrypsin purified by affinity chromatography. *Biochemistry* 13:132-139.

92 Brady, K., Wei, A.Z., Ringe, D., Abeles, R.H. (1990). Structure of chymotrypsin-trifluoromethyl ketone inhibitor complexes: comparison of slowly and rapidly equilibrating inhibitors. *Biochemistry* 29 (33):7600-7607.

93 Kay, J., Kassell, B. (1971). The autoactivation of trypsinogen. *J Biol Chem* 246:6661-6665.

94 Morgan, P.H., Robinson, N.C., Walsh, K.A., Neurath, H. (1972). Inactivation of bovine trypsinogen and chymotrypsinogen by diisopropylphosphorofluoridate. *Proc Natl Acad Sci USA* 69(11):3312-3316.

95 Steitz, T. A., Shulman, R. G. (1982). Crystallographic and NMR Studies of the Serine Proteases. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* (11):419-444.

96 Zhang, Y., Kua, J., McCammon, J. A. (2002). Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. *Journal of the American Chemical Society* 124(35):10572-10577.

97 Khan, H., Khan, M.A., Hussan, I. (2007). Enzyme inhibition activities of the extracts from rhizomes of *Gloriosa superba* Linn (Colchicaceae). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 22(6):722-725.

- 98 Nair, V.P., Hunter, J.M. (2004). Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 4(5):164–168.
- 99 Roth, C.M., Neal, B.L., Lenhoff, A.M. (1996). van der Waals interactions involving proteins. *Biophysical Journal* 70(2):977-987.
- 100 Luthy, J.A., Praissman, M., Finkenstadt, W.R., Laskowski Jr, M. (1973). Detailed mechanism of interaction of bovine β -trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz): I. Stopped flow measurements. *J Biol Chem* 248(5):1760.
- 101 Sweet, R.M., Wright, H.T., Janin, J., Chothia, C.H., Blow, D.M. (1974). Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6 Å resolution. *Biochemistry* 13(20):4212-4228.
- 102 Janin J., Sweet R.M., Blow D.M. (1974). The mode of action of soybean trypsin inhibitor as revealed by crystal structure analysis of the complex with porcine trypsin. *Proteinase Inhibitors* 5:513-520.
- 103 Lodish, H.F. *Molecular Cell Biology*. 8^o ed. New York: W.H. Freeman, 2016.
- 104 Leary, T.R., Laskowski Jr, M. (1973). Enzymatic replacement of Arg⁶³ by Trp⁶³ in the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) – An intentional change from tryptic to chymotryptic specificity. *Fed Proc* 32:465.
- 105 Jering, H., Tschesche, H. Replacement of lysine by arginine, phenylalanine and tryptophan in the reactive site of the bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz) and change of the inhibitory properties. (1976). *Eur J Biochem* 61(2):453-63.
- 106 Abel, R., Salam, N.K., Shelley, J., Farid, R., Friesner, R.A., Sherman, W. (2011). Contribution of explicit solvent effects to the binding affinity of small-molecule inhibitors in blood coagulation factor serine proteases. *Chem Med Chem* 6:1049-1066.
- 107 Talhout, R., Villa, A., Mark, A.E., Engberts, J.B.F.N. (2003). Understanding binding affinity: a combined isothermal titration calorimetry/molecular dynamics study of the binding of a series of hydrophobically modified

benzamidinium chloride inhibitors to trypsin. *Journal of the American Chemical Society* 125(35):10570-10579.

108 Schiebel, J., Gaspari, R., Wulsdorf, T., Ngo, K., Sohn, C., Schrader, T.E., Cavalli, A., Ostermann, A., Heine, A., Klebe, G. (2018). Intriguing role of water in protein-ligand binding studied by neutron crystallography on trypsin complexes. *Nature Communications* 9(1):33559.

109 Koontz, L. (2014). TCA precipitation. *Methods in Enzymology* 541:3-10.

110 Duong-Ly, K.C., Gabell, S.B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology* 541:85-94.

111 Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A., Baker, N.A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue): W665-W667.

112 Williams, C.J., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Prisant, M.G., Videau, L.L., Deis, L.N., Verma, V., Keedy, D.A., Hintze, B.J., Chen, V.B., Jain, S., Lewis, S.M., Arendall, W.B., Snoeyink, J., Adams, P.D., Lovell, S.C., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2018). MolProbity: more and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science* 27(1):293-315.

113 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(4):486-501.

114 Case, D.A., Ben-Shalom, I.Y., Brozell, S.R., Cerutti, D.S., Cheatham III, T.E., Cruzeiro, V.W.D., Darden, T.A., Duke, R.E., Ghoreishi, D., Gilson, M.K., Gohlke, H., Goetz, A.W., Greene, D., Harris, R., Homeyer, N., Huang, Y., Izadi, S., Kovalenko, A., Kurtzman, T., Lee, T.S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., Mermelstein, D.J., Merz, K.M., Miao, Y., Monard, G., Nguyen, C., Nguyen, H., Omelyan, I., Onufriev, A., Pan, F., Qi, R., Roe, D.R., Roitberg, A., Sagui, C., Schott-Verdugo, S., Shen, J., Simmerling, C.L., Smith, J., Salomon-Ferrer, R., Swails, J., Walker, R.C., Wang, J., Wei, H., Wolf, R.M., Wu, X., Xiao, L., York, D.M., Kollman, P.A. (2018), AMBER 2018, University of California, San Francisco.

115 Acikara, O.B. (2013). Ion-exchange chromatography and its applications. *Column Chromatography* pp.31-58.

116 Levison, P. (2003). Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins - Comparison of different formats. *Journal of Chromatography* 790(1):17-33.

117 Patil, P., Chavanke, D., Wagh, M.A. (2012). A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4:27-32.

118 Santana, S.P., Salazar, N., (2020). Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International* 69 (5):443-447.

119 Giri, T.K. (2016). Nanoarchitected polysaccharide-based drug carrier for ocular therapeutics. *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting* pp.119-141.

120 Yassue-Cordeiro, P.H., Severino, P., Souto, E.B., Gomes, E.L., Yoshida, C.M.P., de Moraes, M.A., da Silva, C.F. (2018). Chitosan-based nanocomposites for drug delivery. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery* pp.1-26.

121 Sacco, P., Paoletti, S., Cok, M., Asaro, F., Abrami, M., Grassi, M., Donati, I. (2016). Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. *Int J Biol Macromol* 92:476-483.

122 Koukaras, E.N., Papadimitriou, S.A., Bikiarius, D.N., Froudakis, G.E. (2012). Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate. *Mol Pharmaceutics* 9(10):2856-2862.

123 Wu, J., Wang, Y., Yang, H., Liu, X., Lu, Z. (2017). Preparation and biological activity studies of resveratrol loaded ionically cross-linked chitosan-TPP nanoparticles. *Carbohydr Polym* 175:170-177.

124 Masarudin, M.J., Cutts, S.M., Evison, B.J., Phillips, D.R., Pigram, P.J. (2015). Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer

drug delivery: application to the passive encapsulation of [(14)C]-doxorubicin. *Nanotechnology, Science and Applications* 8:67-80.

125 Cánepa, C., Imperiale, J.C., Berini, C.A., Lewicki, M., Sosnik, A., Biglione, M.M. (2017). Development of a drug delivery system based on chitosan nanoparticles for oral administration of interferon- α . *Biomacromolecules* 18(10):3302-3309.

126 Taheri, A., Jafari, M.S. (2019). Nanostructures of gums for encapsulation of food ingredients. *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes* 1:521-578.

127 Jafari, S.M., McClements, D.J. (2017). Nanotechnology approaches for increasing nutrient bioavailability. *Advances in Food and Nutrition Research* (81):1-30.

128 Rao, K.N., Suresh, C.G. (2007). Bowman-Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1774 (10):1264-1273.

3 Trabalhos publicados

1 Honda, D.E., Martins, J.B.L., Ventura, M.M., Lepsik, M., Hobza, P., Pecina, A., Freitas, S.M. (2018). Interface interactions of the Bowman-Birk inhibitor BTCl in ternary complex with trypsin and chymotrypsin evaluated by semiempirical quantum mechanical calculations. *European Journal of Organic Chemistry* 268:181-189.

2 de Freitas, M.A.G., Amaral, N.O.D.A., Álvares, A.C.M., de Oliveira, S.A., Mehdad, A., Honda, D.E., Bessa, A.S.M., Ramada, M.H.S., Naves, L.M., Pontes, C.N.R., Castro, C.H., Pedrino, G.R., de Freitas, S.M. (2020). Blood pressure-lowering effects of a Bowman-Birk inhibitor and its derived peptides in normotensive and hypertensive rats. *Scientific reports* 10:15.

4 Patentes

1 Freitas, S.M., Álvares, A.C.M., Freitas, M.A.G., Garay, A.V., Honda, D.E., Oliveira, I.C.M., Pedrino, G.R., Castro, C.H., Amaral, N.O., Pontes, C.N.R., Naves, N.M., Ramada, M.H.S. Composições compreendendo proteína e peptídeos cíclicos derivados de *Vigna unguiculata*, variedade seridó, e seu uso para o desenvolvimento de medicamentos antihipertensivos. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202100346, título: "Composições compreendendo proteína e peptídeos cíclicos derivados de *Vigna unguiculata*, variedade seridó, e seu uso para o desenvolvimento de medicamentos antihipertensivos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 24/02/2021.

5 Apresentações orais

1 VI Simpósio de Estrutura Eletrônica e Dinâmica Molecular, 2016

2 VII Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, 2017

3 VIII Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, 2018

6 Participações em eventos

1 VIII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos

7 Certificados





**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2021 003461 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00038174000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: CENTRO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO -
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY
RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT, ASA NORTE

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70904-970

País: Brasil

Telefone: (61)3107-4100/4137

Fax:


Email: nupitec@cdt.unb.br

VI SEEDMOL

SIMPÓSIO DE ESTRUTURA ELETRÔNICA
E DINÂMICA MOLECULAR

Certificado de Apresentação Oral

A Comissão Organizadora do VI Simpósio de Estrutura Eletrônica e Dinâmica Molecular, atesta para os devidos fins, que Diego Elias Honda, apresentou o trabalho: “The Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds (BTCI) in complex with Trypsin: a molecular orbital study”, na forma de palestra no VI SeedMol, realizado entre os dias 19/09/2016 e 23/09/2016, na cidade de Alto Paraíso, GO.


Prof. João B. L. Martins
Coordenador Geral do VI SeedMol





Pós-Graduação
Biologia Molecular




VII Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Brasília - DF 08 a 10 Novembro 2017

CERTIFICADO

Certificamos que **Diego Elias Honda** realizou apresentação oral do trabalho intitulado **“ESTUDO ESTRUTURAL DA INTERFACE DOS COMPLEXOS BINÁRIOS ENTRE O INIBIDOR DE PROTEASES BTCI E A TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA”** no VII Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, realizado na Universidade de Brasília, de 08 a 10 de novembro de 2017.


Prof.ª. Dra. Sonia Maria de Freitas
Coordenadora do PPG-BioMol-UnB



Pós-Graduação
Biologia Molecular




VIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Brasília - DF 07 a 09 Novembro 2018

CERTIFICADO

Certificamos que **Diego Elias Honda** apresentou na forma oral o trabalho intitulado **“Interações das Interfaces do Complexo Ternário entre o Inibidor de Bowman-Birk BTCI e a quimotripsina e a tripsina avaliadas por meio de cálculos semi-empíricos”** durante o VIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, realizado nos dias 07 a 09 de novembro de 2018.


Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
Coordenador do PPG-BioMol-UnB

VIII Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos

Certificado

DIEGO ELIAS HONDA

A Comissão Organizadora certifica que foi apresentado na forma de pôster, na VIII Escola de Modelagem Molecular em Sistema Biológicos, realizada no período de 22 a 26 de agosto de 2016 no Laboratório Nacional de Computação Científica, o trabalho **"The Bowman-Birk inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds (BTCI) in complex with Trypsin: a molecular orbital study"** (no. 92), de autoria de **Honda, D. E; J. B. L. Martins; S. M. Freitas.**



8 E M S B

Luiz Emmanuel Dardenne

p/comissão organizadora



“

Como o fogo
Que devora a mata,
Como a labareda
Que incendeia
Os montes,
Persegui-os com a
Vossa Tempestade,
Apavorai-os com
O vosso furação.

Cobri-lhes a
Face da ignomínia,
Para que, vencidos,
Busquem, Senhor,
O vosso nome.

Enchei-os de
Vergonha e
De humilhação
Eternas, que
Eles pereçam
Confundidos

E que
Reconheçam
Que só vós, cujo
Nome é Senhor,
Sois o altíssimo
Sobre toda a terra

”

Sl 82, 15-19.