

Márcio Tadeu Pereira

**AVALIAÇÃO TERMODINÂMICA COMPLETA DA INTERAÇÃO ENTRE A
 β -TRIPSINA E OS INIBIDORES BENZAMIDINA E BERENIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências –
Área de concentração: Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro (ICB/UFMG)

Co-Orientador: Prof. Dr. Júlio César Dias Lopes (ICEx/UFMG)

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2005

Dedico este trabalho aos meus pais o Senhor Mário e à Dona Ate.

Também o dedico à Fátima, Samantha, Gustavo, Mário André e Pedro Henrique,
companhias inseparáveis da minha casa.

Agradecimentos

Ao pessoal do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear pela confiança em mim depositada, pelo apoio e incentivo: Dr. Silvestre Paiano Sobrinho; Dr. Luiz Carlos Duarte Ladeira; Dra. Cláudia Schayer Sabino; Carlos Manoel de Assis Soares.

Ao pessoal do Laboratório de Irradiação Gama do CDTN que cumpriram com partes das minhas tarefas durante a execução deste trabalho: Fausto Carvalho, Perpétua, Pablo e Ferracini.

À secretária do Curso, Celise Maria Ferreira Costa, por todas às vezes nas quais prontamente me auxiliou.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais: Marco Túlio, Abdul, Caroline, Rosane e Rafaela pela atenção e simpatias.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia e Físico Química de Proteínas Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia, pelo apoio que me propiciaram tantas vezes: Janeth; Jacqueline; Jamil; Malú; Tiago; Wanderley; Helen e Caroline.

Ao Andrelly Martins José, do ICEx, pela ajuda na modelagem molecular.

Aos professores do Curso de Bases Moleculares que não apenas cumpriam um compromisso funcional mas atuavam de fato como orientadores e incentivadores.

Ao Prof. Dr. Marcelo Porto Bemquerer pelas dicas importantes passadas na execução dos trabalhos no Laboratório.

Aos Professores Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares, Dr. Edyr Rogana e Dr. Amintas Fabiano de S. Figueiredo pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Júlio César Dias Lopes, pelo apoio e orientação.

Ao Prof Dr. Marcelo Matos Santoro, pela acolhida, orientação, atenção e apoio.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de Figuras	v
RESUMO	vii
1- ASPECTOS GERAIS DA INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS (EM PARTICULAR TRIPSINA) E LIGANTES	
1.1 – Introdução	2
1.2 – O Meio Aquoso Intracelular	10
1.3 – Arranjo Estrutural da Tripsina	15
1.4 – Sistema Formado por Macromoléculas, Água e Osmólitos	27
2 – MATERIAIS E MÉTODOS - Prospecção da Interação entre a Tripsina e Ligante Baseada em Princípios da Termodinâmica	34
Objetivos	36
Objetivo principal	36
Objetivos específicos	36
2.1 - Materiais e Métodos	37
2.1.1 - Materiais e Reagentes Utilizados	37
2.1.2 - Purificação da Tripsina Comercial	38

2.1.3 - Controle da proteína ativa e confirmação da pureza da enzima	41
2.1.4 - Titulação da β -Tripsina	41
2.1.5 - Titulação no ITC	43
2.1.6 - Avaliação do envolvimento de dissociação ou associação de prótons no processo de associação para a formação dos complexos β -tripsina-inibidores	45
2.1.7 - Titulação da β -Tripsina sob Estresse Osmótico	46
2.1.8 - Modelagem computacional dos complexos β -tripsina-inibidores	47
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 – Obtenção da β -Tripsina	49
3.2 – Estabilidade da β -Tripsina	51
3.3. – Titulação calorimétrica	55
3.4 – Modelagem molecular	72
4 – CONCLUSÕES	81
5 – REFERÊNCIAS	82
Adendo 1 – Equações da Termodinâmica	

Lista de Abreviaturas

L-BApNA	Benzoil argininil p-nitroanilida
Berenil	4-(4-carbamidoilfenil)aminoazobenzamidina
DMSO	Dimetil sulfóxido
PDB	Protein Data Bank
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
ITC	Isothermal Titration Calorimeter
NPGB	p-guanidinobenzoato de p-nitrofenila
PIPES	Ácido 1,4-piperazindietanosulfónico
Veronal	Ácido 5,5-dietilbarbitúrico

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Variações de entalpia para as associações entre a β -tripsina com os inibidores benzamidina (bz) e berenil (be) em função do ΔH de diferentes tampões.	58
Tabela 3.2 – Parâmetros energéticos relativos à associação dos inibidores benzamidina e berenil com a β -tripsina sob situação de estresse osmótico	60
Tabela 3.3. Componentes energéticos teóricos relativos à associação da β -tripsina com os inibidores indicados	73

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Mapa de potencial eletrostático da β -tripsina	7
Figura 1.2 – Estruturas químicas: A) benzamidina; B) cadeia lateral da Lys; C) cadeia lateral da Arg; D) berenil.	9
Figura 1.3 – Alinhamento dos resíduos do quimotripsinogênio A bovino, tripsinogênio catiônico bovino, tripsinogênio catiônico humano, tripsinogênio aniônico humano e mesotripsinogênio humano	18
Figura 1.4 – Estrutura tridimensional da tripsina	21
Figura 1.5 – Contatos intermoleculares entre a β -tripsina catiônica bovina e o inibidor BPTI	25
Figura 1.6 – Contatos intermoleculares entre a β -tripsina catiônica bovina e o inibidor BPTI e contatos mediados por moléculas de água	26
Figura 1.7 - Representação pictórica da enzima ATCase	32
Figura 1.8 – Representação esquemática do método do estresse osmótico	33
Figura 2.1 – Representação esquemática do funcionamento do ITC	44
Figura 3.1 - Cromatograma típico das corridas de purificação da β -Tripsina	50
Figura 3.2 – Estabilidade da β -tripsina à temperatura ambiente	52
Figura 3.3 – Influência do íon Ca^{2+} na atividade amidásica da β -tripsina	53
Figura 3.4 - Termogramas da titulação calorimétrica da interação da β -tripsina com o berenil	55-57
Figura 3.5 – ΔH medido para as associações entre a β -tripsina com os inibidores benzamidina e berenil em tampões PIPES, HEPES, Tricina e Tris	59

Figura 3.6 – Determinação de variações da capacidade calorífica para os sistemas β -tripsina-benzamidina e β -tripsina-berenil.	63
Figura 3.7 - Dependência de ΔG e ΔH com $T\Delta S$	65
Figura 3.8 – Dependência da constante de formação dos complexos de β -tripsina com os inibidores benzamidina e berenil em função da atividade da água	68
Figura 3.9 - Parâmetros energéticos envolvidos na associação da tripsina com benzamidina, berenil e <i>p</i> -aminobenzamidina	71
Figura 3.10 - Interações da benzamidina (A), <i>p</i> -aminobenzamidina (B) e berenil (C) com resíduos da β -tripsina no sítio catalítico S1 e vizinhanças	77-78

RESUMO

No presente estudo é feita uma análise detalhada da complexação da β -tripsina por dois inibidores competitivos sintéticos, benzamidina e berenil. Este trabalho visa caracterizar parâmetros relevantes da interação enzima-inibidor e que propiciem diretrizes para o planejamento de novos fármacos para ação sobre serino proteases; enzimas responsáveis por processos fisiológicos vitais de virtualmente todas as espécies; e conseqüentemente por condições patológicas resultantes do seu descontrole, carecendo portanto, nesses casos, serem reguladas por via exógena. A tripsina é ela mesma uma enzima muito importante nesse contexto e é adicionalmente considerada como protease modelo da classe das serino proteases. Foi desenvolvido um protocolo expedito para a purificação da β -tripsina e foram estabelecidas condições operacionais de modo que o processo de formação dos complexos β -tripsina-inibidores fossem estudados com a exclusão de interferências indesejáveis nos resultados como, por exemplo, a influência da concentração de CaCl_2 . É feita uma análise da possível contribuição de moléculas de água de hidratação para a estabilização da enzima ou dos complexos. Com esta finalidade foram estabelecidos os parâmetros termodinâmicos da associação da β -tripsina pancreática bovina com os dois inibidores citados, em tampão Tris 50 mM; com CaCl_2 25 mM; pH 8,0, a 25 °C. O uso da titulação calorimétrica isotérmica e algoritmos associados à técnica permitiram que fossem determinados, para os dois complexos: a relação estequiométrica, N; a constante de associação, K; variações na energia livre de Gibbs, ΔG ; variações de entalpia, de entropia e de capacidade calorífica, respectivamente, ΔH , ΔS e ΔC_p . Dentre os dados chama a atenção o fato do berenil apresentar uma

constante de associação, portanto afinidade, cerca de 12 vezes maior que a da benzamidina para a formação do complexo. $K_{\text{benzamidina}}$ é igual a $49.500 \pm 2.700 \text{ M}^{-1}$ e K_{berenil} é igual a $596.600 \pm 25.000 \text{ M}^{-1}$. Demonstra-se que esta afinidade aumentada não é devida ao caráter diretor de interações hidrofóbicas. As variações nas capacidades caloríficas, considerada atualmente como uma assinatura dessas interações, em ambos os sistemas são bastante similares: ΔC_p é igual a $-477,1 \pm 86,8 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ para o sistema com benzamidina, e igual a $-464,7 \pm 23,9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ para o sistema com berenil. É descrita a prospecção baseada no método do estresse osmótico feita para avaliar a influência do envolvimento de moléculas de água nos processos de formação dos adutos, sendo descartada neste caso qualquer contribuição diferencial. Em ambos os sistemas estimam-se em cerca de 26 o número de moléculas de água que se associam aos complexos independentemente dos inibidores testados. Este número está acoplado à exclusão de cerca de 5 moléculas de água da fenda catalítica, levando ao número líquido de 21 moléculas de água observado experimentalmente. Com o recurso de modelagens moleculares, neste caso incluindo a p-aminobenzamidina na análise, é demonstrado que a maior afinidade do berenil pela β -tripsina deve ser devida ao número maior de interações, particularmente ligações de hidrogênio, formadas fora da fenda do sítio catalítico S1. Estes dados permitem concluir que os derivados da benzamidina que propiciem ligações de hidrogênio, ou possivelmente interações coordenadas tipo $\pi-\pi$, fora da fenda catalítica devem resultar em inibidores mais efetivos para as serino proteases.

1- ASPECTOS GERAIS DA INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS (EM PARTICULAR TRIPSINA) E LIGANTES

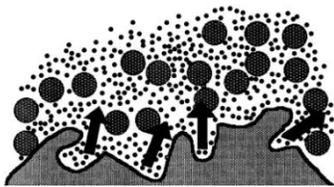


Figura de V.J. LiCata e N.M. Allewell. *Methods in Enzimology*, 1998, 295:42-62

“The study of organisms which have adapted to conditions of dehydration, heat, or high osmotic activity provides a look at how nature has approached the problem of maintaining a functional viable organism under conditions which might normally be expected to denature or inactivate a large number of that organism’s macromolecules”. Marcelo M. Santoro, Yufeng Liu, Saber M. A. Khan, Li-Xiang Hou, and D. W. Bolen. *Biochemistry*, 1992, 31:5278-83.

Introdução

As serinoproteases constituem uma classe de enzimas com funções amplamente diversificadas, essenciais para processos fisiológicos vitais de virtualmente todas as espécies. Entender o seu funcionamento, as causas da sua desregulação e especialmente a participação em processos patológicos são diretrizes fundamentais para a química medicinal moderna. Fármacos com alvos sobre estas proteases atingiriam praticamente todos os tipos de doenças. Há ainda a possibilidade de benefícios industriais a partir desses estudos já que essas proteases têm ampla utilização em biotecnologia. As características especiais dessa classe são a utilização da tríade de resíduos serina, histidina e ácido aspártico para o processo de catalise e uma marcante similaridade estrutural; embora existam exceções raras à tríade como na protease do citomegalovirus humano, formada por serina, histidina e histidina [01]. Atualmente a classe é dividida em cinco grupos ou famílias em função de peculiaridades estruturais: quimotripsina, subtilisina, serinocarboxipeptidase II; protease do citomegalovirus humano e componente proteolítico ClpP da protease dependente de ATP [02].

Essas enzimas são objetos de exaustivos estudos. Na última década houve um grande acúmulo de dados de alta qualidade em termos de caracterizações de estruturas primárias, de seqüências genômicas, estruturas tridimensionais, constantes cinéticas e termodinâmicas para substratos e inibidores [02]. Esse grande interesse é conseqüente da diversidade de funções que executam e do espectro extremamente amplo de especificidades a substratos [03].

Dentre os processos fisiológicos relacionados às atividades das serinoproteases estão: ativação de zimogênios, produção de peptídeos farmacologicamente ativos; digestão; coagulação sanguínea [04]; fertilização [05]; ativação da resposta imune, via complemento [06] e em outros processos como enfisemas [07]; metástase de tumores [08], artrites [9] e processos degenerativos neuroniais [10]. A diversidade de funções, a especificidade a substratos e inibidores, constitui também um atrativo para estudos de estrutura e atividade, particularmente para estudos de mecanismos de catálise ou de inibição. Nesta linha se enquadram os estudos com enzimas da família da quimotripsina, um modelo clássico das serinoproteases, cujos componentes mais estudados são a quimotripsina, a tripsina, a elastase, a trombina e a calicreína. Também nessa linha se enquadra o trabalho de Mares-Guia e Shaw com a benzamidina [11], um inibidor da tripsina, que ensejou a derivação de um grande número de inibidores dessa protease [03], e que estabeleceu um marco importante na bioquímica em termos de correlação entre estrutura e atividade.

Nos últimos anos tem crescido o número de estudos e de evidências de que proteases dessa classe, produzidas para ação no aparelho digestivo, têm também excreção endócrina. Isto, interpretado como desvio de funcionalidade, como causa de pancreatite, ou como reciclagem de enzimas absorvidas no intestino, é hoje considerado como um mecanismo natural, sendo elas expressas em diversos órgãos; embora com funções ainda não totalmente definidas [12]. Dessas, a mais proeminente é a tripsina cuja concentração no sangue se situa em 12,5 nM; cerca de 5 a 12 vezes maior que outras enzimas digestivas e 300 vezes superior à concentração da insulina [13, 14].

A tripsina é uma enzima que se destaca dentro da classe. A visão tradicional acerca dessa protease é a de que ela é produzida pelo pâncreas em níveis elevados em situação normal, como um zimogênio, o tripsinogênio. O tripsinogênio experimenta secreção exócrina, sendo lançado nos dutos dessa glândula através dos quais é conduzido para o intestino delgado onde sofre uma hidrólise, perdendo os seis resíduos iniciais. Com a hidrólise surge a forma enzimaticamente mais ativa, a β -tripsina.

Formas diferentes do tripsinogênio foram também identificadas em tecido extrapancreático, embora com funções ainda não completamente esclarecidas. É também expresso em níveis comparáveis aos do pâncreas, em situação normal, no fígado e no intestino delgado. É amplamente expresso em células epiteliais da pele, esôfago, estômago, pulmão, rim e duto biliar extra-hepático, assim como em células do baço e neuronais. A tripsina é também encontrada em macrófagos, monócitos e linfócitos. Tal distribuição da produção da tripsina indica ter ela funções específicas na manutenção de processos normais de células epiteliais, do sistema imune e do sistema nervoso central [12].

Atualmente são conhecidas quatro isoformas do tripsinogênio humano: tripsinogênio 1, ou catiônico; tripsinogênio 2, ou aniônico [15, 16], mesotripsinogênio [17] e tripsinogênio IV, também conhecido como tripsinogênio cerebral [18]. Há indicações de que a proteína seja resultante de duplicações gênicas tandemicas a partir de um gene ancestral codificando para apenas 5 ou 6 aminoácidos [19]. Nove genes do tripsinogênio humano foram seqüenciados até hoje. Eles foram identificados como um produto secundário de um grande esforço para o seqüenciamento do receptor β de células T

(TCR β). Esses genes do tripsinogênio flanqueiam os genes desses receptores e se dispõem em tandem no cromossomo 7 (7q35) [20].

O tripsinogênio 1, ou catiônico, corresponde a cerca de 10% dos componentes protéicos do suco pancreático [21]. Esse zimogênio pancreático, a sua forma enzimaticamente ativa, a β -tripsina, e o inibidor natural dessa, secretado pelo pâncreas, são provavelmente as proteínas mais estudadas em termos de estrutura e cinética enzimática. Esse interesse é devido principalmente ao envolvimento delas na pancreatite, sendo proteínas fáceis de se obter e com boa estabilidade. O estado patológico também é motivo de muito estudo, embora ainda careça de consenso acerca da etiologia. Sabidamente a pancreatite pode ser de natureza hereditária ou adquirida. De acordo com a classificação adotada em 1988 as doenças pancreáticas inflamatórias são representadas pelas formas aguda, crônica, fibrose e abscessos [22]. Até o presente a pancreatite hereditária é relacionada com dezenove mutações específicas no gene da forma catiônica [23]. Nenhuma outra mutação em qualquer outra enzima digestiva foi ainda correlacionada com a doença [24]. Existem evidências de que ocorre autodigestão da glândula ocasionada pela ativação prematura de enzimas digestivas, o que resulta na lise de membranas, edema, hemorragia intersticial, necrose, evoluindo rapidamente para a destruição do parênquima [25]. Nos Estados Unidos aproximadamente 210.000 pacientes são admitidos em hospitais anualmente com pancreatite aguda. A doença representa portanto um significativo fator de detrimento populacional [26].

O tripsinogênio 2, ou aniônico, representa entre um terço à metade do tripsinogênio total produzido pelo pâncreas. A tripsina aniônica é produzida de modo

similar à catiônica mas possui eficiência catalítica cerca de duas vezes superior, o que faz com que ambas executem eqüitativamente a digestão de outras proteínas no intestino delgado [27]. Na pancreatite, câncer pancreático e alcoolismo crônico há uma reversão característica na razão de produção das duas isoformas, considerada como um mecanismo de autoregulação da função pancreática. Redução na produção da forma catiônica resulta em proteção contra a degradação da glândula e agravamento da doença [16].

O tripsinogênio 3, ou mesotripsinogênio [16], é o de menor quantidade dentre os três encontrados no suco pancreático, representando de 3 a 10 % do tripsinogênio produzido. A sua principal característica é a resistência aos inibidores naturais da tripsina [28, 29] e parece estar relacionado com a hidrólise e inativação desses; contidos nos alimentos; impedindo que prejudiquem a ação da tripsina na sua função digestiva. Parece também estar relacionado com a inativação do inibidor pancreático natural da tripsina, atuando na auto-regulação da pancreatite [29].

O tripsinogênio IV, também conhecido como tripsinogênio cerebral, foi originalmente identificado em neurônios e é considerado como sendo um variante do mesotripsinogênio por “splice” alternativo. Difere desse no exon 1, no qual falta uma seqüência do peptídeo sinal. A sua função ainda não foi completamente esclarecida [30].

Algumas características da β -tripsina são marcantes. Uma é a alta afinidade por lisina e arginina nos substratos, cerca de 10^5 vezes maior que para qualquer outro resíduo [02]. Outra é a ocorrência de uma depressão na superfície da molécula formando uma bolsa onde se aloja a cadeia lateral de resíduos para que ocorra a hidrólise da ligação

peptídica [11]. O modelo então proposto pode ser visualizado através de cristalografia de raios X [31] e através de modelagem computacional [32], como reproduzido na Figura 1.1.

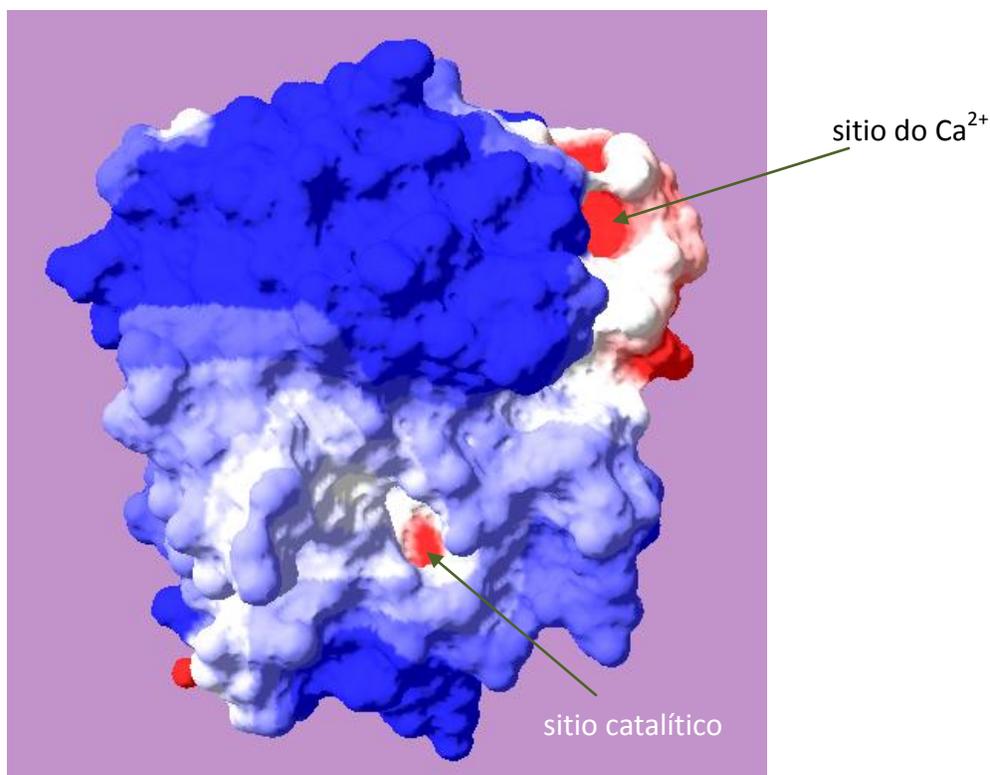


Figura 1.1 – Mapa de potencial eletrostático da β-tripsina. A cor azul representa potencial positivo; a vermelha potencial negativo e o branco potencial neutro. As variações de tonalidade de azul e vermelho são gradações nos potenciais. A bolsa de alojamento da cadeia lateral do aminoácido no qual ocorre a hidrólise aparece na parte mais inferior ao centro da figura. Chama-se a atenção para o potencial negativo ao fundo da bolsa, criado pelo carboxilato do resíduo Asp¹⁸⁹ (ou, Asp¹⁷⁷ segundo a notação baseada na seqüência primária da tripsina). Figura produzida com o programa DeepView/Swiss-PdbViewer, v3.7 [32] a partir da estrutura da tripsina complexada com benzamidina (pdb id 1CE5 [31]). Elaboração da figura com remoção da benzamidina para a visualização da bolsa e caráter hidrofílico do fundo.

Outra característica importante é a ocorrência de autólise, um evento considerado como um mecanismo de regulação da sua ação e que ocorre devido à emergência de cadeias laterais de arginina e de lisina na sua estrutura. Uma quarta característica é a profusão de inibidores naturais, tanto de origem animal quanto de origem vegetal, protéicos ou não protéicos [33; 34].

A expressão de inibidores da tripsina e os mecanismos das suas interações constituem um vasto campo de exploração, seja para se definirem os parâmetros que os regulam ou para aplicações na medicina e na biotecnologia. Por exemplo, um tópico atinente recentemente introduzido na discussão científica é a produção de inibidores por células tumorais e a aplicabilidade de medições das concentrações dessas proteínas no diagnóstico de cânceres e metástases [35-40], ou ainda a sua possível ação anticarcinogênica [41].

Decifrar os princípios dinâmicos que governam a associação de proteínas é crucial para a compreensão da rede de eventos em que participam, das suas funções e mau funcionamento, e para projetar inibidores que formem complexos com constantes de associação suficientemente adequadas para uso como fármacos. Existem diversos mecanismos e modelos propostos para explicar as interações intermoleculares, o reconhecimento e a associação [42-44].

A benzamidina é uma substância modelo para os estudos destas interações, por apresentar algumas características estruturais similares aos aminoácidos Arg e Lys. Vide Figura 1.2. É totalmente protonada no pH fisiológico, também apresenta possibilidade de interações lipofílicas e um grupo amidina equivalente. Derivados da benzamidina são

amplamente aplicados em estudos de afinidade de associações enzima-ligante, interações estéricas e principalmente eficiência catalítica. Por exemplo, é comprovada a influência de substituintes indutores de elétrons na posição *para* do anel benzênico, com os doadores incrementando a associação do inibidor à tripsina e os grupos atraentes agindo em sentido contrário [45, 46]. Um desses derivados da benzamidina, o berenil, uma bisbenzamidina, Figura 1.2 (D), vem sendo estudado como fármaco de ação sobre o DNA. O objetivo principal dos estudos, envolvendo substituições na estrutura, é o de maximizar a ação do fármaco sobre o DNA e minimizar a ação sobre serinoproteases endógenas.

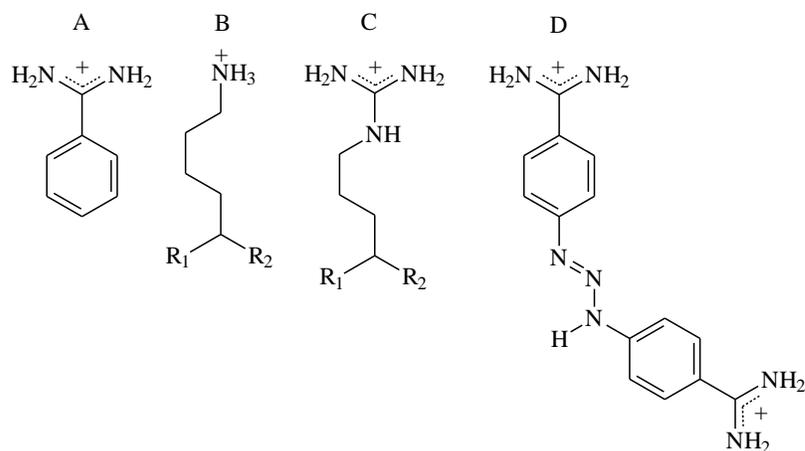


Figura 1.2 – Estruturas químicas: A) benzamidina; B) cadeia lateral da Lys; C) cadeia lateral da Arg; D) berenil.

1.2 – O Meio Aquoso Intracelular

A fisiologia, seja celular ou orgânica, é totalmente dependente de mecanismos de reconhecimento e de interações intermoleculares precisos, de modo que especialização e mecanismos de regulação constituem os arcabouços da vida. Entretanto a composição faz do interior celular um ambiente completamente congestionado por milhares de diferentes tipos de moléculas como por exemplo água; íons e moléculas orgânicas de composição, tamanhos e funções diversas.

Embora o ambiente celular seja formado por uma miríade de espécies reativas, inúmeros mecanismos e situações são bem estabelecidos. A primeira situação é que toda a química, incluindo a química de sistemas biológicos, pode ser interpretada com base em apenas três fatores físicos inter-relacionados: energéticos, estruturais e dinâmicos. Os fatores energéticos podem ser considerados os principais uma vez que regulam o comportamento dinâmico e estrutural das moléculas e conseqüentemente a reatividade [47].

Sob o aspecto físico a água assume uma posição central nos processos biológicos. A vida começou e os processos se desenvolveram em meio aquoso; nunca escapando dele [48]. Ela possui características que lhe são peculiares. Pode agir tanto como um solvente quanto como um reagente. Tem uma capacidade calorífica elevada, tornando-se uma excelente reguladora da temperatura na superfície terrestre assim como no interior celular. Ademais, apresentando uma constante dielétrica alta associada à sua capacidade de interação com grupos polares ou com grupos carregados, modera as forças atrativas ou repulsivas ente as biomoléculas, permitindo-lhe envolvê-las e separá-las no processo de

solvatação. Quando pura forma até quatro ligações de hidrogênio por molécula, num arranjo tetraédrico ordenado que se estende por todo o volume [49]. Este arranjo e as ligações de hidrogênio fazem com que a água apresente coeficientes de expansão térmica e de compressibilidade baixos, comparativamente a outros solventes, mantendo o volume relativamente constante em um amplo intervalo de temperatura e de pressão. Estas propriedades permitem “uma ampla janela” de temperatura e de pressão nas quais os complexos biomoleculares são estáveis e funcionais.

Um outro aspecto amplamente aceito para explicar a ação de biomoléculas, principalmente as proteínas, é a especificidade da sua estrutura. A função das proteínas como essenciais ao suporte à vida foi estabelecido por Berzelius em 1838 [50], mas o(s) mecanismo(s) através do(s) qual(is) uma proteína atinge o seu estado funcional, no processo conhecido como enovelamento, ainda é motivo de muitas pesquisas [51, 52]. Não obstante há uma linha em que o conhecimento tem se desenvolvido, definindo-se como essenciais à função das proteínas a necessidade de que elas adquiram uma estrutura tridimensional bem definida. Essa linha teve início com o enunciado pioneiro de Langley, no final do século XIX, de que uma enzima e o substrato devem apresentar estruturas complementares que se casam ou com o conceito de “substâncias receptoras” [53]. O enunciado inspirou o aforismo clássico de Emil Fisher de 1890 de que esta interação é do tipo “chave e fechadura” [54]. Esses dois enunciados enfatizam o caráter estereoespecífico da associação proteína-ligante. Atualmente o processo de enovelamento, ou de formatação estrutural, tem sido tratado com base na teoria do funilamento energético [55, 56] e com moléculas de água exercendo função auxiliar essencial,

principalmente através de ligações de hidrogênio [57, 58], ou intensificando interações inter e intramoleculares através do efeito hidrofóbico [58, 59].

A contribuição da água aos processos energéticos das interações entre biomoléculas é conseqüente das seguintes forças não covalentes que atuam no meio aquoso: forças de Van der Waals (LW); ácido-base de Lewis (AB) e dupla camada elétrica (EL). As forças AB são quantitativamente predominantes na maioria dos casos e são responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio. O subconjunto de forças AB, responsável pela energia livre de coesão (ligação de hidrogênio), atuante entre moléculas de água, causa o efeito hidrofóbico; em conseqüência da atração das moléculas que circundam todas as moléculas polares ou apolares e partículas imersas no meio aquoso. Como a energia de coesão entre moléculas de água é uma propriedade inata, a atração lipofílica (devida ao efeito hidrofóbico) está inevitavelmente presente no meio aquoso e tem um valor de $\Delta G_{(\text{hidrofóbico})}$ igual a -102 mJ.m^{-2} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ [59], sendo igual à energia livre de coesão entre moléculas de água àquela temperatura. A forte atração lipofílica devida a esse efeito pode entretanto ser suplantada por moléculas muito hidrofílicas e partículas que atraiam água mais fortemente do que a energia livre de atração dessas moléculas ou partículas entre si mais a energia livre de coesão da ligação de hidrogênio entre as moléculas de água, resultando então numa repulsão líquida de dupla camada não elétrica. Cada uma das três forças LW, AB ou EL, que podem ser independentemente atrativa ou repulsiva, depende das circunstâncias em que atuam; em função da distância e de acordo com regras específicas [60, 61].

A compreensão dos fenômenos físico-químicos que governam as reações químicas e as simples associações interatômicas são mais facilmente compreendidas por intermédio das leis da termodinâmica e com o conceito de espontaneidade nelas embutidos. São quatro as equações consideradas fundamentais, embora todas elas sejam formas diferentes de se olhar uma mesma relação termodinâmica [62]. A forma mais usual, a mais aplicada para estudos envolvendo reações químicas, é conhecida como a relação da energia livre do sistema, também muito conhecida como energia de Gibbs, pode ser expressa na forma:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Nesta equação a variação de energia livre do sistema é relacionada com as variações da entalpia, H , e da entropia, S , duas propriedades de estado. O critério para que uma reação seja espontânea, em condições de temperatura e de pressão constantes, é que a variação de ΔG seja negativa, ou seja, os sistemas naturais tendem a minimizar a energia livre intrínseca. Isto significa que quanto menor for o valor de ΔH (mais negativo) e quanto maior o de ΔS (mais positivo), mais favorecida será a reação.

A natureza permitiu aos sistemas biológicos um meio de contornar a restrição a interações consideradas impossíveis termodinamicamente, aquelas com ΔG positivo: promovendo reações acopladas. Como no exemplo clássico de uma pedra subindo espontaneamente uma determinada altura. Isto só será possível se ela estiver acoplada à queda de um outro corpo. Assim a solubilização de compostos apolares em água, processo com ΔG positivo, ocorre porque está associada a transformações na organização molecular do líquido. A compreensão desse fenômeno fica facilitada

considerando a grandeza entropia em termos da probabilidade do estado de uma dada molécula ou sistema. São três as coordenadas para cada molécula: translação, rotação e vibração. Os graus de liberdade em um sistema, sem a imposição de restrições, são imensos, dados por $3N$, onde N é o número de moléculas participantes. A entropia é máxima (positiva) tanto quanto maiores forem os graus de liberdade. A recíproca é verdadeira. Nesse modelo relativamente simplista a entalpia tem comportamento contrário. Esta reciprocidade estabelece um tamponamento termodinâmico para a imensa maioria das inter-relações com conseqüências fisiológicas.

O tamponamento termodinâmico no meio biológico é outra característica excepcional da água. Ele decorre do valor relativamente elevado da capacidade calorífica e da sua constância relativa em todo o intervalo de temperaturas da fase líquida; varia de $4,192 \text{ J.g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ a 10°C a $4,216 \text{ J.g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ a 100°C [63]. Para um sistema a pressão constante a capacidade calorífica C_p é dada por: $C_p = (\delta H / \delta T)_p$ [60, 62]. Tomando T e p como variáveis convenientes para as análises do envolvimento energético obtêm-se: $\delta H = (\delta H / \delta T)_p dT + (\delta H / \delta p)_T dp$. Portanto, sob pressão constante, e se C_p se mantiver constante no intervalo de temperaturas, resulta que $\Delta H = C_p \Delta T$.

Como uma conseqüência das correlações entre ΔH , ΔS e T com ΔG e de ΔH com T , resulta que $\delta \Delta H / \delta T = \Delta C_p$ e $\delta(T\Delta S) / \delta T = \Delta C_p + \Delta S$. Quando ΔS for negligenciável comparado a ΔC_p a dependência de ΔH e de $T\Delta S$ torna-se a um fator constante igual a ΔC_p e ΔG se torna relativamente independente de T . Este tamponamento de ΔG pode ter importância considerável, uma vez que os sistemas

biológicos dependem de um balanço delicado de interações, dominadas por ΔG ao invés de ΔH ou ΔS . Esta “homeostase termodinâmica” permite a um organismo suportar flutuações nas condições ambientais sem maiores prejuízos à energética global das reações necessárias à sua fisiologia [64].

Parece não existir no meio aquoso intracelular uma prevalência inequívoca de qualquer uma das três forças direcionando o curso das interações inter e intramoleculares de forma geral. Ora são importantes as forças AB, ora as LW, ora as EL; ora são todas elas atuando em conjunto, em busca do equilíbrio entre as forças atrativas e as repulsivas. Muitas vezes existem prevalências, mas em estados de escala nanométrica [59, 60]. Por exemplo, até recentemente as LW eram consideradas prevalentes para o enovelamento específico das proteínas. Atualmente, em muitos casos, forças AB representadas por ligações de hidrogênio, muitas vezes mediadas por moléculas de água, são consideradas tão importantes quanto as primeiras [59-61].

De uma forma geral as interações mais importantes entre biomoléculas e ligantes são: as ligações de hidrogênio (65); as interações lipofílicas (66); pontes salinas e interações polares fracas (67). Adicionalmente a estas forças não covalentes atuantes na estabilização da estrutura proteica, as ligações dissulfeto também exercem função similar em algumas proteínas [68].

1.3 – Arranjo Estrutural da Tripsina

A proteína para atingir uma função específica depende de uma estrutura quaternária precisa. Mais especificamente, depende de um arranjo estrutural no qual desvios na faixa de 1 Å (0,1 nanometro) na disposição espacial de átomos podem

inviabilizar interações essenciais à sua função fisiológica, como descrito adiante para o caso da tripsina. Em relação a essa enzima, o acompanhamento de dados reportados em artigos e em publicações pertinentes ao seu arranjo estrutural é dificultado pelos critérios utilizados pelos autores para identificação dos resíduos. Alguns numeram os aminoácidos como eles aparecem na sua estrutura primária; outros adotam a seqüência do tripsinogênio; outros a seqüência da quimotripsina; outros do pré-tripsinogênio.

Por razões históricas os resíduos da tripsina são numerados em função do seu alinhamento, portanto em correlação, com os correspondentes na quimotripsina A bovina. Para facilitar o acompanhamento desta correlação apresenta-se na Figura 1.3 o alinhamento do pré-tripsinogênio catiônico bovino [Expasy, Swiss-Prot/TrEMBL "Primary accession number" P00760], dos três pré-tripsinogênios humanos [Expasy, Swiss-Prot/TrEMBL "Primary accession number" P07477, P07478, P35030] e do quimotripsinogênio A bovino [Expasy, Swiss-Prot/TrEMBL "Primary accession number" P00766].

O pré-tripsinogênio é processado e liberado no interior do intestino já como tripsinogênio (seqüência a partir do resíduo Val¹⁰). Já no intestino sofre uma primeira clivagem entre os aminoácidos Lys¹⁵ e Ile¹⁶, eliminando o hexapeptídeo inicial, VD₄K. Forma-se então a β -tripsina, [69, 70]. Esta hidrólise é catalisada pela enteroquinase [71], ou pela própria enzima recém ativada [72]. A seqüência peptídica desta isoforma β sofre uma clivagem adicional entre os resíduos Lys¹⁴⁵ e Ser¹⁴⁶, resultando em uma segunda forma ativa, a α -tripsina [73]. Essa segunda forma possui basicamente a mesma estrutura da β , mas é 40 % menos ativa frente ao substrato amidásico BapNA e não apresenta

diferença significativa de atividade frente a substratos ésteres sob pH ótimo [74]. Uma terceira forma é resultante da clivagem sobre a α -tripsina, entre os resíduos Lys¹⁹⁰ e Asp¹⁹¹, gerando a ψ -tripsina [75]. Essa forma é menos específica que as duas precedentes e possui atividade esterásica maior que amidásica [74]. Uma quarta forma, resultante da clivagem entre os resíduos Lys¹⁶⁹ e Ser¹⁷⁰ foi purificada e caracterizada no laboratório de enzimologia do ICB/UFMG, sendo nomeada γ -tripsina [76]. Essa forma praticamente não apresenta atividade amidásica, apenas esterásica. Existem mais 10 resíduos de Lys e 2 de Arg na seqüência primária do tripsinogênio catiônico bovino, o que possibilitaria teoricamente a formação de um grande número de outras isoformas, mas a manutenção de alguma atividade enzimática parece depender da conservação da interligação dos dois domínios.

Na estrutura da tripsina bovina é característica a ocorrência de 6 ligações dissulfeto. Os resíduos interligados por S-S são indicados na Figura 1.3. O número dessas ligações varia entre partícipes da família da quimotripsina não havendo relação óbvia entre estabilidade, atividade e esse número. Três ligações são conservadas, entre os resíduos 42-58; 168-182 e 191-220, com uma exceção [02]. Talvez a ligação S-S mais crucial seja a última, interligando a bolsa S₁ na maioria delas [02]. Na três tripsinas humanas não existe a ligação 128-132 e na aniônica humana ainda inexistente a ligação 136-201 [02]. Uma outra marca considerável na estrutura secundária da tripsina é a ligação de caráter iônico formado entre a Ile¹⁶, exposta após a liberação do hexapeptídeo do tripsinogênio, e o Asp¹⁹⁴ [77].

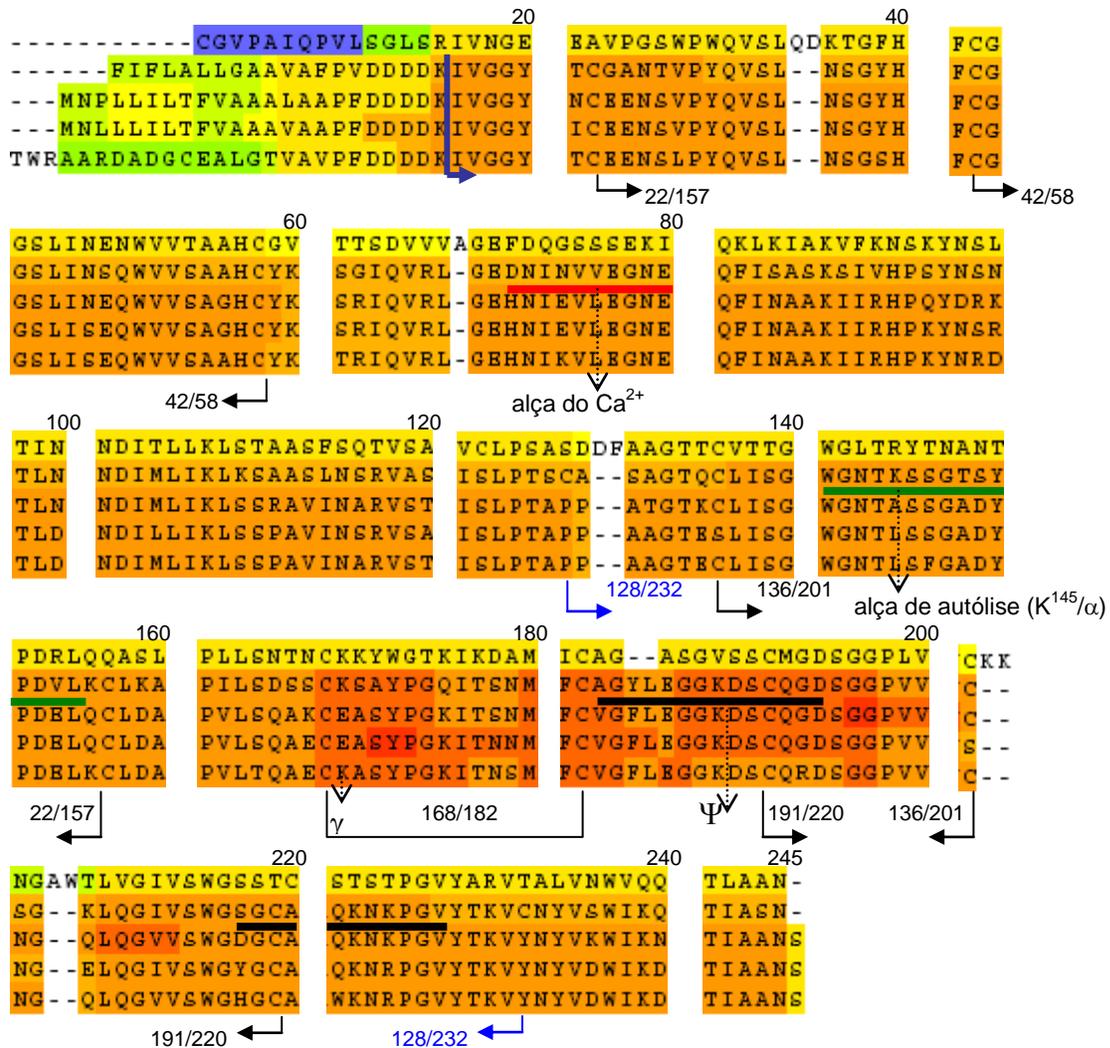


Figura 1.3 – Alinhamento dos resíduos do quimotripsinogênio A bovino, tripsinogênio catiônico bovino, tripsinogênio catiônico humano, tripsinogênio aniônico humano e mesotripsinogênio humano. As seqüências estão nesta mesma ordem. Os resíduos foram seccionados em grupos de 20 após o alinhamento, para facilitar o acompanhamento de correlações. Os 54 resíduos iniciais da seqüência 5 estão omitidos. Esse alinhamento múltiplo foi executado com o programa T-Coffee [78].

Um retrato sobre a importância da estruturação correta da β -tripsina pode ser tirado da dependência da atividade da enzima com o pH. A ação da enzima cai abruptamente a partir de pH 8,5-9,0 tornando-se inativa e esta perda é relacionada com o colapso do domínio de ativação, decorrente da desprotonação da Ile¹⁶ [79].

Estados de maior ou menor ordenação da estrutura estão também associados à atividade. Uma das primeiras transições ordem-desordem descritas foi a conversão do tripsinogênio a tripsina. Aproximadamente 15% do tripsinogênio é desordenado o que faz com que ele seja pouco ativo, cerca de 1% comparado à β -tripsina. Um ajuste conformacional, propiciado pela ligação de caráter iônico entre Ile¹⁶-Asp¹⁹⁴, controla a conformação do domínio de ativação da tripsina [15].

As ligações dissulfeto funcionam como elementos estruturantes e estabilizam a estrutura enovelada das proteínas. Podem conectar regiões distantes de uma cadeia polipeptídica formando unidades estruturais conhecidas como uma “alça dissulfeto”. O aumento de estabilidade de moléculas de proteína, na ocorrência dessas ligações é demonstrado por estudos de desnaturação quando a dimensão do estado desnaturado em resposta a condições desnaturantes aumenta com a redução das ligações dissulfeto. Os estudos com raios X de proteínas contendo este tipo de ligação mostra que elas contribuem para a rigidez de regiões específicas e ajudam a manter a geometria do sítio ativo em enzimas e de regiões críticas em outras proteínas [80]. Evidências de estudos de cinética sugerem que a função da ligação dissulfeto 179-203 (191-220 na Figura 1.3) no mecanismo de ação da tripsina é a de manter a geometria da bolsa de especificidade pelo posicionamento apropriado de resíduos da bolsa no sítio S₁ em um arranjo preciso [80].

Em termos de estrutura terciária, as proteases da família da quimotripsina são caracterizadas pela formação de dois domínios perpendiculares, do tipo barril β , cada um formado por seis estruturas β antiparalelas e uma hélice C terminal, conforme pode ser visto na Figura 1.4.

O sítio de especificidade da tripsina está localizado em uma bolsa entre os dois domínios, com as interações entre a enzima e o substrato funcionando como conectores entre ambos [02]. A posição desse sítio pode ser vista na Figura 1.1 e na Figura 1.4 onde também pode ser vista a benzamidina ocupando essa bolsa.

Diversos estudos de similaridade estrutural entre as enzimas da sub-família da tripsina, ou seja aquelas com a tríade His, Asp, Ser, podem ser encontrados na literatura científica. Dentre esses se destacam o de autoria de Fehlammer e col., 1977 [81] e o de Kossiakoff e col., 1977 [82], primordiais na elucidação estrutural da tripsina e do tripsinogênio e que descrevem as moléculas de forma bastante detalhada.

Segundo esses autores, existem diversas alças interconectando as estruturas β . Dessas as principais seriam (acompanhar na Figura 1.4): alça de ligação do Ca^{+2} , formada entre os resíduos Asp⁷⁰ e Glu⁸⁰; alça externa 1, formada entre os resíduos Ala¹⁸³ e Asp¹⁹⁴, uma estrutura mais móvel no tripsinogênio que na tripsina; alça externa 2, formada entre os resíduos 214 e 228, e a alça de autólise, constituída pelos resíduos 141 a 156. Os resíduos funcionais estão posicionados principalmente nas alças conectoras das estruturas β . A bolsa de especificidade S_1 é construída por três estruturas β (resíduos 189-192, 214-216, ambas de alças conectoras; 226-228) e o sítio oxianiónico (Gly¹⁹³ e Ser¹⁹⁵) todos no barril β carboxi terminal. No estado fundamental o esqueleto da Gly¹⁹³ e da Ser¹⁹⁵ formam duas

ligações de H relativamente longas com o oxigênio carbonílico da ligação excisível, reduzida significativamente no estado de transição da enzima. [02].



Figura 1.4 – Estrutura tridimensional da tripsina. A estrutura terciária da tripsina é aqui ilustrada pela tripsina catiônica bovina ([31] PDB id 1CE5). Pode-se verificar a forma característica das proteases da família da quimotripsina, em barris β ; as estruturas β antiparalelas; diversas alças (“loops”) interligando-as. No centro, em amarelo, os resíduos da tríade catalítica, His, Ser e Asp. A benzamidina, é vista no centro, em azul; em preto, as alças externas 1 e 2; em verde a alça de autólise; em vermelho a alça do Ca^{2+} . O resíduo do Asp^{189} , em amarelo, abaixo da benzamidina, com o grupo carboxílico em vermelho. Figura obtida com o programa DeepView/Swiss-PdbViewer [32].

São identificados dois sítios de ligação de Ca^{+2} em cada uma das duas proteínas (tripsina e o seu zimogênio). O primário, resíduos de 70 a 80, cuja ocupação estabiliza as proteases contra desnaturação térmica ou autólise; e um secundário, existente apenas no zimogênio, no hexapeptídeo $\text{N}_{\text{terminal}} \text{VD}_4\text{K}$, cuja ocupação é essencial para a sua ativação [82].

Em resumo, são as seguintes as conclusões gerais de Kossiakoff e de Fehlhammer sobre as modificações estruturais do tripsinogênio na sua conversão para a tripsina.

- a) - A forma do tripsinogênio é muito próxima à da tripsina, havendo a possibilidade de que o substrato seja acomodado de forma similar àquela prevista para a enzima ativa.
- b) - Um deslocamento de cerca de 2 Å na Gly^{193} , no tripsinogênio, a deslocaliza de tal sorte que dificulta a formação do oxianion, contribuição importante para a reatividade diminuída desta protease.
- c) - há um desvio na posição da Ser^{195} ($\text{C}^\beta = 0,5 \text{ \AA}$ e $\text{O}^\delta = 0,8 \text{ \AA}$)
- d) - observa-se principalmente uma transição conformacional entre estruturas mais ou menos flexíveis. Nesse caso há uma discordância entre os autores dos estudos uma vez que Kossiakoff sugere ter a tripsina maior plasticidade enquanto Fehlhammer sugere “uma estrutura mais rígida e funcional” que a predecessora.

Embora o critério de plasticidade estrutural ou enrijecimento tenha sido aventado em 1977 por Kossiakoff, para explicar a maior reatividade da tripsina, apenas mais recentemente passou a ser considerado um fator importante na reatividade de proteínas.

Diversos estudos apontam nesta direção [83-86]. Leiros e col. [84], por comparações entre tripsinas pertencentes a oito espécies, especialmente entre espécies adaptadas a situações de temperaturas muito baixas com outras adaptadas a temperaturas normais e altas, avança como hipótese que “a maior eficiência catalítica das enzimas adaptadas ao frio é conseguida pela adoção de uma estrutura mais flexível, embora às custas de uma estabilidade térmica diminuída”. Outro exemplo da importância desse critério é encontrado em estudos com a própria tripsina. Anteriormente se acreditava que a diferença na especificidade entre ela e a quimotripsina era devida ao resíduo Asp¹⁸⁹ presente na base da bolsa catalítica da primeira, capaz de estabilizar resíduos Arg ou Lys; enquanto na segunda com a Ser ocupando a posição equivalente apresenta nítida preferência por resíduos apolares e volumosos [54]. Entretanto experimentos com mutações sítio dirigidas e estudos com a tripsina mutante de rato Asp189Ser indicaram que esta substituição resultava em uma protease inespecífica e com atividade baixa [86, 87]. A conversão da especificidade da tripsina para a da quimotripsina requer, adicionalmente a modificações racionais na bolsa de acomodação do substrato, a substituição de 11 aminoácidos em sítios distantes do catalítico. Nove destes estão localizados nas alças superficiais 1 e 2. Foi proposto que esses elementos distantes podem modular a plasticidade conformacional, em oposição a uma estrutura estática, seja do sítio de acomodação do substrato ou do aparato catalítico, ou mais provavelmente de ambos [87]. Um candidato para mediar tais efeitos conformacionais é o domínio de ativação. Esse, originalmente definido e nomeado por Bode e Huber [88], consiste de quatro segmentos estericamente adjacentes: resíduos 16-19; 142-152; 184-193; 216-223.

Notar que o segmento 142-152 é coincidente com a alça de autólise, enquanto os segmentos 184-193 e 216-226 compreendem parcialmente as alças 1 e 2 [81].

Embora a autólise seja um mecanismo de controle da atividade da enzima um tipo de interação com este mesmo propósito, o controle da atividade enzimática, é muito mais importante. Trata-se da associação entre a protease e inibidores. Para a tripsina existem diversos inibidores conhecidos [33, 88]. Esse tipo de regulação atinge níveis elevados de especialização para atender à diversidade de funções exercidas por essa enzima [36-40, 89]. A elucidação dos mecanismos naturais dessa inter-relação constitui-se na principal estratégia adotada para o desenvolvimento de novos fármacos; mais eficazes, mais seguros. E dentre os inibidores naturais estudados até hoje um se destaca; é um daqueles secretados pelo pâncreas, conhecido como BPTI (do inglês, bovine pancreatic trypsin inhibitor), ou como PSTI (do inglês pancreatic secretory trypsin inhibitor), ou como inibidor de Kunitz, ou comercialmente como aprotinina.

A associação β -tripsina-BPTI é muito forte, refletida em uma constante de associação de $1,7 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ [90]. Contribuindo com tal magnitude para essa constante devem ser listados pelo menos os seguintes fatores: complementaridade eletrostática; permissão estérica, e a formação de 14 ligações de hidrogênio diretas intermoleculares e o envolvimento de quatro moléculas de água na interface entre as duas proteínas. A complementaridade estrutural, do tipo “chave e fechadura”, assim como outros fatores envolvidos podem ser acompanhados na Figura 1.5 e na Figura 1.6.

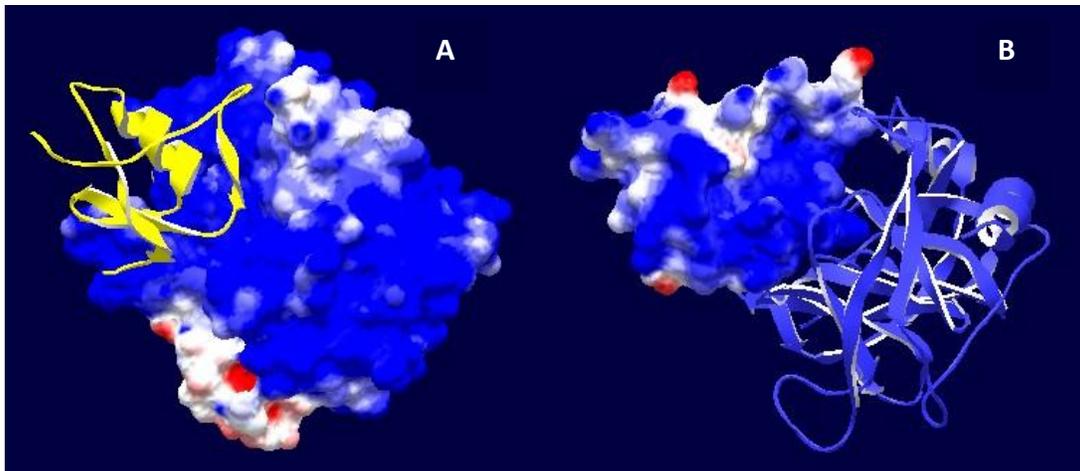


Figura 1.5 – Contatos intermoleculares entre a β -tripsina catiônica bovina e o inibidor BPTI. Em **A**, o BPTI em amarelo, na representação estrutural, aparece associado à β -tripsina (mapa de potencial eletrostático). Em **B** a representação das duas moléculas foi invertida mostrando a penetração na β -tripsina da protuberância causada na superfície do BPTI pela Lys¹⁵. Estrutura obtida do PDB (id 1TGS); Programa SPDV [32].

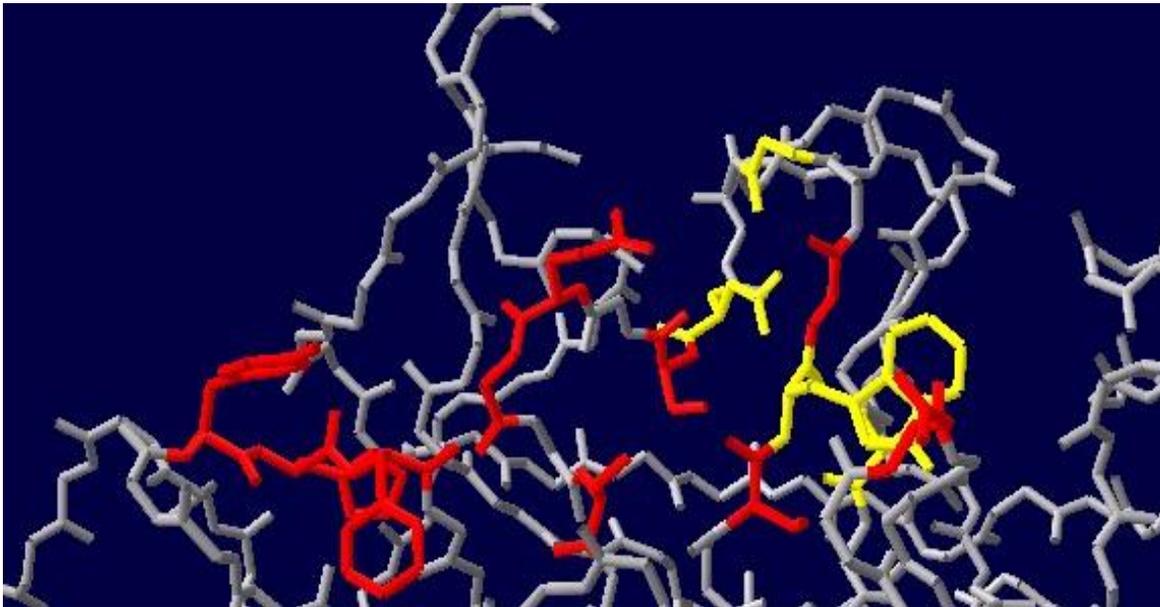


Figura 1.6 – Contatos intermoleculares mediados por moléculas de água entre a β -tripsina catiônica bovina e o inibidor BPTI. Em uma estrutura ampliada, são vistas as posições dos resíduos da β -tripsina, indicados em vermelho, que fazem ligações diretas de hidrogênio com resíduos do BPTI; e resíduos indicados em amarelo que fazem contatos mediados por moléculas de água com o inibidor (conexões extraídas de Helland e col. [90]). Modelo gerado pelo programa SPDV [32] a partir de estrutura cristalográfica depositada no PDB (id 1TGS).

1.4 – Sistema Formado por Macromoléculas, Água e Osmólitos

Quando uma macromolécula é imersa em uma solução constituída de água e outras espécies químicas (co-solutos) exercerá influência nas vizinhanças (solução), atraindo e acumulando algumas espécies, repelindo outras [91]. As interações estabelecidas entre os componentes do sistema podem levar a três situações possíveis: 1) o co-soluto se localizará na superfície macromolecular em excesso em relação à sua concentração na solução global; 2) a água ficará em excesso nessa superfície em relação à solução global, significando que a macromolécula tem maior afinidade pela água que pelo co-soluto, numa situação conhecida como hidratação preferencial, ou exclusão preferencial do co-soluto e 3) a macromolécula será indiferente à natureza dos outros componentes da solução com as quais entra em contato (água e co-soluto), de modo que não há distúrbios de concentração dos componentes na sua superfície [92]. É evidente que o estado final de equilíbrio reflete as afinidades relativas da macromolécula pela água e pelo co-soluto.

A camada de hidratação pode ser definida como a água associada com uma macromolécula ao nível permitido pelas interações eletrostáticas e estéricas. Funciona como uma película recobrimdo a superfície. A água fora dessa película é pouco perturbada pela estrutura envolvida, de modo que alterações nas propriedades intrínsecas tais como capacidade calorífica, volume ou calor específico, na maioria das vezes não é detectável por métodos analíticos. Atualmente existe uma grande disponibilidade de literatura acerca da interface macromolécula-água e a forma como esta interface contribui para a fisiologia está apenas emergindo [61]. É importante ressaltar que embora essas moléculas

sejam afetadas pela superfície macromolecular, no caso específico proteínas, a energia livre da associação é apenas ligeiramente menor que a energia térmica, e a dinâmica delas, embora reduzida, difere pouco da dinâmica daquelas que formam o resto da solução [61].

Contribuições de moléculas de água para as propriedades estruturais, dinâmicas e funcionais de macromoléculas, analisadas por modelos matemáticos tratados por métodos computacionais, são bem documentadas [93-95]. Entretanto apenas recentemente informações experimentais detalhadas sobre as interações de moléculas simples começaram a se tornar disponíveis [95, 96].

As abordagens sobre as interações entre macromoléculas e ligantes, feitas no passado sob um enfoque mais estático, podem atualmente ser analisadas sob um aspecto mais dinâmico fundamentadas em considerações termodinâmicas [97]. Idealmente os dados obtidos nesse tipo de análise devem ser correlacionados com estudos de estrutura e atividade [98]. Sob esse tipo de enfoque, ou seja, particularidades estruturais e interações com co-solutos no meio fisiológico, cresce a importância e a influência dos outros componentes da solução para a formação das ligações enzima-ligante.

Fisher e Verma, através de uma publicação recente [99], sugerem que a incorporação de água pelo BPTI, embora fazendo quatro ligações de hidrogênio com grupos polares circunvizinhos, ao invés de enrijecer a molécula como era esperado, a torna mais flexível, resultado de um aumento na entropia vibracional. As maiores partes da proteína, tanto local quanto globalmente, passaram de um estado de maior tensão para um de maior relaxamento. Esse achado confirma uma tendência recente. De um

modo geral os estudos mais recentes indicam para uma função pivotal exercida por moléculas de água, tanto na superfície quanto internas às moléculas, com aumento na flexibilidade e na atividade enzimática pela sua inclusão, com grande influência na regulação alostérica [100]. Até recentemente influências eletrostáticas dominaram a maioria dos estudos das ligações entre macromoléculas e os seus ligantes. Entretanto, atualmente, o panorama energético dessas interações aponta para dois mecanismos: dirigida por forças eletrostáticas e/ou mediada pela dessolvatação. Inclusive essa última está sendo considerada como a força diretora dominante nas interações envolvendo situações de baixa complementaridade de cargas [101]. Segundo V.A. Parsegian e col. [102], “a chave do entendimento da força e especificidade que caracterizam praticamente todas as reações biologicamente importantes está na água que é liberada quando duas superfícies complementares se casam”. Por exemplo, no seu trânsito da forma totalmente deoxi à totalmente oxigenada a hemoglobina perde cerca de 70 moléculas de água; a hexocinase expelle 320 ao se acoplar com a glicose [103-105].

A inter-relação entre os componentes da solução parece ser originária das espécies ancestrais, quando a vida começou a se desenvolver em ambiente aquático. O meio nesse caso é constituído por um número indefinido de solutos que direta ou indiretamente vão influenciar por exemplo a ação proteica. Apesar da diversidade de organismos, da variada e complexa origem do estresse imposto por fatores ambientais, existe um número pequeno de estratégias fundamentais seguidas por virtualmente todos eles, permitindo adaptações [106, 107]. Por exemplo, arqueobacterias halofílicas são capazes de resistir a concentrações de sais inorgânicos, principalmente KCl e NaCl de até

7 molal, provavelmente inativante para a maioria das proteínas e enzimas existentes em outros organismos; enquanto outros, são capazes de resistir a extremos de frio e congelamento. As células medulares internas dos rins de mamíferos, em condições de antidiurese podem resistir a concentrações às vezes superior a 0,4 M de uréia, um soluto extremamente perturbador da estrutura de macromoléculas [108]. A adaptação dos organismos a essas variações ambientais foi obtida através de uma seleção evolucionária de uma classe limitada de solutos de baixo peso molecular, para funcionarem como agentes osmóticos no fluido intracelular. Tais moléculas são capazes de permitir tanto o funcionamento do aparato metabólico nesse meio quanto a manutenção da estrutura nativa das macromoléculas. Assim, em condições de dessecação, nas quais a água é removida das células, o organismo assume um estado de quiescência (anidrobiose) [106].

A natureza seleciona as moléculas para atuarem como osmólitos com base nos seguintes critérios: 1) não devem afetar especificamente nenhuma enzima ou outro processo celular; 2) não devem ter cargas elétricas de modo a não perturbar o balanço eletrostático de componentes celulares; 3) devem agir como estabilizadores da estrutura proteica nativa e serem excluídos preferencialmente do contato com componentes celulares de forma a não perturbar as suas estruturas. Moléculas que satisfazem universalmente aos dois últimos são os açúcares, glicerol, vários polióis, assim como diversos aminoácidos e seus derivados [106, 107].

Dadas as restrições às quais a classe de solutos selecionados está submetida, principalmente interagir sem afetar as macromoléculas e as atividades metabólicas e de permitirem exclusões quando necessárias, são chamados de osmólitos compatíveis. Por

outro lado, o vai e vem de moléculas entre a vizinhança de macromoléculas e a solução global envolve movimentos de massas; ainda que discretos se comparados ao número total na solução; estando portanto relacionados ao potencial químico de cada espécie participante do processo [62]. O importante nesse vínculo termodinâmico é que ele permite determinar o número de moléculas de água ou de osmólitos associados ao movimento [102, 103].

Nesse ponto, convém ressaltar a existência de duas possibilidades para a associação (ou exclusão) de moléculas de água (e de solutos) de um estado supramacromolecular: 1) a macromolécula possui reentrâncias, bolsas, ou canais comunicantes com a solução global (na maioria das vezes inacessíveis ao soluto por questões estéricas), conforme é mostrado na Figura 1.7); e 2) a emergência de protuberâncias na macromolécula, capazes de promover o afastamento de moléculas de água ou de solutos por ação de forças eletrostáticas. Os estudos dessas interações em nível celular evoluíram para três tipos de abordagem: estresse osmótico, hidratação preferencial e “crowding”. Cada uma tem a sua fundamentação especial. A primeira trata da água absorvida quando um soluto é excluído, enquanto as duas restantes tratam da exclusão de solutos sob um enfoque mais estérico. As três são igualmente válidas e têm sido exaustivamente usadas. O que vai influir naquela a ser seguida será principalmente a disponibilidade de recursos laboratoriais [109, 110].

A estratégia centrada no estresse osmótico é muito simples. Utiliza vínculos termodinâmicos entre a pressão osmótica induzida por um co-soluto e o deslocamento do equilíbrio em um processo supramacromolecular, permitindo inferir mudanças na

quantidade de moléculas de água ou de co-soluto associados ao processo [102, 109]. Quando a pressão osmótica da solução é aumentada é favorecido o movimento de água para fora das regiões inacessíveis ao soluto; de modo que a liberação de água para a solução é incrementada; enquanto nos processos de inclusão a pressão osmótica é reduzida [110]. O processo é representado esquematicamente na Figura 1.8.

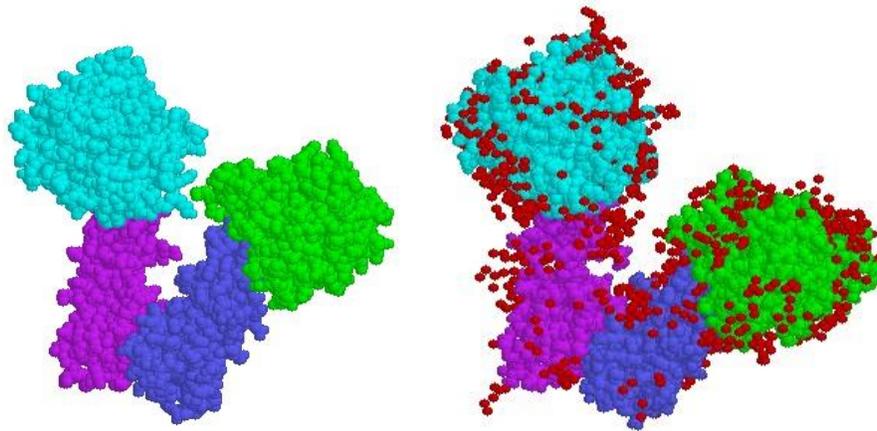


Figura 1.7 - Representação pictórica da enzima ATCase. São mostrados dois estados conformacionais da enzima. À esquerda é vista a forma tencionada T (PDB id 6AT1) e a direita a forma relaxada R (PDB id 8ATC) com moléculas de água associadas na estrutura cristalina (círculos em vermelho). São evidentes rugosidades, fendas, cavidades e canais na superfície proteica e que vão influir nas interações estéricas (de LiCata e Allewell, 1998 [110]). Figuras obtidas com o programa Protein Explorer, v.2.45 Beta [111] (para a forma T as moléculas de água de cristalização não foram disponibilizadas).

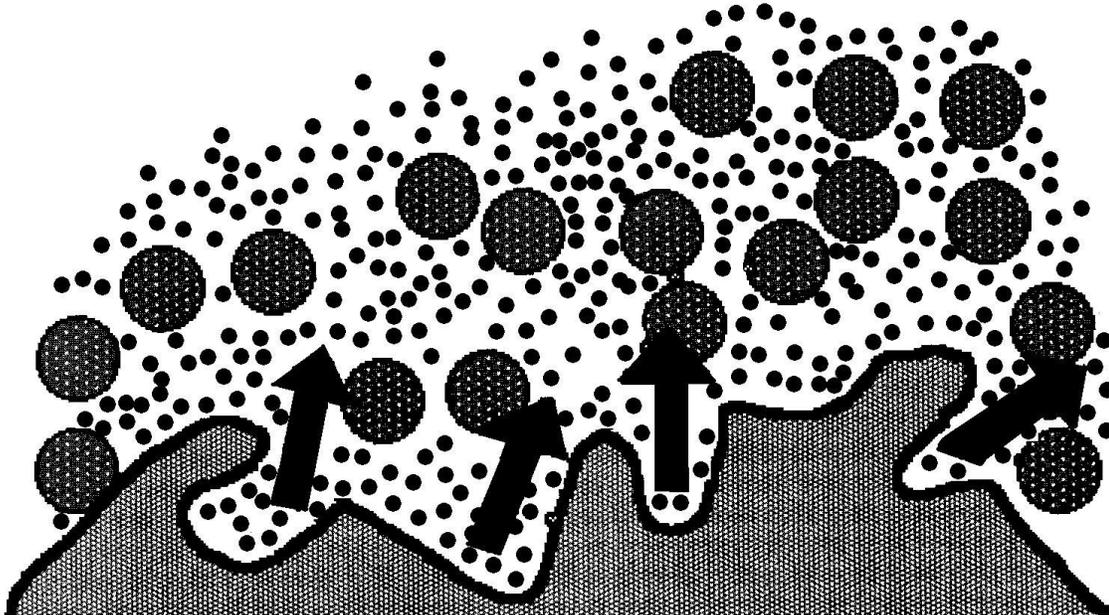


Figura 1.8 – Representação esquemática do método do estresse osmótico. Nesta representação as circunferências menores representam moléculas de água e as maiores moléculas de soluto. Em consequência de pressão osmótica, moléculas de água são excluídas da superfície, o que é indicado pelas setas (de LiCata e Hallewell, 1998 [110]).

2 – MATERIAIS E MÉTODOS - Prospecção da Interação entre a Tripsina e Ligante Baseada em Princípios da Termodinâmica

“The history of thermodynamics has always seemed to me to be not only one of the most interesting but one of the most dramatic episodes to be found in the story of the intellectual progress of the human mind. Starting in an investigation of a purely practical problem of engineering economics, it has grown into a body of doctrine of profound philosophical significance, with consequences which permeate the thinking of men on many subjects, from those with the most practical use to the problems of cosmology”.

Texto extraído de www.thermodynamicstudy.net/history.html, mai/2005; autor não identificado.

Uma prospecção detalhada do processo de associação intermolecular é de alta significância e interesse prático uma vez que fornece informações essenciais para o planejamento de fármacos com base em estruturas moleculares [112]. Esse tipo de estudo requer a soma de dados obtidos por diversas técnicas analíticas, tais como cinética enzimática, cristalografia, modelagem. Já a compreensão dos processos moleculares de reconhecimento de ligantes por macromoléculas biológicas requer uma caracterização completa da energética da associação e uma correlação de dados termodinâmicos com as estruturas envolvidas [112]. Por seu turno a descrição quantitativa das forças que governam as associações moleculares depende de determinações das variações de todos os parâmetros termodinâmicos da associação, incluindo a variação de energia livre (ΔG), de entalpia (ΔH), de entropia (ΔS) e da capacidade calorífica (ΔC_p).

A tripsina é uma das enzimas mais estudadas em termos da sua estrutura [02]. Isto se deve ao seu caráter como protease modelo para a classe das serinoproteases, enzimas que exercem grande variedade de funções, seja em condições fisiológicas normais ou em condições patológicas. A própria tripsina está associada a diversos estados patológicos, conforme discutido no capítulo 1. A descoberta da sua expressão e ação como uma proteína endógena, associada também com condições patológicas, fizeram com que ela fosse “recentemente redescoberta”, conforme atestam os milhares de estudos reportados na última década. A literatura científica é rica em pesquisas relacionando análises de seqüências primárias com eficiência catalítica, interação com inúmeros tipos de inibidores e com a expressão e função dos outros três isotipos.

Entretanto, após uma exaustiva pesquisa bibliográfica sobre o tema, não foi encontrado nenhum estudo relacionando a sua associação com ligantes e concomitante contribuição de moléculas de água ao processo. Esse é um assunto que vem recebendo muita atenção dos bioquímicos ultimamente devido ao envolvimento da água na formatação estrutural das macromoléculas essenciais à fisiologia celular.

Assim, associando a importância da tripsina com a carência de informações sobre o envolvimento de moléculas de água no processo da sua associação com inibidores, e com vistas a contribuir com dados importantes para o desenvolvimento de novos fármacos, se planejou o presente estudo. Esse trabalho está assentado nos objetivos e procedimentos indicados a seguir.

Objetivos

Objetivo principal

Determinar a termodinâmica da interação entre a β -tripsina com os inibidores competitivos benzamidina e berenil.

Objetivos específicos

1) Utilizando a metodologia do ITC:

a - estabelecer a estequiometria (N) dos ligantes na formação do complexo tripsina-ligante;

- b - determinar os parâmetros termodinâmicos K (constante de equilíbrio), ΔH (variação de entalpia), ΔG (variação de energia livre, ou energia de Gibbs), ΔS (variação de entropia) em diferentes temperaturas (15 °C, 20 °C, 25 °C e 35 °C);
 - c - determinar a variação da capacidade calorífica do sistema à pressão constante (ΔC_p);
 - d - determinar a provável exclusão de moléculas de água na transição da enzima livre em solução para o complexo tripsina-inibidor, usando a técnica do estresse osmótico e os osmólitos glicose e glicina (ΔN_{ea} , eq. 15 do anexo 1);
 - e - determinar eventuais mudanças no estado de protonação de resíduos envolvidos no processo de ligação enzima-inibidor (ΔN_{H^+}).
- 2) Fazer a modelagem molecular do complexo tripsina-berenil.
 - 3) Fazer comparações entre os parâmetros obtidos experimentalmente com aqueles obtidos por modelagem molecular.
 - 4) Fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos com exemplos relevantes da literatura.

2.1 - Materiais e Métodos

2.1.1 - Materiais e Reagentes Utilizados

Tripsina pancreática bovina, benzamidina, berenil, glicose, glicina e tampão Tris-HCl empregados nos estudos são de origem Sigma. Cloreto de cálcio penta hidratado e Cloreto de sódio, são de grau analítico e de fabricação Merck. Os reagentes, BApNA,

NPGB, Veronal, HEPES, PIPES, resina SE Sephadex C-50, ácido fórmico, HCl, dimetil formamida, e outros utilizados são de origens diversas, todos de grau analítico.

2.1.2 - Purificação da Tripsina Comercial

A tripsina pancreática bovina é encontrada comercialmente como um extrato básico do suco pancreático, precipitada em etanol [113], sendo formada quase exclusivamente pela forma catiônica. O produto pode conter as isoformas alfa, beta, gama e psi tripsina além de outras formas e peptídeos resultantes de autólices ou clivagens da enzima. A separação das isoformas, ou melhor, a extração e purificação da β -tripsina são normalmente feitas de acordo com o método desenvolvido por Schroeder e Shaw [73]. Esse método tem sido adaptado e modificado ao longo dos anos com vistas ao melhor desempenho em termos de rendimento e tempo gasto na purificação [114]. De modo geral o método se baseia na cromatografia de troca catiônica em resina SE-Sephadex C-50, em pH 8,0 e condição isocrática [115; 116]. O fluxo nesta condição e para as dimensões de colunas utilizadas nos experimentos das referências citadas é da ordem de 6 mL/hora, gastando-se até 100 horas para as separações. Para evitar ou minimizar autólice o material é recolhido em recipiente contendo ácido acético em quantidade suficiente para ajustar o pH a 3,0.

No presente estudo fez-se uma variação no método, também com o propósito de economia de tempo e melhor performance. O procedimento é o descrito a seguir. A resina SE-Sephadex C-50 é previamente equilibrada com uma solução de formiato de sódio, 50

mM, mais CaCl_2 25 mM, mais Benzamidina 1 mM, mais NaCl 300 mM, com o pH ajustado em 3,0 com ácido fórmico. A presença da benzamidina é importante; evita a autólise, propiciando um melhor rendimento da purificação e é facilmente removida por diálise. A mistura é colocada para decantar em uma coluna com 50 cm de altura, diâmetro de 2,15 cm, volume total de 250 mL sob um fluxo de 1,0 mL/min, com abastecimento contínuo com a mesma solução até completa sedimentação da resina. A coluna é então re-equilibrada com a solução anterior mas com o NaCl na concentração 100 mM. Para a corrida, adiciona-se de 100 a 150 mg da enzima comercial dissolvida em 10 a 15 mL da mesma solução da equilibração final, no topo da coluna. Adota-se o mesmo fluxo usado para a sedimentação e abastecimento contínuo com a solução do tampão com NaCl 100 mM. As frações são coletadas com um coletor/trocador automático a cada 4,0 mL. Após a passagem do equivalente a um volume da coluna, inicia-se o crescimento do gradiente de NaCl até se atingir 300 mM, quando então as concentrações permanecem constantes até o término da corrida. As frações são avaliadas em termos de concentração proteica total através da medição da absorvância em 280 nm. Adicionalmente são analisadas com BApNA para aferição da atividade amidásica [117]. Esse ensaio foi feito a cada três frações tomando-se uma alíquota de 50 μL da amostra (fração); adicionado a 950 μL de solução de Tampão Tris-HCl 50 mM, mais CaCl_2 25 mM, pH 8,0. Adicionam-se 3 gotas de BApNA 100 mM em DMSO e coloca-se em banho a 37 °C por 30 minutos. A incubação é interrompida pela adição de 3 gotas de ácido acético a 60 % v/v e a leitura de absorvância é feita a 410 nm.

As frações identificadas como contendo a β -tripsina são agrupadas e liofilizadas para facilitar a remoção subsequente da benzamidina. O liofilizado contendo a enzima é solubilizado em HCl 10^{-3} M e colocado para dializar em solução com esta mesma concentração, na câmara fria a aproximadamente 10°C , sob agitação com barra magnética. Após 4 h troca-se o banho, substituindo a solução inicial de diálise por outra idêntica; deixando por aproximadamente mais 2 horas. Repete-se a operação de troca do banho, deixando por mais duas horas. As três operações de diálise devem resultar numa diluição dos componentes não protéicos, ou dos componentes com $M < 10.000$ Dalton, por um fator superior a 25×10^5 . A eficácia da diálise pode ser acompanhada controlando-se a absorvância a 268 nm (benzamidina). Terminada a diálise a amostra obtida é novamente liofilizada; depois distribuída em micro tubos com aproximadamente 3 a 5 mg em enzima e colocada em freezer a -20°C . O controle da concentração em relação ao sítio ativo é feito para cada conjunto de 3 micro tubos. Este ensaio é feito normalmente quando da preparação para a titulação no ITC com inibidores.

Para as titulações no ITC (ensaios com benzamidina) as amostras dos micro tubos foram suspensas em volume de tampão suficiente para se atingir concentrações de 3 mg/ml ($128,78 \mu\text{M}$). Para os ensaios com berenil as amostras dos micro tubos foram suspensas em volume de tampão suficiente para se atingir concentrações de 1 mg/mL ($42,9 \mu\text{M}$).

As concentrações de proteína total são confirmadas por medições da absorvância em 280 nm. Alíquotas, em triplicata, de $50 \mu\text{L}$ da preparação são diluídas em $950 \mu\text{L}$ no mesmo tampão na qual foi feita a suspensão. Na cubeta de referência é colocado apenas

o tampão; medindo-se a absorvância. A concentração é então determinada de acordo com a fórmula abaixo.

$$[\text{enzima}] = (A_{280} \times f) / (37.000 \times l), \text{ onde}$$

A_{280} = absorvância líquida a 280 nm; f = fator da diluição da preparação; 37.000 é o coeficiente de extinção molar, em $M^{-1}cm^{-1}$ [118]; l = caminho ótico, em cm.

2.1.3 Controle da proteína ativa e confirmação da pureza da enzima

A confirmação da concentração de enzima na forma ativa foi feita usando-se uma alíquota da mesma preparação, ao mesmo tempo da aplicação no ITC, através de ensaio com NPGb [119]. Complementarmente uma amostra foi submetida à espectrometria de massas para corroborar a presença da β -tripsina.

2.1.4 Titulação da β -Tripsina¹

Os ensaios de atividade enzimática foram feitos com o substrato sintético BApNA seguindo o método de Erlanger [119]. Em síntese: preparam-se tubos de ensaio ou micro tubos contendo 950 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM mais $CaCl_2$ 25 mM e o equivalente a 2 μ L de BApNA 100 mM. Uma alíquota de 50 μ L da amostra a analisar é adicionada e a preparação é colocada em banho a 37 °C por aproximadamente 20 minutos. Ao término

¹ As equações mencionadas nos tópicos seguintes estão apresentadas no Adendo 1- Equações da Termodinâmica.

adicionam-se 3 gotas de ácido acético 60 % v/v. Os produtos são analisados quanto a absorvância em 410 nm.

Foi feito um controle de possível autólise durante as titulações no ITC, concorrente com os resultados de microcalorimetria e que poderia influir negativamente com a quantidade de calor gerado no curso dos experimentos. Preliminarmente esse controle foi feito com a tripsina comercial. Simultâneo com a microcalorimetria, uma alíquota da mesma preparação era analisada em termos de atividade amidásica com BApNA a cada 30 minutos.

O controle da estabilidade da β -tripsina purificada foi estendido para se cobrir uma ampla faixa de pH. Inicialmente 25 mg da enzima dializada e liofilizada foi dissolvida em água milliQ para se obter uma solução com concentração final de aproximadamente 20mg/ml. Alíquotas de 50 μ L desta solução foram transferidas para micro tubos contendo 950 μ L de tampões com pH entre 2,2 e 10,4, com intervalos de 0,4, previamente preparados segundo G. Gomori, em *Methods in Enzimology* (1955) [120]. A concentração proteica final em cada micro tubo era de 1 mg/ml. A diluição do tampão causada pela adição da alíquota e a conseqüente repercussão no valor final do pH foi desconsiderada. As preparações obtidas foram deixadas à temperatura do laboratório; aproximadamente 25 °C com o condicionador de ar ligado. Para as medições de atividade enzimática adotou-se o procedimento seguinte. Todas as medições foram feitas seguindo o protocolo para atividade amidásica; em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, decorridos, após a preparação nos distintos tampões, 25, 75, 350, 1500 e 3000 minutos.

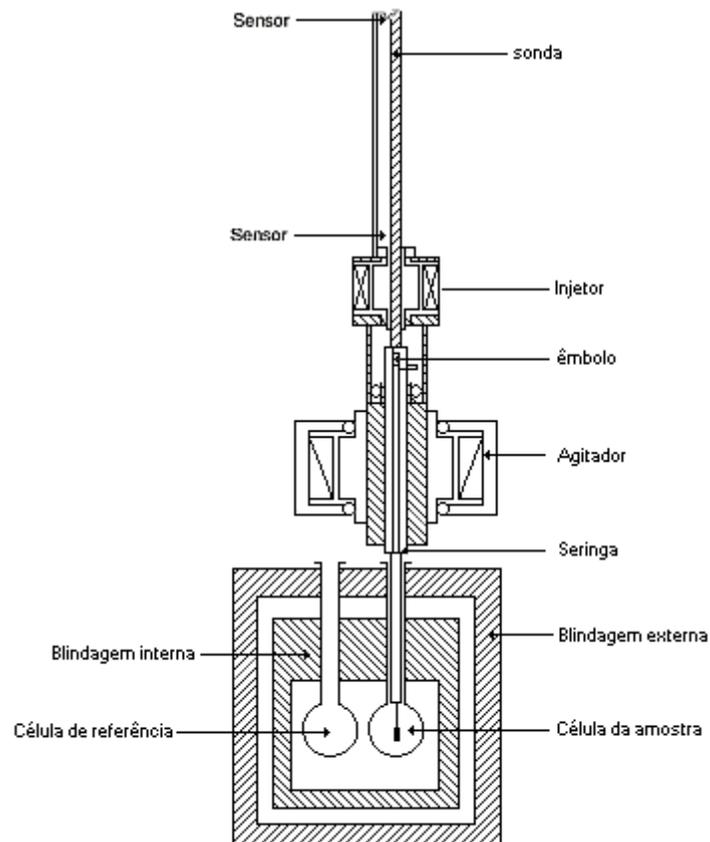
Foram testadas quatro condições: a β -tripsina pura; ensaio com 25 mM de CaCl_2 no tampão Tris-HCl; a β -tripsina pura com pré-incubação a 37 °C por 10 min mais descanso a 25 °C por 20 min e ensaio da atividade com a enzima adicionada em meio com CaCl_2 a 25 mM mais benzamidina a 3 mM.

A influência do íon Ca^{2+} na atividade amidásica foi avaliada aplicando-se o protocolo correspondente com variação nas concentrações de Ca^{2+} : 0,0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 50 mM.

2.1.5 Titulação no ITC

A titulação das interações β -tripsina-inibidor, baseada em microcalorimetria, foi efetuada com o equipamento Isothermal Titration Calorimeter (VP-ITC, MicroCal) com uma célula com volume útil de 1,42 mL. Uma representação esquemática desse equipamento é mostrada na Figura 2.1. Foram utilizados os tampões PIPES, HEPES, Tricina e Tris-HCl, todos 50 mM, mais CaCl_2 25 mM, e pH 8,0. As concentrações dos inibidores benzamidina e berenil; as injeções e a aquisição de dados foram planejadas em acordo com as recomendações do fabricante do equipamento, contidas no manual de operação correspondente. Resumidamente: a concentração do ligante é feita cerca de 30 vezes superior à concentração da macromolécula; faz-se uma injeção inicial de 1 μL para excluir a possível contribuição da perturbação térmica do sistema, conseqüente do início da agitação da solução, ou mesmo para eliminar alguma bolha de ar presente na ponta da seringa, cujo resultado é descartado para efeitos dos cálculos; 20 a 30 injeções de 3 a 5 μL devem resultar na saturação completa do sítio de ligação da enzima. Os resultados

Figura 2.1 – Representação esquemática do ITC



- As 2 blindagens funcionam como blindagens adiabáticas;
- Durante um experimento uma quantidade fixa de calor é fornecida continuamente à célula de referência;
- Um sistema de retro alimentação é ativado para fornecer energia compensatória à célula da amostra
- Uma pazinha giratória na célula da amostra, comandada pelo agitador indicado na figura, estabelece rápida uniformização de concentrações quando de adições de reagentes.

foram analisados através da isoterma obtida em gráfico, considerando-se apenas um sítio de ligação [121]. O algoritmo utilizado pelo equipamento fornece em um único experimento N , ΔH , e K ; o ΔG é calculado através do vínculo termodinâmico com a constante de equilíbrio e o ΔS é calculado pelo vínculo termodinâmico clássico com ΔG , ΔH e T .

2.1.6 Avaliação do envolvimento de dissociação ou associação de prótons no processo de associação para a formação dos complexos β -tripsina-inibidores

Como o microcalorímetro mede o calor gerado na célula onde ocorre a adição do inibidor sobre a enzima poder-se-á também estar ocorrendo envolvimento de calor no processo de associação ou dissociação de grupos ionizáveis de cadeias laterais da enzima com o envolvimento do tampão. A somatória dos processos envolvendo a associação da β -tripsina com o titulante (inibidor) mais o envolvimento de associações ou dissociações dos grupos ionizáveis resultam no que se convencionou chamar de calor observado, ou melhor ΔH_{obs} . Essa variação no estado de ionização dos resíduos envolvidos no processo de associação pode ser obtida do número de íons H^+ permutado entre a enzima e o tampão com o recurso analítico propiciado pela equação de Wyman [122], abaixo.

$$\Delta H_{obs} = \Delta H_{as} + nH^+ \times \Delta H_{tp}$$

Nessa equação ΔH_{obs} corresponde ao valor observado, obtido do experimento no microcalorímetro, independente da origem do calor envolvido na preparação, dentro da célula de reação; ΔH_{as} corresponde à variação da entalpia da associação sob o enfoque do estudo em curso; nH^+ corresponde ao número de moles de íons H^+ permutados e

ΔH_{ip} corresponde ao calor de ionização (ou associação) para o tampão em uso. Por conseguinte repercussões indesejáveis no resultado procurado podem ser obtidas da inclinação da reta em gráfico de ΔH_{obs} versus ΔH_{ip} , que fornece o resultado do número de moles de íons H^+ . As medições foram feitas com os tampões seguintes, cobrindo uma ampla faixa de ΔH_{dis} : PIPES ($\Delta H_{ip} = 11.452 \text{ J.mol}^{-1}$), HEPES ($\Delta H_{ip} = 21.012 \text{ J.mol}^{-1}$), Tricina ($\Delta H_{ip} = 31.962 \text{ J.mol}^{-1}$) e Tris-HCl ($\Delta H_{ip} = 47.530 \text{ J.mol}^{-1}$) [123].

Outro parâmetro termodinâmico importante avaliado foram as capacidades caloríficas dos sistemas envolvendo os dois inibidores testados. Para tal, foi usado o vínculo de ΔC_p com ΔH e T , por meio de titulações com os dois inibidores em sistemas com Tris-HCl 50 mM, mais CaCl_2 25 mM, nas temperaturas de 15, 20, 25 e 35 °C.

2.1.7 Titulação da β -Tripsina sob Estresse Osmótico

A análise do envolvimento de moléculas de água com exclusão ou inclusão superficial no processo de associação da β -tripsina com os inibidores testados foi feito através do método do estresse osmótico [102, 103, 110]. Para avaliação de possível influência da adição de co-solutos na constante dielétrica do meio, com favorecimento ou prejuízo para a associação estudada, foram utilizados os osmólitos glicose e glicina com o primeiro aumentando e o segundo diminuindo a constante; seguindo a estratégia de Colombo e Bonilla-Rodriguez [124]. Os osmólitos foram adicionados ao tampão Tris-HCl 50 mM com CaCl_2 25 mM utilizados para dissolver a enzima e os inibidores, seguindo o mesmo protocolo anteriormente descrito para as titulações no ITC. As concentrações dos osmólitos variaram de 0,25 a 1,0 osm.

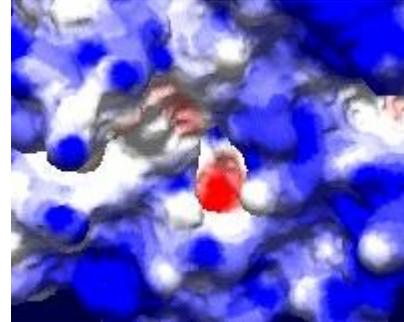
2.1.8 Modelagem computacional dos complexos β -tripsina-inibidores

Além dos inibidores testados experimentalmente, benzamidina e berenil, a p-aminobenzamidina foi incluída nos estudos de ancoragem (“docking”) sobre a β -tripsina em vista da disponibilidade de dados disponíveis na literatura sobre a associação entre essas duas moléculas [46, 125] e que propiciaria dados adicionais comparativos baseados na modelagem molecular.

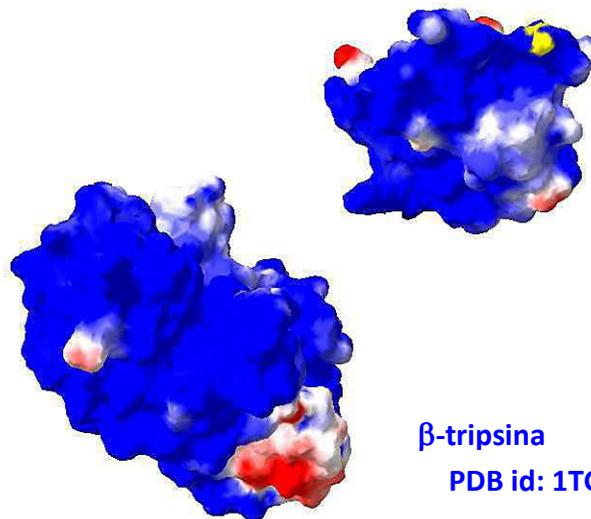
Os complexos formados entre a β -tripsina e os ligantes berenil e p-aminobenzamidina foram construídos pela substituição da benzamidina contida na estrutura cristalográfica depositada no PDB (identificação 1CE5), utilizando o procedimento prescrito no programa INSIGHTII da MSI. As cargas dos ligantes foram calculadas através do método MNDO contido no pacote MOPAC [126]. Os complexos resultantes foram então estudados com o programa AutoDock, versão 3.0 [127] utilizando um método baseado no algoritmo genético utilizado para a pesquisa da melhor posição para os ligantes no sítio ativo da enzima. Foram utilizadas 100 varreduras com uma população de 50 indivíduos, com taxa de mutação gênica de 0,02, e taxa de “crossover” de 0,8. Uma matriz de afinidades com as dimensões de 48 Å x 48 Å x 48 Å e uma matriz de espaçamento de 0,5 Å foi centrada na Ser¹⁹⁵, incluindo portanto o sítio catalítico e circunvizinhanças [90]. A conformação mais estável, de acordo com o mínimo de energia obtido, é transferida para o programa SYBYL [128] através do qual pode ser feita uma otimização da geometria dos complexos, e da β -tripsina e dos ligantes isoladamente. Foi usado um valor igual a 4,0 para a constante dielétrica dependente da distância, com um limite de 14,0 Å.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

“The “specificity site” of trypsin is now proposed to be composed of an “anionic site,” to which substrates or inhibitors bind electrostatically through their positive charge, and a hydrophobic binding site, located in line with, and between, the anionic and catalytic sites, in the form of a slit or crevice, which binds the carbon side chain of the substrates or inhibitors”. **Marcos Mares-Guia and Elliott Shaw.** *The Journal of Biological Chemistry*; 1965; 240:1579-85



PDB: 1CE5 (bolsa no sítio S1)



β -tripsina
PDB id: 1TGS

3.1 - Obtenção da β -Tripsina

A purificação da β -tripsina a partir do produto comercial Sigma®, segundo a metodologia desenvolvida no curso destes estudos, foi bastante eficaz. Em 24 horas é possível a obtenção de cerca de 50 mg da proteína pura, a partir de aproximadamente 80 mg do produto comercial. Um cromatograma típico destas corridas é mostrado na figura 4.1 onde são indicados: a absorvância em 280 nm (eixo à esquerda) de alíquotas iguais para cada fração coletada, indicativa da concentração de proteínas totais na amostra; os resultados de absorvância em 280 nm dos ensaios para a caracterização das frações com atividade amidásica (eixo à direita); os resultados de absorvância em 280 nm correspondentes a atividade amidásica normalizada por miligrama de proteína (cálculo baseado em um coeficiente de extinção molar de $37.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [118]), e a variação do gradiente da concentração de NaCl durante o experimento. As frações contendo a β -tripsina correspondem à última banda. Isto é confirmado por resultados similares encontrados na literatura e especialmente por ser aquela que apresenta a maior atividade amidásica específica, cerca de 30% superior à da penúltima banda, correspondente à forma alfa [115]. A atividade específica relativamente constante na região correspondente à última banda pode ser considerada um indicativo da presença de uma única isoforma; descartadas outras possibilidades para interpretar esse resultado, como por exemplo a ocorrência de duas isoformas com a mesma atividade amidásica e com o mesmo tempo de retenção. Resultados de espectrometria de massas (“eletrospray”) corroboram a presença da β -tripsina no conjunto destas frações. Em três experimentos foram obtidas espécies moleculares de massa molecular igual a $23.294,5 \pm 0,2$ Dalton para um valor

teórico de massa molecular igual a 23.292,5 Dalton. Nenhuma outra isoforma teria essa massa molecular.

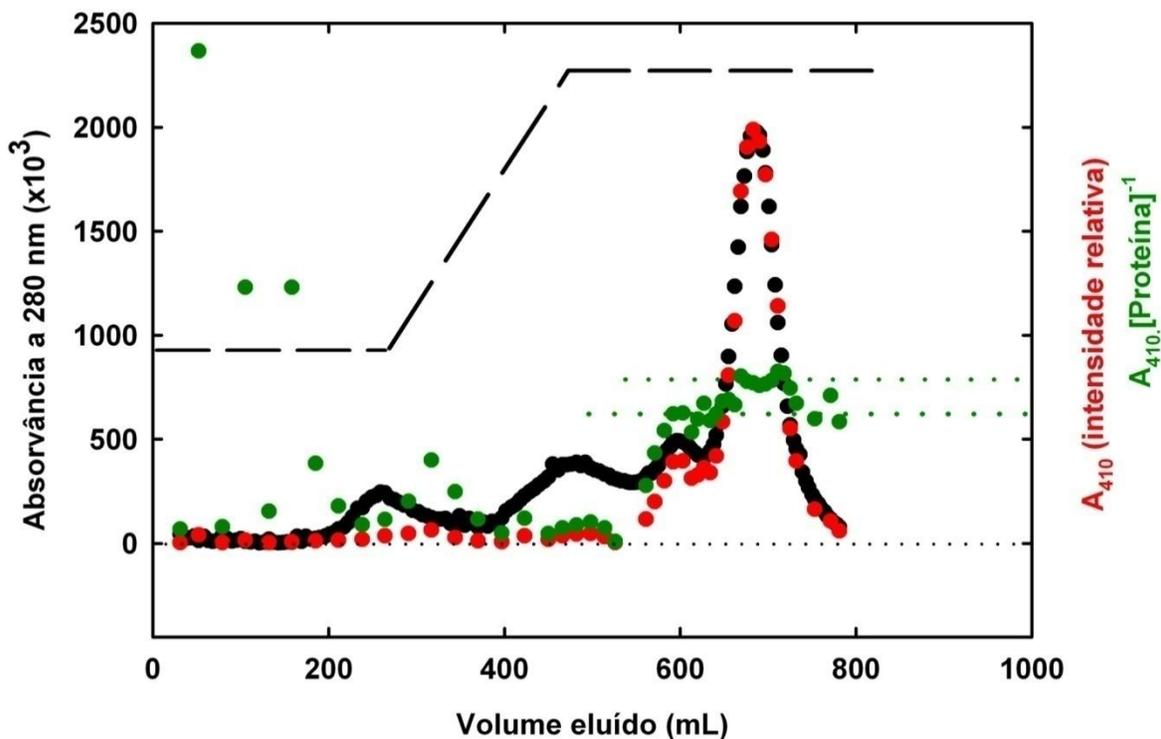


Figura 3.1 - Cromatograma típico das corridas de purificação da β -Tripsina. Em preto estão indicados os resultados de absorvância (A_{280}) para avaliação do conteúdo em proteína total na fração coletada; em vermelho, em intensidades relativas, a atividade amidásica total por fração analisada (A_{410}); em verde, em intensidades relativas, a atividade amidásica específica (absorvância por unidade de concentração, M^{-1}). A linha tracejada indica a variação da concentração de NaCl de 100 a 300 mM (fora de escala mas em relação de proporcionalidade).

Vale observar a ocorrência de alguns resultados elevados de atividade amidásica normalizada em frações com tempos de retenção baixos; volume eluído < 200 mL. Estas frações podem conter tripsina aniônica [113] e que se caracterizam por uma eficiência catalítica cerca de 10 vezes superior à forma catiônica [27]. Isto não foi avaliado por fugir ao escopo deste estudo e por exigir considerável esforço analítico para a sua caracterização. Ensaios da β -tripsina obtida para avaliação da concentração de enzima ativa indicaram um teor médio de 98 %; sendo portanto confirmada a pureza das amostras obtidas.

3.2 - Estabilidade da β -tripsina.

Caracterizada a purificação da β -tripsina foi feito um estudo da sua viabilidade integral durante os experimentos. A estabilidade da enzima à temperatura do laboratório, 22°C, em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 pode ser acompanhada na Figura 3.2. Quando pura, em tampão Tris-HCl, ela perde rapidamente a atividade, cerca de 80% da inicial em questão de 2 horas. Em preparação similar, mas com o acréscimo de 25mM de CaCl₂ a atividade se mantém praticamente inalterada por um tempo mais que suficiente para a realização dos ensaios. Isto evita uma possível autólise durante os experimentos de titulação no microcalorímetro (cerca de 2 horas). Foram realizadas análises para o controle específico deste parâmetro. A importância do cálcio na estabilidade pode também ser acompanhada na Figura 3.3.

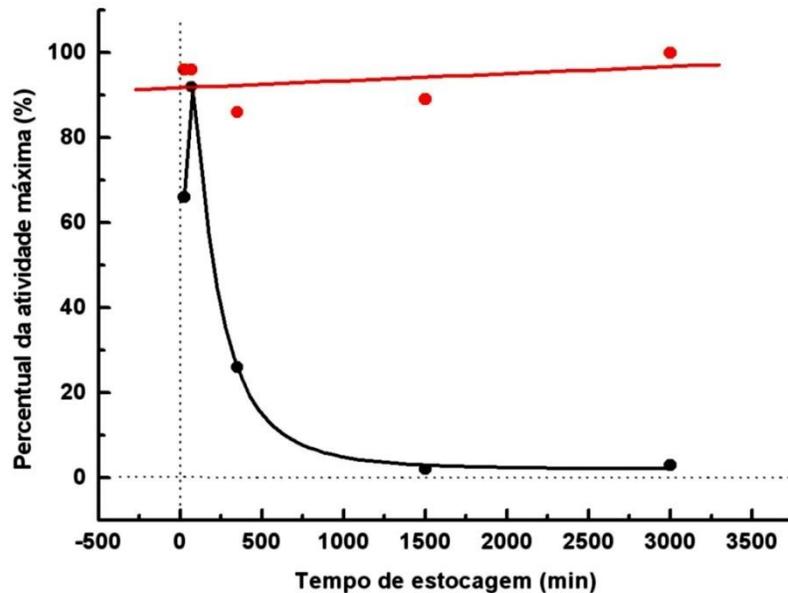


Figura 3.2 – Estabilidade da β -tripsina à temperatura ambiente. A enzima foi armazenada a 22 °C, em Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; na ausência e na presença de CaCl_2 25 mM. A atividade foi aferida com BapNA com os ensaios realizados nos tempos indicados no gráfico. A reta em vermelho indica a atividade residual na presença do íon Ca^{2+} (regressão linear) e a curva em preto a atividade residual para a enzima armazenada sem a presença desse íon (equação: $y = y_0 + Ae^{-\frac{\ln^2(x/x_c)}{2w^2}}$).

sem a presença desse íon (equação: $y = y_0 + Ae^{-\frac{\ln^2(x/x_c)}{2w^2}}$).

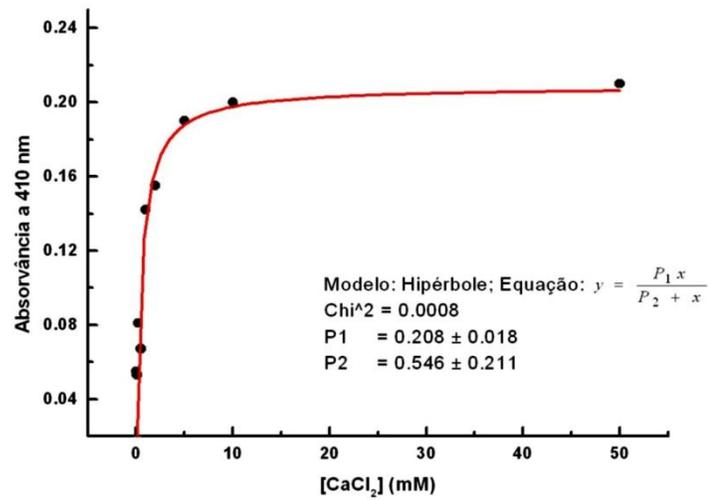


Figura 3.3 – Influência do íon Ca^{2+} na atividade amidásica da β -tripsina sobre BApNA. O parâmetro $P_2 = K_d \cong 0,55 \text{ mM}$.

A curva obtida e mostrada na Figura 3.3 é uma hipérbole característica de processos de associação ligante-receptor para a formação de um complexo; com uma cinética de primeira ordem relativa à $[Ca^{2+}]$; evoluindo para um estado que pode ser considerado em equilíbrio, no qual o grau de associação se torna quase independente da concentração desse íon. Ao analisar a situação de equilíbrio da reação, de acordo com esse modelo, a constante de dissociação estimada é $K_d = 0,55$ mM. Essa análise foi feita para dirimir dúvidas surgidas no curso do presente trabalho já que em diferentes estudos há diferenças nesta concentração, com reflexos em parâmetros termodinâmicos relevantes, especialmente ΔH , ΔS e ΔCp [45]. Ademais, na faixa de 50 mM de $CaCl_2$ ou em concentrações acima dessa, a atividade cai dramaticamente, talvez como consequência de agregações entre as moléculas de β -tripsina [129]. Esses estudos adotam diferentes condições para as preparações, principalmente diferentes valores de pH ou diferentes condições de força iônica do meio. Essas diferenças devem ser exploradas em um outro estudo. Nas condições experimentais aplicadas neste trabalho, adotando-se uma concentração referencial de $CaCl_2$ de 25 mM, há garantias de que pequenas variações nesta concentração não devem interferir com os resultados obtidos. Além disso, por ser também adotada por outros autores [46] propicia chances de comparação de resultados. Portanto no curso do presente estudo tem-se a garantia de que aproximadamente 98 % da enzima encontra-se complexada com cálcio, conforme dado pela equação seguinte.

$$(\% \text{ sat}) = [Ca^{+2}] / (K_d + [Ca^{+2}]) = 25 / (0,55 + 25) = 0,978$$

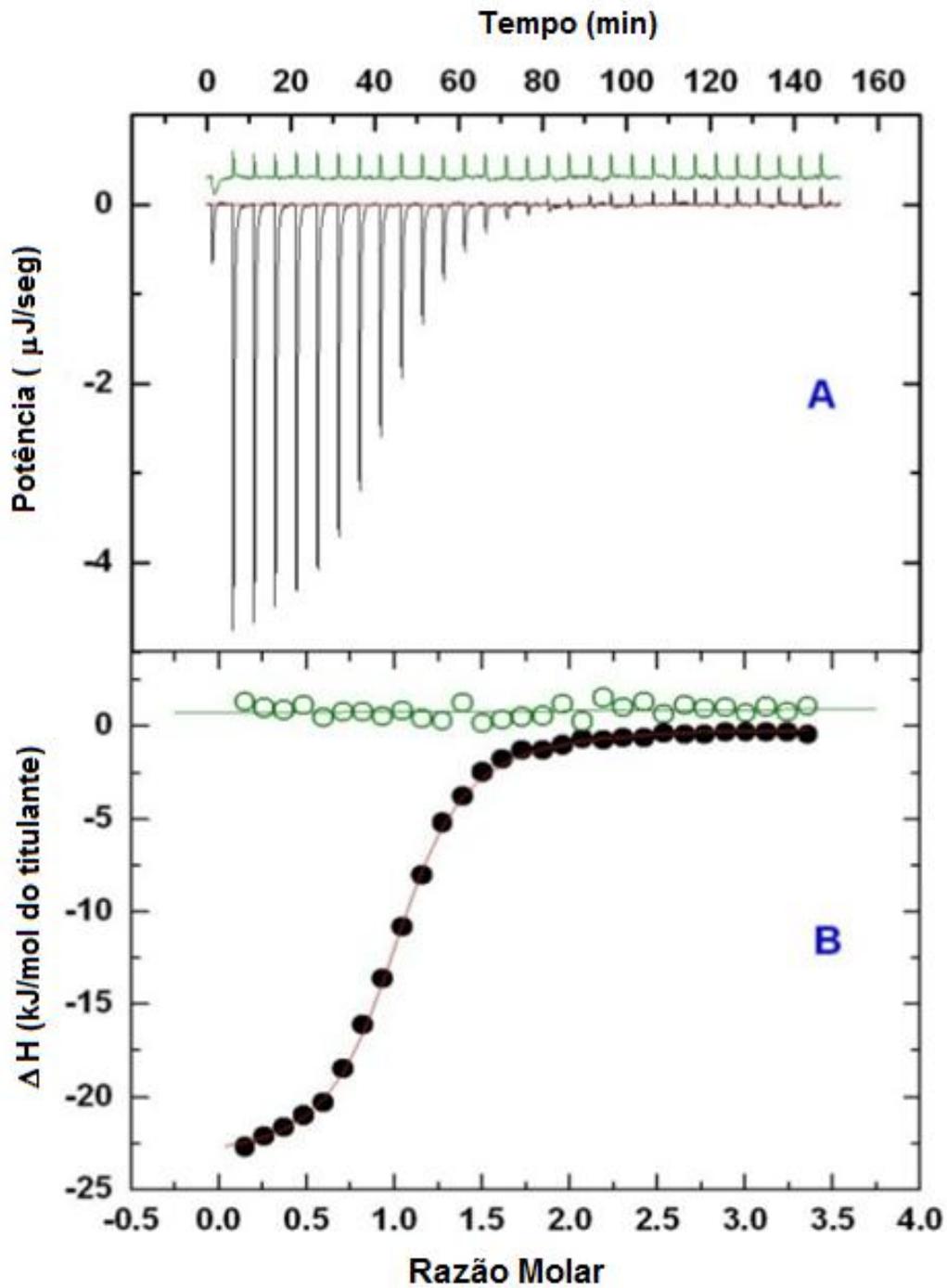
Portanto, pelos resultados de estabilidade da β -tripsina, as medições dos parâmetros termodinâmicos durante as titulações no microcalorímetro não devem sofrer influências conseqüentes de variações na concentração da forma ativa da enzima.

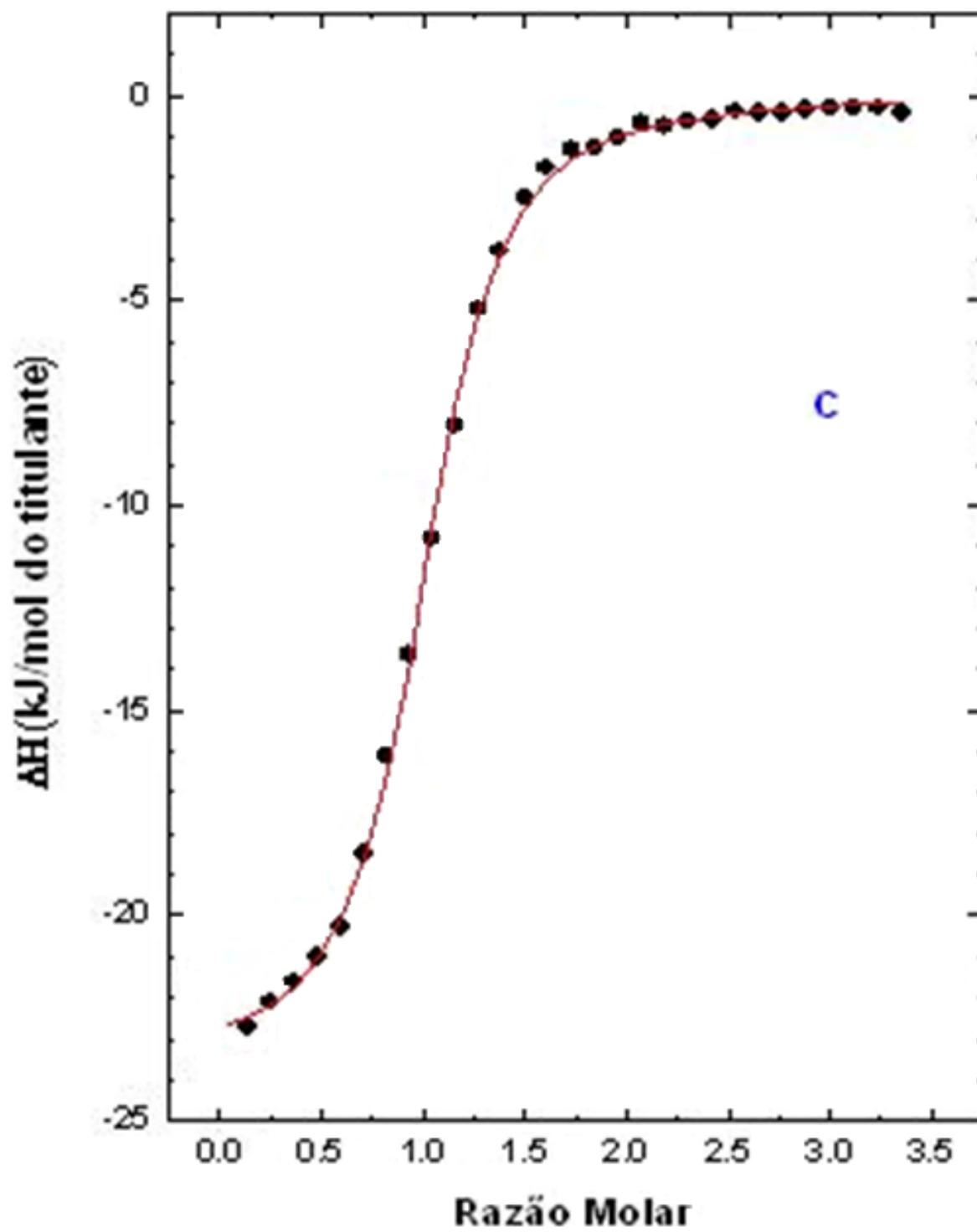
3.3 - Titulação calorimétrica

Após a purificação e o controle da qualidade da β -tripsina foram realizados os estudos para a caracterização termodinâmica das associações entre a enzima com os inibidores benzamidina e com o berenil. Esses estudos estão baseados nos experimentos realizados sob condição adiabática no ITC, onde, em um único ensaio é possível obter os parâmetros mais relevantes das reações que ocorrem no interior da célula específica do equipamento, chamada de célula da amostra. Na Figura 3.4 (páginas 56 e 57) é mostrado um termograma típico dos obtidos nos experimentos realizados.

Figura 3.4 - Isotermas da titulação calorimétrica da interação da β -tripsina com o berenil. Em **A** são mostrados, em preto, as taxas de variação do calor liberado por unidade de tempo na formação do complexo enzima-berenil em função da razão molar entre o titulante e o titulado e, em verde a taxa correspondente ao calor de diluição do titulante. Em **B** as quantidades de calor liberadas por mol de titulante adicionado correspondentes a cada injeção do titulante em função da razão molar entre titulante e titulado. A reta em verde corresponde à regressão linear ajustada aos pontos relativos ao calor de diluição do titulante. Em **C** é mostrado o termograma líquido, correspondente a subtração dos calores observados em cada injeção, valores correspondentes aos pontos em preto em **B**, pelos

valores correspondentes definidos pela reta da regressão linear. A linha vermelha em C corresponde aos pontos definidos pela aplicação da solução analítica de Wyman [122], considerando-se um único sítio de ligação do inibidor à enzima. (1 cal = 4,184 J [62])





O procedimento e a solução analítica para avaliar alguma participação de grupos ionizáveis da enzima nos resultados de medições dos calores envolvidos no interior da célula, durante as titulações, foram feitos conforme descrito em Materiais e Métodos; capítulo 2; item 2.1.6. Os resultados para ambos os inibidores são mostrados na Tabela 3.1 e em forma de gráfico na Figura 3.5, e indicam não haver o envolvimento de íons H^+ no processo de formação do complexo. Foram obtidos, respectivamente para as titulações com benzamidina e com berenil, nH^+ igual a $-0,03 \pm 0,03$ íons H^+ e igual a $0,04 \pm 0,12$ íons H^+ . Estes dados confirmam que o termo $nH^+ \times \Delta H_{tp}$ são negligenciáveis, confundindo-se com o erro inerente ao processo das medições, indicando que os valores observados de ΔH correspondem a valores líquidos referentes aos processos de associação enzima-inibidor.

Tabela 3.1 – Variações de entalpia para as associações entre a β -tripsina com os inibidores benzamidina (bz) e berenil (be) em função do ΔH de diferentes tampões.

Dados obtidos em pH 8,0, a 25 °C, na presença de $CaCl_2$ 25 mM.

Tampão	$\Delta H_{\text{tampão}}$ (kJ/mol)	ΔH_{bz} (kJ/mol)	ΔH_{be} (kJ/mol)
PIPES	11,46	-15,90	-15,48
HEPES	21,00	-16,95	-21,51
Tricina	31,97	-15,69	-19,58
Tris-HCl	47,53	-16,65	-17,07

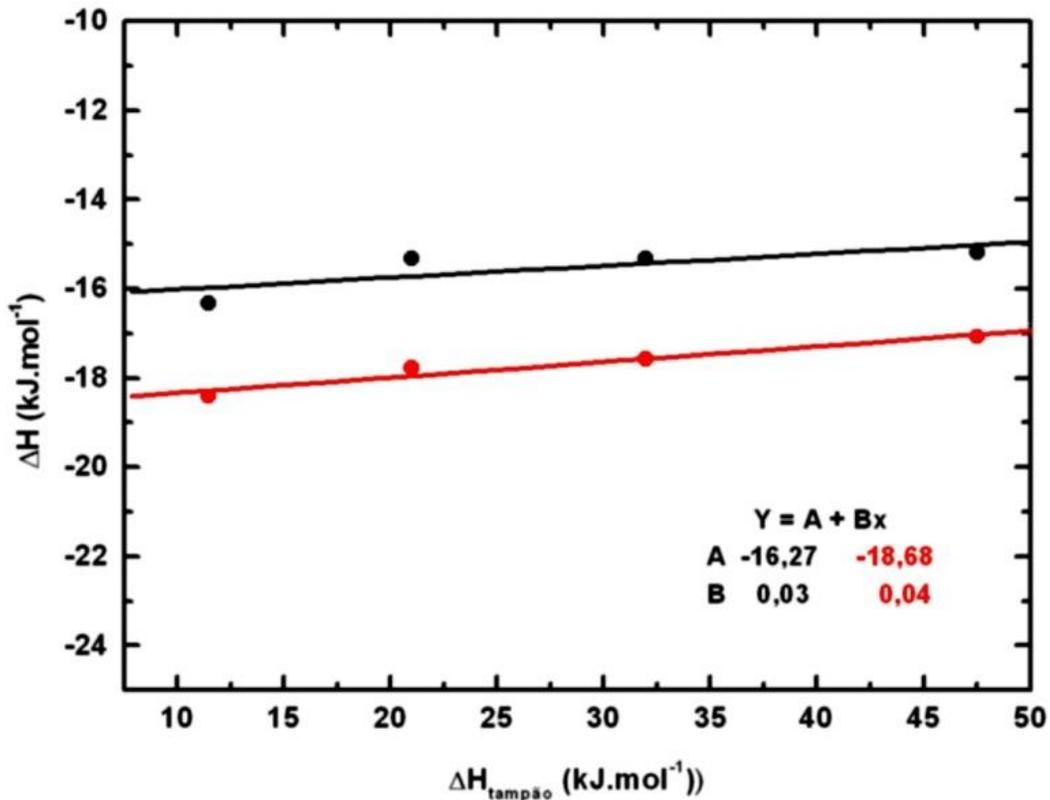


Figura 3.5 – ΔH medido para as associações entre a β -tripsina com os inibidores benzamida e berenil em tampões PIPES, HEPES, Tricina e Tris-HCl. A equação das retas é indicada à direita; dados em preto correspondem à benzamida e em vermelho ao berenil

Com mais este parâmetro controlado foram feitas as titulações programadas das associações da enzima com os inibidores em situação de estresse osmótico. Os resultados obtidos estão consolidados na Tabela 3.2 a seguir.

Tabela 3.2 – Parâmetros energéticos relativos à associação dos inibidores benzamidina e berenil com a β -tripsina sob situação de estresse osmótico. Dados obtidos com as preparações em tampão Tris-HCl 50 mM, mais CaCl₂ 25 mM, pH 8,0, a 25 °C (298 K).

	Osmolaridade (osm)	N	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)
BENZAMIDINA COMO LIGANTE					
Glicina como osmólito	0,00	0,957	-26,79	-15,17	38,99
	0,25	1,033	-26,84	-12,53	48,02
	0,50	1,028	-26,13	-7,08	63,93
	1,00	0,954	-25,70	-6,48	64,50
Glicose como osmólito	0,00	0,957	-26,79	-15,17	38,99
	0,38	1,126	-26,74	-15,15	38,89
	0,75	0,986	-26,17	-11,44	49,43
BERENIL COMO LIGANTE					
Glicina como osmólito	0,00	0,990	-32,95	-17,16	52,98
	0,38	0,993	-32,81	-12,33	68,72
	0,75	0,994	-32,17	-12,31	66,64
	1,00	0,909	-32,18	-10,03	74,36
Glicose como osmólito	0,00	0,990	-32,95	-17,16	52,98
	0,25	0,961	-32,17	-18,33	46,44
	0,50	0,945	-31,96	-14,10	59,93
	1,00	0,991	-32,23	-10,50	72,92

O valor médio de número de sítios de ligação para os dados com benzamidina é $N = 1,01 \pm 0,06$ e para os dados com berenil é $N = 0,97 \pm 0,03$. O valor global é $N = 0,99 \pm 0,05$. Quando os dados da Tabela 3.2 são analisados, um dos aspectos que chama a atenção é o fato de que a constante do equilíbrio da associação β -tripsina-berenil é cerca de 12 vezes maior que para a associação enzima-benzamidina. Da relação entre ΔG e a constante de equilíbrio, equação **A.1** do adendo 1, obtem-se $K_{\text{benzamidina}}$ é igual a $49.500 \pm 2.700 \text{ M}^{-1}$ e K_{berenil} é igual a $596.600 \pm 25.000 \text{ M}^{-1}$.

De acordo com dados da literatura científica [46, 125, 130] substituintes na posição *para* da benzamidina, dependendo das suas propriedades como grupos elétron doadores ou como elétron atraentes, interferem com a constante de equilíbrio da associação (afinidade). Os grupos elétron doadores intensificam a associação enquanto os elétron atraentes a diminuem [46, 130]. Esta intensificação ou diminuição está também correlacionada com a polarização que os substituintes ocasionam na molécula, envolvendo a sua maior ou menor hidratação no meio. É demonstrado [46, 125, 130] que quanto mais polar for o substituinte melhor ele se comporta como inibidor competitivo. Entretanto a diferença encontrada de afinidades, 12 vezes, não deve ser devida à contribuição do grupo triazeno ou do grupo fenil adicionais na posição *para* da benzamidina, já que as contribuições adicionais à hidrofobicidade ou de polaridade seriam insuficientes.

Ora, considerando-se que o berenil, ou bis-benzamidina, possui 2 faces equivalentes seria de se esperar a principio que a afinidade por mol fosse duas vezes maior. Esta diferença adicional de afinidade enseja prospecções suplementares para se

caracterizar a associação enzima-ligante. O que estaria favorecendo a interação com a bis-benzamidina? Uma primeira possibilidade aventada seria a força diretora de interações lipofílicas. O berenil possui um anel fenílico adicional em relação a benzamidina e a associação lipofílica seria favorecida por superfície complementar rígida e plana [46]. Embora a bis-benzamidina não seja exatamente plana, como pode ser visualizado por meio de modelagem molecular, o volume molar maior poderia oferecer áreas de contatos maiores favorecendo as interações lipofílicas.

Com experimentos relativamente simples a hipótese de contribuição lipofílica pôde ser testada, via análise da variação da capacidade calorífica do sistema. Em se tratando de reações envolvendo proteínas globulares, elevada variação na capacidade calorífica é considerada como sendo uma grande evidência de que interações lipofílicas sejam a força diretora para a associação com o ligante [131-134]. Por seu lado a variação da capacidade calorífica do sistema pode ser dimensionada em razão do vínculo existente com a entalpia.

A contribuição da entalpia para a associação pode ser analisada com o recurso da equação $\delta\Delta H = \Delta C_p \cdot \delta T$, que após a integração resulta: $\Delta H = \Delta C_p \cdot T + \text{constante}$ para ΔC_p constante no intervalo de temperatura estudado. A variação da capacidade calorífica pode, portanto, ser determinada graficamente através da inclinação da reta em gráfico de ΔH versus temperatura. Os resultados das titulações feitas nas temperaturas de 15 °C, 20 °C, 25 °C e 35 °C são mostrados na Figura 3.6, de onde se obtém os seguintes valores da variação da capacidade calorífica para as associações β -tripsina-inibitor, em tampão Tris-HCl, 50mM, com CaCl_2 25 mM, em pH 8,0, a 25 °C: $\Delta C_p = -469,4 \pm 51,4 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

para o sistema enzima-benzamidina, e $\Delta C_p = -464,7 \pm 23,9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ para o sistema enzima-berenil.

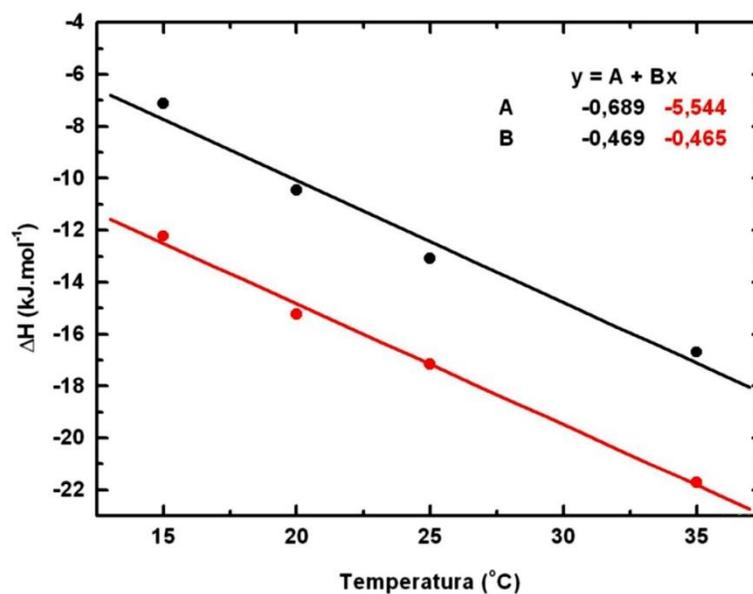


Figura 3.6 – Determinação de variações da capacidade calorífica para os sistemas β -tripsina-benzamidina (círculos pretos) e β -tripsina-berenil (círculos vermelhos). Na caixa inserida são indicados os parâmetros da equação das retas ($\Delta H = b_0 + bt$).

Esses resultados de ΔC_p permitem deduzir não haver maior favorecimento hidrofóbico para a associação envolvendo o berenil.

Outra característica peculiar das interações lipofílicas é a compensação entalpia-entropia, promovendo um tamponamento termodinâmico [135]. Uma análise preliminar sobre as contribuições dos termos ΔH e ΔS para a energia livre das associações estudadas, vide Tabela 3.2, indica estar havendo contribuições favoráveis tanto entálpicas quanto entrópicas.

O tamponamento termodinâmico ocorre em função de variações síncronas entre a entalpia e a entropia mantendo quase inalterada a energia livre da associação ou da reação considerada. Isto pode ser bem acompanhado através dos vínculos estabelecidos pelas equações $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. A combinação das equações, em situação de variações dos parâmetros envolvidos, resulta $\delta\Delta H / \delta T = \Delta C_p$ e $\delta(T\Delta S) / \delta T = \Delta C_p + \Delta S$. Para o caso em que o termo ΔS se torna negligenciável em relação a ΔC_p a dependência de ΔH e $T\Delta S$ se tornam um fator constante igual a ΔC_p e ΔG se torna um termo relativamente independente de T . Isto pode ser observado nas associações testadas, como pode ser visto na Figura 3.7 e comparando-se os valores de ΔC_p ($\sim 0,50 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) com os valores de ΔS ($\sim 0,05 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) da Tabela 3.2.

Com os dados obtidos e através das Figura 3.6 e 3.7 podemos ainda inferir as temperaturas nas quais a contribuição entálpica e a entrópica se tornam nulas, respectivamente T_H e T_S . $T_H = - 1,81 \text{ }^\circ\text{C}$ para a associação com a benzamidina e

$T_H = -12,0\text{ }^\circ\text{C}$ para o berenil; $T_S = 61,3\text{ }^\circ\text{C}$ para a benzamidina e igual a $66,6\text{ }^\circ\text{C}$ para o berenil.

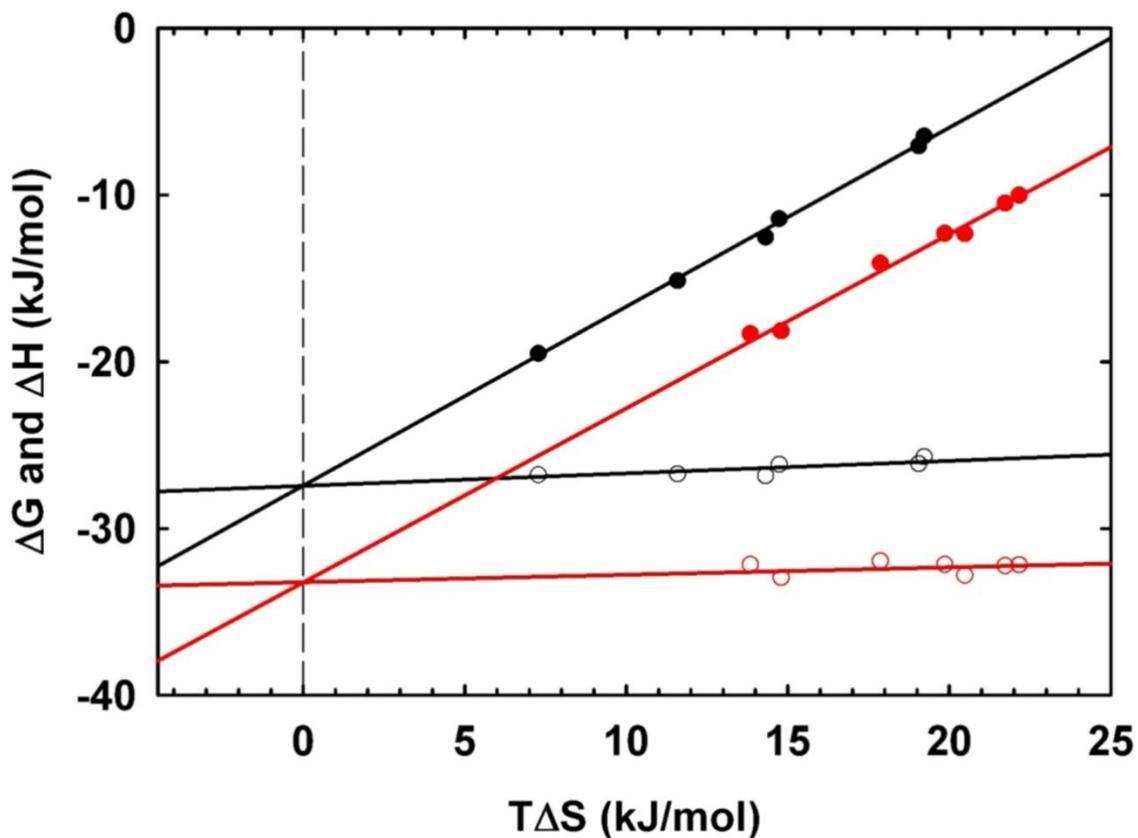


Figura 3.7 -Dependência de ΔG e ΔH com $T\Delta S$. Símbolos: círculos pretos para o sistema β -tripsina-benzamidina e círculos vermelhos para β -tripsina-berenil; valores de ΔH correspondem aos símbolos cheios enquanto os de ΔG correspondem aos vazios. Notar que quando $T\Delta S = 0$, $\Delta G = \Delta H$.

Os parâmetros relacionados à associação, até aqui considerados, induzem descartar a força diretora da interação lipofílica como responsável pela maior afinidade do berenil para a associação enzima-inibidor. O motivo para explicar a maior afinidade observada deve vir de outras forças diretoras para a energia livre da associação.

O reconhecido efeito de moléculas de água na estrutura [90, 99, 136] e na função das proteínas, influenciando a dinâmica macromolecular, fornece uma oportunidade de prospecção adicional sobre os aspectos energéticos envolvidos na interação enzima-inibidor. Isto foi feito usando o método do estresse osmótico [102, 103]. A partir da equação de Gibbs-Duhem pode-se demonstrar que, para uma proteína em diluição infinita: $d\Delta G = -\Delta N_a d\mu_a$. Nesta equação ΔN_a é a diferença no número de moléculas de água entre o estado macromolecular final e o número no estado inicial, e μ_a é o potencial químico da água ou de outro parâmetro correlacionado. A equação pode ser re-escrita na forma $d \ln K / d \ln a_a = \Delta N_{ae} = N_a^{EI} - (N_a^E + N_a^I)$. Nesta equação N_a^{EI} corresponde ao número de moléculas de água associadas com o complexo formado; N_a^E e N_a^I , respectivamente, é o número de moléculas de água associadas com a enzima livre e com o inibidor na preparação.

Para este estudo, o uso da glicose e da glicina como osmólitos segue a estratégia de Colombo e Bonilla-Rodrigues [124]. O propósito é excluir dos resultados uma possível interferência devida à mudança do valor da constante dielétrica da solução. Os dois osmólitos têm repercussões opostas nesta propriedade. Os resultados obtidos através do estresse osmótico são mostrados na Tabela 3.2. Os dados para cada inibidor foram

lançados em gráfico de $\ln(K/K_0)$ em função da atividade da água, como pode ser visto na Figura 3.8. Dentro do erro experimental as inclinações das retas são coincidentes; conseqüentemente resultando em um número igual de moléculas de água, independente do osmólito testado e do inibidor. Um aspecto importante a ressaltar é que embora os osmólitos glicina e glicose exerçam efeitos opostos na constante dielétrica da água eles apresentam efeitos similares sobre os parâmetros termodinâmicos relativos ao processo de associação dos dois inibidores competitivos com a β -tripsina. Por causa dessa similaridade; e para um melhor alinhamento estatístico dos resultados; os valores das constantes de equilíbrio foram normalizados e plotados em um único conjunto com uma regressão linear comum, como mostrado na figura 3.8. Da inclinação desta curva é determinado que o número de moléculas de água absorvida da solução pela enzima como conseqüência da associação é $21,1 \pm 3,4$. De fato, superfícies topologicamente distantes do sítio catalítico são consideradas participantes ativos nesta inclusão [93, 128].

De acordo com Parsegian et al. [102], "esse resultado é característico das reações com mudanças no número de moléculas de água que são seqüestradas em bolsas ou em cavidades estericamente inacessíveis". É reconhecido que as enzimas são mais estáveis na presença de substratos e de inibidores competitivos, e uma possível contração da enzima é relacionado à formação dos adutos correspondentes. De fato o resultado observado, inclusão de moléculas do solvente, inclui por si mesmo a participação de superfícies distantes no processo de associação uma vez que se esperaria ocorrer a exclusão de cerca de cinco moléculas de água na ligação do inibidor ao centro ativo da enzima. De acordo com dados de simulação computacional [137] o volume ocupado pela cadeia lateral da

arginina corresponde ao volume de seis moléculas de água, enquanto o volume correspondente para a cadeia lateral da lisina é equivalente a cinco moléculas de água. Nesse último caso uma molécula de água permanece na bolsa catalítica para compensar o menor comprimento da cadeia lateral [102].

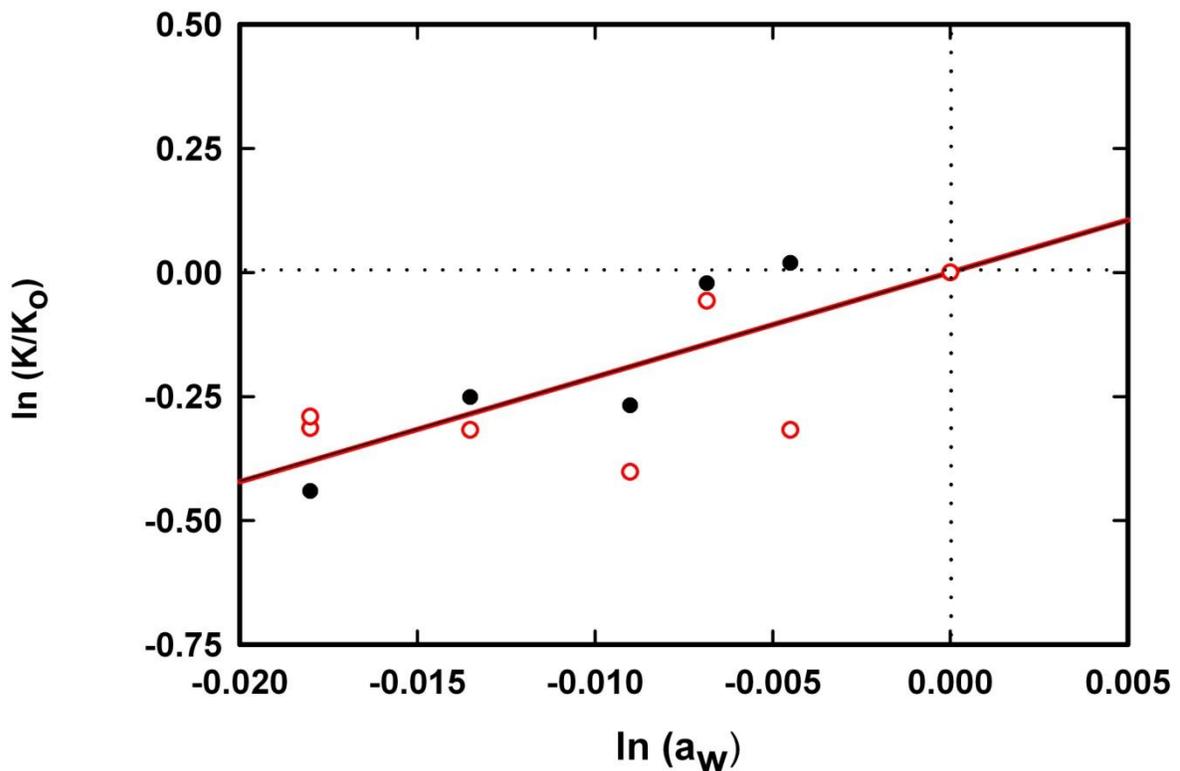
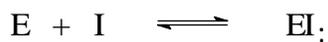


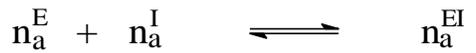
Figura 3.8 – Dependência da constante de formação dos complexos de β -tripsina com os inibidores benzamidina e berenil em função da atividade da água. Os dados referentes a cada conjunto inibidor e osmólito foram normalizados. Os círculos em preto correspondem aos dados para a benzamidina e os vermelhos correspondem aos dados para o berenil. O símbolo de coordenadas 0,00 x 0,000 representa dois pontos superpostos (um círculo preto e um vermelho).

Uma outra abordagem permite confirmar a inclusão de moléculas de água na formação do complexo enzima-inibidor. Esta pode ser acompanhada pela discussão abaixo e pela inspeção das diminuições de ΔG na Tabela 3.2 (conseqüência das reduções de K em função do aumento da osmolalidade).

Seja a equação química genérica:



acompanhada por variações na hidratação dos reagentes:



E corresponde à enzima; I ao inibidor; EI ao complexo formado; n_a ao número de moléculas de água de hidratação, com os superescritos caracterizando os reagentes.

Seja a constante de equilíbrio da formação do complexo:

$$K = [EI]/([E][I]).$$

Tomando como condições de referência, T e p constantes, composição química com μ_i constante, as variações no equilíbrio da reação da associação enzima-inibidor pela alteração do termo *água* é definida pela variação no seu potencial químico. Ou,

$$\frac{d \ln K}{d \ln a_a} = \Delta n_a = \left[\left(n_a^{EI} \right) - \left(n_a^E + n_a^I \right) \right].$$

Pode-se confirmar que se ocorre associação de água no processo de formação do complexo enzima-inibidor, ($\Delta N_a > 0$), e como há uma concomitante redução na atividade da água com o acréscimo do osmólito, há portanto um decréscimo na constante de

associação da reação de formação do complexo com conseqüente deslocamento do equilíbrio na direção dos reagentes.

Todos os resultados de parâmetros termodinâmicos até aqui obtidos neste estudo foram insuficientes para explicar a grande diferença de afinidade entre os dois inibidores pela β -tripsina; cerca de 12 vezes maior para o berenil; com diferença de 6,16 kJ/mol na energia livre de Gibbs. Desses resultados talvez o mais singular seja a similaridade na capacidade calorífica. Esta grandeza é considerada como uma “assinatura do efeito hidrofóbico”. O efeito hidrofóbico, em termos termodinâmicos, classicamente é caracterizado por uma alteração positiva na entropia e uma variação negativa alta no ΔC_p . Quanto maior for a diferença maior será a contribuição desse tipo de força diretora. Não é esse o caso observado para a reação envolvendo a benzamidina e o berenil; $\Delta C_p = -477,1 \pm 86,8 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e $\Delta C_p = -464,7 \pm 23,9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ respectivamente, embora se observe uma variação positiva bastante significativa no termo entropia; $\Delta S = 38,99 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e $\Delta S = 52,98 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, respectivamente para as reações envolvendo a benzamidina e berenil.

Resultados dos parâmetros energéticos referentes a associação tripsina-L (L= benzamidina, berenil, *p*-aminobenzamidina são também apresentados em forma gráfica na Figura 3.9. Esse tipo de representação permite visualizar as variações na energia livre de Gibbs, influenciadas por alterações estruturais dos reagentes. Uma ligação de hidrogênio adicional caracteristicamente incrementará o valor negativo de ΔG e o de ΔH (favoráveis à associação) embora torne $-T\Delta S$ mais positivo (desfavorável). A adição de um grupo hidrofóbico, para aumento na afinidade, resultará em um aumento

no valor negativo de ΔG e no de $-T\Delta S$ [138]. Pode-se observar que a *p*-aminobenzamidina apresenta dados condizentes com a ocorrência de uma ligação de hidrogênio adicional comparada à benzamidina (aumento no valor negativo de ΔH (11,7 kJ.mol⁻¹) e redução no valor negativo de $-T\Delta S$ (9,42 kJ.mol⁻¹)).

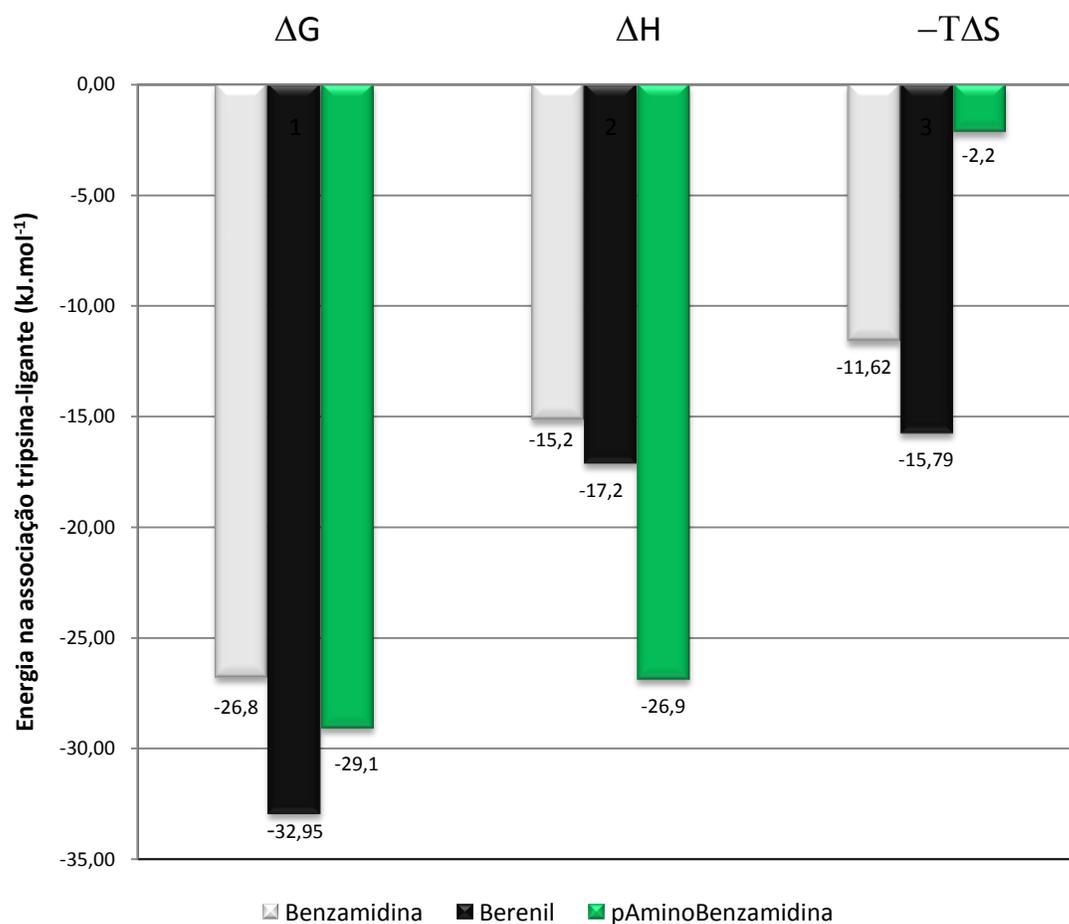


Figura 3.9. Parâmetros energéticos envolvidos na associação da tripsina com benzamidina, berenil e *p*-aminobenzamidina (Dados referentes a *p*-aminobenzamidina obtidos da referência [46]).

Para o caso da associação com o berenil, tomando-se novamente a benzamidina como referencia, não seriam ligações adicionais de hidrogênio responsáveis pelo aumento observado na afinidade. Isso é mais creditado ao termo entropia. O acréscimo significativo na contribuição entrópica pode ser atribuído ao fato do berenil apresentar duas extremidades iso-energéticas. Segundo Sturtevant “um acréscimo no número de conformações iso-energéticas em uma molécula resulta em um acréscimo na sua entropia sem qualquer alteração diretamente relacionada na capacidade calorífica” [138].

Torna-se conveniente considerar outros fatores que estariam envolvidos na reação. Fatores tais como impedimento estérico; efeito indutivo; interações dipolo-dipolo ou lipofílicas na superfície, fora da fenda de especificidade S_1 ; encobrimento de áreas superficiais da enzima; custo energético da desidratação no sitio ativo; têm sido considerados insuficientes para explicar completamente os resultados da interação entre a tripsina e ligantes estudados [135].

3.4 - Modelagem molecular

A fim de procurar outros fatores para elucidar a diferença nas afinidades foram então feitos estudos teóricos sobre a associação dos dois inibidores sob análise com a enzima. Adicionalmente, a p-aminobenzamidina foi incluída na análise devido à disponibilidade de dados experimentais na literatura [46, 125, 139], o que amplia o leque analítico, e ao fato de que a sua estrutura é muito relacionada às estruturas dos dois ligantes testados experimentalmente. Usando os programas AutoDock e SYBYL os complexos formados entre a β -trypsin (R) e os inibidores mencionados (L) foram otimizados (RL); as energias da enzima e dos ligantes isolados na conformação

farmacofórica foram avaliadas (respectivamente R_i e L_i) assim como as energias após a otimização das geometrias (respectivamente R_f e L_f). Esses resultados são mostrados na Tabela 3.3, onde também podem ser vistos os valores para energias de perturbação (E_p), de interação (E_i), e de ligação (E_b), calculadas de acordo com as equações seguintes.

$$E_p = E_{pR} + E_{pL} = (R_f - R_i) + (L_f - L_i);$$

$$E_i = RL - R_i - L_i, \text{ e}$$

$$E_b = E_i + E_p.$$

Tabela 3.3. Componentes energéticos teóricos relativos à associação da β -tripsina com os inibidores indicados (dados em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

	RL^b	R_i^b	R_f^b	L_i^b	L_f^b	E_i^b	E_b^b	E_{pR}^b	E_{pL}^b
Benz ^a	-2.380,0	-2.348,7	-2.494,1	15,5	13,2	-46,9	58,7	103,3	2,3
pAmB ^a	-2.379,7	-2.348,4	-2.494,2	14,5	12,7	-45,8	59,9	103,9	1,8
Berenil	-2.,435,9	-2.366,1	-2.503,1	36,9	28,6	-106,7	-3,6	94,9	8,2

^a - Benz significa benzamidina e pAmB, *p*-aminobenzamidina.

^b - RL representa o complexo enzima-inibidor após otimização da estrutura; R_i e L_i , respectivamente, a enzima e o inibidor isolados, na conformação farmacofórica; R_f (para a enzima) e L_f (para os ligantes) as energias após a otimização das geometrias, e E_p , E_i e E_b , respectivamente, as energias de perturbação, de interação e de associação.

As energias calculadas (E_p , E_i e E_b) para a benzamidina e a *p*-aminobenzamidina são razoavelmente próximas, o que é um reflexo da similaridade estrutural entre elas. Entre as energias de ligação calculadas apenas o berenil apresentou um valor negativo. Isto é consequente das elevadas perturbações causadas pelo ligante no sítio de ligação da tripsina (E_pR), de acordo com o campo da força aplicado. As energias da interação (E_i) refletem somente a interação intermolecular entre o ligante e as moléculas da enzima na conformação do complexo, após a otimização desse último com o SYBYL. É também importante observar que o berenil exibe a condição mais favorável para a interação em termos energéticos. O fato de que a energia da interação da benzamidina é ligeiramente mais favorável do que aquela da *p*-aminobenzamidina pode ser interpretado com base na dispersão da carga positiva do grupo amidina desta última. Isto ocorre porque o grupo amino, sendo um excelente doador de elétron, diminui a carga positiva da amidina, reduzindo assim a interação do grupo com o carboxilato Asp¹⁷¹ (Asp¹⁸⁹ na Figura 1.3) presente no fundo da bolsa do sítio S₁. Entretanto as determinações calorimétricas contradizem este resultado uma vez que a afinidade da *p*-aminobenzamidina é cerca de 4 vezes mais alta do que aquela da benzamidina [46, 139]. Esta discrepância pode ser devida à metodologia usada para os cálculos que não leva em conta a contribuição da solvatação diferencial dos complexos ou dos ligantes isolados. A variação na capacidade calorífica, ΔC_p , para ambos os inibidores sugere que a contribuição do efeito hidrofóbico deve ser negativa para ambos os compostos [134]. ΔC_p para a benzamidina é $-469,4 \pm 51,4 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (obtido neste trabalho) e $-519,0 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para a *p*-aminobenzamidina [46]. Os efeitos de solvatação e de de-solvatação dos ligantes, do

receptor e dos complexos, isto é, as mudanças na energia livre para transferir os ligantes do interior da solução para o sítio de ligação são exergônicos. O fato de que a carga positiva da amidina estar mais dispersa na *p*-aminobenzamidina deve diminuir a força da interação entre esse inibidor e as moléculas de água. Conseqüentemente o custo energético relacionado à liberação das moléculas de água em torno da molécula do ligante, necessária à associação, será menor para a *p*-aminobenzamidina comparada à benzamidina. Assim espera-se que a *p*-aminobenzamidina apresente uma constante de associação mais favorável do que a benzamidina, embora a interação específica dentro do sítio seja enfraquecida pela dispersão da carga.

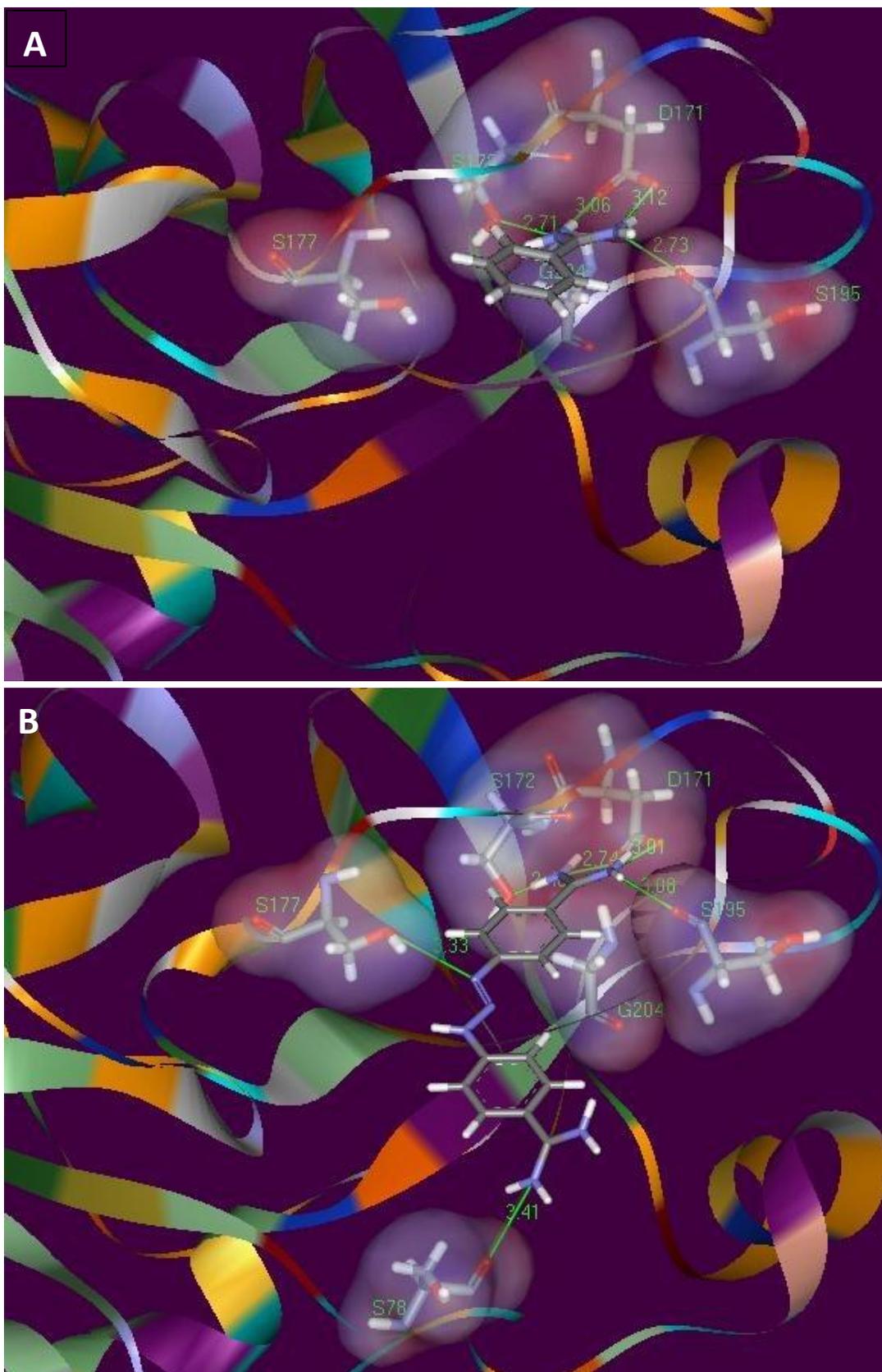
O efeito da dispersão da carga na energia livre da associação contém contribuições opostas: ao mesmo tempo em que enfraquece a interação entre o grupo amidina com o resíduo aspartato no fundo da bolsa, o que prejudica a interação, também enfraquece a interação entre o grupo amidina e as moléculas do solvente, favorecendo a interação. As energias livres de ligação obtidas dos estudos no ITC indicam que o último efeito deve ser o mais pronunciado. Entretanto estes efeitos necessitam ser melhor investigados levando-se em conta as áreas superficiais acessíveis ao solvente e calculando a energia livre da solvatação, a fim de se obter algumas prospecções sobre os efeitos de solvatação e de de-solvatação na energética da formação do complexo.

A ocorrência de ligações do hidrogênio é outro fator importante na estabilização da associação dos inibidores às enzimas, refletindo na estabilidade do complexo. Estudos com mutantes, onde essa ligação está ausente, confirmam a sua importância para a

estabilidade do aduto proteínas-ligantes [138-140]. Então, no trabalho atual, avaliamos as possibilidades desse tipo de interação entre as moléculas analisadas.

Dados calorimétricos indicam que ligações de hidrogênio podem ser tanto entalpicamente favoráveis quanto entropicamente desfavoráveis. Isso, possivelmente porque a formação de interações por ligações de hidrogênio ótimas requer a imobilização do ligante, da molécula de água e/ou de grupos importantes da proteína [141]. A Figura 3.10 mostra os três inibidores na bolsa do sítio catalítico S_1 da β -tripsina após a otimização e a minimização das energias com o programa SYBYL. É possível observar que a *p*-aminobenzamidina pode formar uma ligação adicional de hidrogênio com o grupo OH do resíduo Ser¹⁷⁷(Ser¹⁹⁵ – Figura 1.3). O berenil mostra diversas interações com a tripsina, algumas no interior da bolsa S_1 com resíduos Asp¹⁷¹ e Ser¹⁹⁵ (Asp¹⁸⁹ e Ser²¹⁷-Figura 1.3), e adicionalmente com resíduos Ser¹⁷⁷(Ser¹⁹⁵-Figura 1.3), His⁴⁰(His⁵⁷-Figura 1.3), e Ser⁷⁸(Ser⁹⁶-Figura 1.3) situados fora do sítio.

Ligações de hidrogênio, quando ótimas, repercutem no valor de ΔG usualmente entre 4,2 kJ.mol⁻¹ e 25 kJ.mol⁻¹ [142]. A força desse tipo de ligação depende do doador, do receptor, do ângulo formado pelos orbitais envolvidos, da preparação e da distância entre os átomos [141]. No caso presente (*p*-aminobenzamidina-tripsina) corresponde a 2,3 kJ.mol⁻¹ (benzamidina como referencia) e a distância obtida pela modelagem molecular é de 0,35 nm (3,5 Å); dados não muito elucidativos para se considerar ligações de hidrogênio. Deve-se no entanto observar que na modelagem aqui apresentada não foi considerada a possibilidade da ocorrência de uma molécula de água ao fundo da bolsa S_1 .



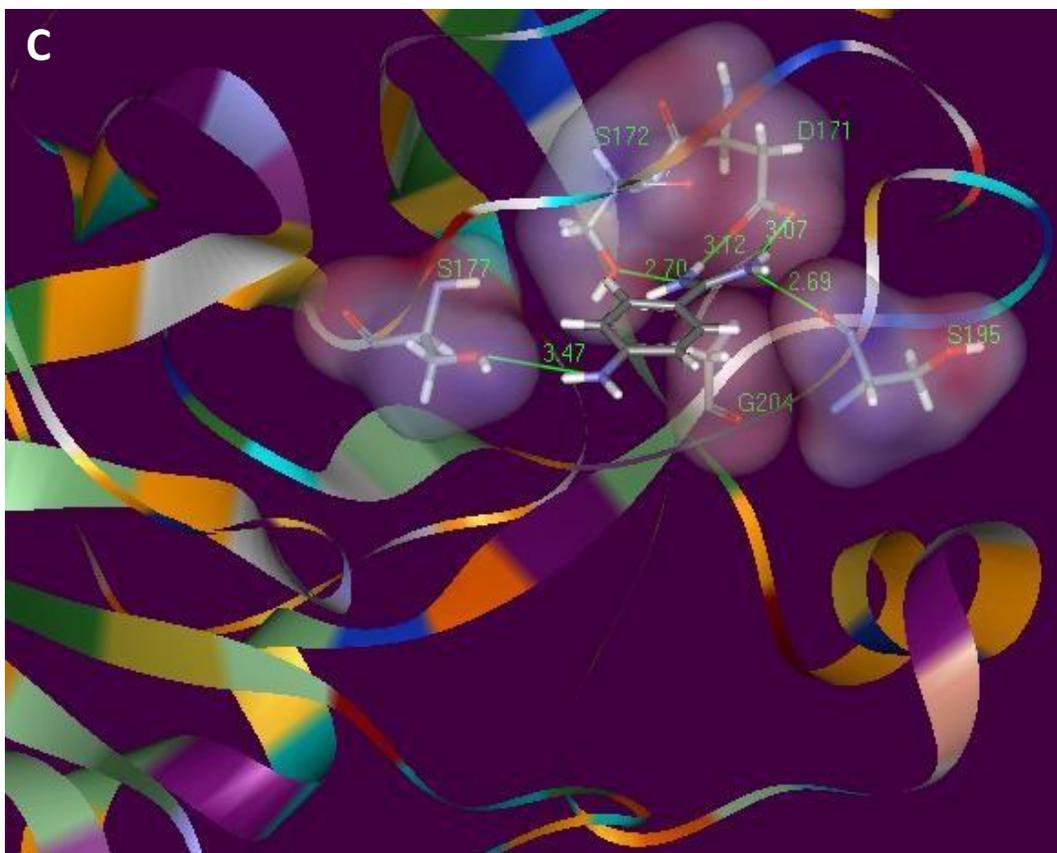


Figura 3.10 – Interações da benzamidina (A), berenil (B) e *p*-aminobenzamidina (C) com resíduos da β -tripsina no sítio catalítico S_1 e vizinhanças. São mostrados apenas os resíduos envolvidos e as possíveis ligações de hidrogênio. Os átomos dos resíduos estão indicados por correspondentes raios de Van der Waals. Observar que comparativamente à benzamidina, a *p* pode formar uma ligação de hidrogênio adicional com Ser¹⁷⁷, e que o berenil, adicionalmente à uma possível ligação com Ser¹⁷⁷, pode formar outra ligação com Ser⁷⁸. Os resíduos Asp¹⁷¹, Ser¹⁹⁵ e Gly²⁰⁴, todos permitindo a formação destas ligações com os três inibidores, estão localizados mais ao fundo da bolsa S_1 . O resíduo Ser¹⁷⁷ está localizado à entrada desta bolsa e o Ser⁷⁸ do lado de fora de S_1 . Figuras produzidas com o programa Sybyl [128].

Para o caso da associação com o berenil ele mostra uma energia muito mais negativa de interação do que as duas benzamidas e, apesar de apresentar diversos pontos de contato com o receptor, mostra uma energia de perturbação com caráter positivo menor (Tabela 3.1). Chama a atenção na Figura 3.9 o incremento significativo no valor negativo de $-T\Delta S$ correspondente. Embora sejam previstas duas ligações de hidrogênios adicionais (Figura 3.10), comparado à benzamida, o valor do termo ΔH é menor que para a *p*-aminobenzamida (Figura 3.9), possivelmente devido ao tamponamento termodinâmico. Estas duas ligações devem também serem fracas, ou negligenciáveis, já que as distancias entre os átomos envolvidos são consideravelmente longas; 0,33 nm (3,33 Å) no caso $N_{\text{triazeno}}\text{-Ser}^{177}$ (ou Ser^{195} -Figura 1.3) e 0,34 nm no caso $N_{\text{triazeno}}\text{-Ser}^{78}$ (ou Ser^{96} -Figura 1.3). O incremento no valor negativo do termo $-T\Delta S$ deve então ser consequência de uma possível interação entre o grupo fenila externo do berenil com outro grupo na superfície externa da enzima com formação de correspondente “ligação” π - π . Essa interação deve ser estudada em trabalhos subseqüentes.

Estes resultados explicam qualitativamente os dados calorimétricos obtidos.

A conclusão mais importante, baseada nos dados obtidos através deste estudo, é que a benzamida e o berenil se confirmam como moléculas altamente promissoras como ponto de partida para a síntese de derivados químicos que possam atuar como ligantes ou inibidores mais eficazes para a tripsina e outras serinoproteases. O planejamento de ligações de hidrogênio ou de formação de complexos π que possam

atuar fora do sítio S_1 , na superfície da proteína, são novas diretrizes importantes para os projetos de sínteses.

4 - CONCLUSÕES

1- Todos os parâmetros termodinâmicos da associação entre a β -tripsina com os inibidores competitivos benzamidina e berenil foram determinados. Estão definidos a temperatura, pressão, composição, possíveis variações na composição do solvente, constantes de associação, variações nas capacidades caloríficas dos sistemas, relações estequiométricas, variações na energia livre, variações de entalpia, variações na entropia, o envolvimento de moléculas de água e conseqüente avaliação da sua contribuição energética aos processos de associação em estudo. Por conseguinte, os estados dos sistemas foram definidos em acordo com a definição de Gilbert Castellan [62] de que “um sistema está num estado definido quando cada uma de suas propriedades tem um valor definido”.

2- Todos os objetivos estabelecidos para esse estudo foram alcançados.

3- Pelo que foi possível encontrar na literatura científica, pela primeira vez é feita uma análise tão completa, baseada em dados experimentais, das forças diretoras da associação da β -tripsina com inibidores sintéticos; do envolvimento e da contribuição de moléculas de água aos processos.

4- A proposição de síntese de inibidores que propiciem ligações de hidrogênio fora da bolsa catalítica, projetados para atuarem como um grampo na superfície da enzima, estabelece uma estratégia importante para o planejamento de novos fármacos, com maiores afinidades.

5 – REFERÊNCIAS

- 01 - Qiu, X.; Culp, J.S.; DiLella, A.G.; Hellmig, B.; Hoog, S.S.; Janson, C.A., Smith, W.W. and Abdel-Meguid, S. (1996) Unique fold and active site in cytomegalovirus protease. *Nature*, 383:275-279.
- 02 – Czapinska, H. and Otlewski, J. (1999). Structural and energetic determinants of the S₁-site specificity in serine proteases. *European Journal of Biochemistry*, 260:571-595.
- 03 - Hörn, H. and Heidland, A., eds (1992). Proteases: Potential Role in Health and Diseases. Plenum Press, New York.
- 04 - Neurath, H. (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, 224:350-357
- 05 - Baba, T.; Kaswabara, S. and Watanabe, K. (1989). Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *Journal of Biological Chemistry*. 264:11920-11927.
- 06 - Davie, E.W.; Fujikawa, K. and Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry*, 30:10363-10370.
- 07 - Watorek, W.; Farley, D.; Salvesen, G. and Travis, J. (1988). Neutrophil elastase and cathepsin G: structure, function, and biological control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 240:23-31.
- 08 - Henderson, B.R.; Tansey, W.P.; Phillips, S.M.; Ramshaw, I.A. and Kefford, R.F. (1992). Transcriptional and posttranscriptional activation of urokinase plasminogen

- activator gene expression in metastatic tumor cells. *Cancer Research.*, 52:2489 - 2496.
- 09 - Froelich, C.J.; Zhang, X.; Turbov, J.; Hudig, D.; Winkler, U. and Hanna, W.L. (1993). Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *The Journal of Immunology*, 151:7161 - 7171.
- 10 - Lluch, O.F.; Galindo, M.F. Cena, V. and Jordan, J. (2004). The serine proteases and their function in neuronal death processes. *Rev Neurol*, 38:449-457.
- 11 - Mares-Guia, M. and Shaw, E. (1965). Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *Journal of Biological Chemistry*, 240:1579-1585.
- 12 – Koshikawa, N.; Hasegawa, S.; Nagashima, Y.; Mitsuhashi, K.; Tsubota, Y.; Miyata, S.; Miyagi, Y.; Yasumitsu, H. and Miyazaki, K. (1998). Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *American Journal of Pathology*, 153:937-944.
- 13 – Rothman, S.; Liobow, L. and Isenman, L. (2002). Conservation of digestive enzymes. *Physiological Review*, 82:1-18.
- 14 - Isenman, L.; Liebow, C. and Rothman, S. (1999). The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 276:223 – 232.

- 15 - Pasternak, A., Ringe, D. and Hedstrom, L. (1999). Comparison of anionic and cationic trypsinogens: The anionic activation domain is more flexible in solution and differs in its mode of BPTI binding in the crystal structure. *Protein Science*, 8:253–258.
- 16 - Kukor, Z.; Tóth, M. and Sahin-Tóth, M. (2003). Human anionic trypsinogen: Properties of autocatalytic activation and degradation and implications in pancreatic diseases. *European Journal of Biochemistry*, 2003,270:2047 – 2058.
- 17 - Rinderknecht, H.; Renner, I.G.; Abramson, S.B. and Carmack, C. (1984). Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology*, 86:681-92.
- 18 - Wiegand, U.; Corbach, S.; Minn, A.; Kang, J. and Muller-Hill, B. (1993). Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene*, 136:167–175.
- 19 - Baptista, A.M.; Jonson, P.H.; Hough, E. and Petersen, S.B. (1998). The origin of trypsin: evidence for multiple gene duplications in trypsins. *J. Mol. Evol.*, 47:353-362.
- 20 - Chen, J.M. and Ferec, C. (2000). Gene conversion-like missense mutations in the human cationic trypsinogen gene and insights into the molecular evolution of the human trypsinogen family. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71:463-469.
- 21 - Keller, P.J. and Allan, B.J. (1967). The Protein Composition of Human Pancreatic Juice. *Journal of Biological Chemistry*, 242:281-287.

- 22 - Scuro, L.A.; Cavallini, G.; Angelini, G.; Pederzoli, P. and Vantini, I. (1991). Acute and chronic pancreatitis: an up-date. *Ann Ital Med Int*, 6:117-125.
- 23 - Teich, N.; Le Marechal, C.; Kukor, Z.; Caca, K.; Witzigmann, H.; Chen, J.M.; Toth, M.; Mossner, J.; Keim, V.; Ferec, C. and Sahin-Toth, M. (2004). Interaction between trypsinogen isoforms in genetically determined pancreatitis: mutation E79K in cationic trypsin (PRSS1) causes increased transactivation of anionic trypsinogen (PRSS2). *Hum Mutat*, 23:22-31.
- 24 - Whitcomb, D.C. (1999). Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. *Gut*, 45:317 - 322.
- 25 - Vasseur, S.; Folch-Puy, E.; Hlouschek, V.; Garcia, S.; Fiedler, F.; Lerch, M.M.; Dagorn, J.C.; Closa, D. and Iovanna, J. L. (2004). p8 Improves Pancreatic Response to Acute Pancreatitis by Enhancing the Expression of the Anti-inflammatory Protein Pancreatitis-associated Protein I. *Journal of Biological Chemistry*, 279:7199 – 7207.
- 26 - Swaroop, V.S.; Chari, S.T. and Jonathan E. Clain, J.E. (2004). Severe Acute Pancreatitis. *JAMA, (The Journal of the American Medical Association)*, 291:2865 – 2868.
- 27 - Voytek, P. and Erland C. Gjessing, E.C. (1971). Studies of an Anionic Trypsinogen and Its Active Enzyme from Porcine Pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 246:508 – 516.

- 28 - Szmola, R.; Kukor, Z. and Sahin-Tóth, M. (2003). Human Mesotrypsin Is a Unique Digestive Protease Specialized for the Degradation of Trypsin Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 278:48580 – 48589.
- 29 - Nyaruhucha, C.N.M.; Kito, M. and Shin-Ichi Fukuoka, S. (1997). Identification and Expression of the cDNA-encoding Human Mesotrypsin(ogen), an Isoform of Trypsin with Inhibitor Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 272:10573 – 10578.
- 30 - Kikuchi, N.; Nagata, K.; Shin, M.; Mitsushima, K.; Teraoka, H. and Yoshida, N. (1989). Site-directed mutagenesis of human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Journal of Biochemistry*. (Tokyo), 106:1059 – 1063.
- 31 - Ota, N.; Stroupe, C.; Ferreira-da-Silva, C.M.; Shah, S.A.; Mares-Guia, M. and Brunger, A.T. (1999). Non-Boltzmann thermodynamic integration (NBTI) for macromolecular systems: relative free energy of binding of trypsin to benzamidine and benzylamine. *Proteins*, 37:641-53.
- 32 - Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18:2714-2723.
- 33 - Pubols, M.H.; Bartelt, D.C. and Greene, L.J. (1974). Trypsin Inhibitor from Human Pancreas and Pancreatic Juice. *Journal of Biological Chemistry*, 249:2235 – 2242.
- 34 - Feeney, R.E.; Means, G.E. and Bigler, J.C. (1969). Inhibition of Human Trypsin, Plasmin, and Thrombin by Naturally Occurring Inhibitors of Proteolytic Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 244:1957 – 1960.

- 35 - Maliar, T.; Jedinak, A.; Kadrabova, J. and Sturdik, E. (2004). Structural aspects of flavonoids as trypsin inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39: 241-248.
- 36 - Stenman, U. (2002). Tumor-associated Trypsin Inhibitor. *Clinical Chemistry*, 48:1206 – 1209.
- 37 - Yamashita, K.; Mimori, K.; Inoue, H.; Mori, M. and Sidransky, D. (2003). A Tumor-suppressive Role for Trypsin in Human Cancer Progression. *Cancer Research*, 63:6575 – 6578.
- 38 - Mogensen, O.; Mogensen, B. and Jakobsen, A. (1990). Tumour-associated trypsin inhibitor (TATI) and cancer antigen 125 (CA 125) in mucinous ovarian tumours. *British Journal of Cancer*, 61:327-339.
- 39 - Pasanen, P.; Eskelinen, M.; Kulju, A.; Penttila, I.; Janatuinen, E. and Alhava, E. (1995). Tumour-associated trypsin inhibitor (TATI) in patients with colorectal cancer: a comparison with CEA, CA 50 and CA 242. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 55(2):119-124.
- 40 - Bhattacharyya, J. and L Chaudhuri, L. (1990). Alpha 1-antitrypsin: a possible tool for diagnosis of cervical cancer. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 43:243-5.
- 41 - Yavelow, J.; Finlay, T.H.; Kennedy, A.R. and Troll, W. (1983). Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Research*, 43:2454 - 2459. Lippman,

- S.M and Matrisian, L.M. (2000). Protease Inhibitors in Oral Carcinogenesis and Chemoprevention. *Clinical Cancer Research*, 6:4599-4603.
- 42 - Koshland, D.E. (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *PNAS*, 44:98 - 104.
- 43 - Ma, B.; Kumar, S.; Tsai, C. and Nussinov, R. (1999). Folding funnels and binding mechanisms. *Protein Engineering*, 12:713 - 720.
- 44 - Rauh, D.; Klebe, G. and Stubbs, M.T. (2004). Understanding protein-ligand interactions: the price of protein flexibility. *Journal of Molecular Biology*, 335:1325-1341.
- 45 - Penha-Silva, N. (1989). O Efeito de Substituintes sobre a Formação de Complexos entre a α -tripsina Bovina e *para*-Derivados do Íon Benzamidínio: um Estudo Termodinâmico. *DSc Thesis*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- 46 - Talhout, R. and Engberts, J.B.F.N. (2001). Thermodynamic analysis of binding of p-substituted benzamidines to trypsin. *European Journal of Biochemistry*, 268:1554-1560.
- 47 - Bloomfield, (2002). Thermodynamics and Statistical Thermodynamics. <http://www.biophysics.org/btol/thermo.html>.
- 48 - Rand, R.P. (2004). Probing the role of water in protein conformation and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B. Biological Sciences*, 359:1277-1284.

- 49 - Watson, J.D.; Hopkins, N.H.; Roberts, J.W.; Steitz, J.A. and Weiner, A.M. (1988). *Molecular Biology of the Gene*. 4th Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, CA.
- 50 - Cristea, I.M.; Gaskell, S. J. and Whetton, A.D. (2004). Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood*, 103:3624 - 3634.
- 51 - Yon, J.M. (2001). Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34:419-435.
- 52 - Onuchic, J.N. and Wolynes, P.G. (2004). Theory of protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 14:70-75.
- 53 - Maehle, A.H. (2004). "Receptive substances": John Newport Langley (1852-1925) and his path to a receptor theory of drug action. *Medical History*, 48:153-74.
- 54 - Stryer, L. *Biochemistry*, 4th ed., W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1995.
- 55 - Tsai, C.; Kumar, S.; Ma, B. and Nussinov, R. (1999). Folding funnels, binding funnels, and protein function. *Protein Science*, 8:1181-1190.
- 56 - Xia, X. and Levitt, M. (2004). Funnel-like organization in sequence space determines the distributions of protein stability and folding rate preferred by evolution. *Proteins*, 55:107-14.
- 57 - Shirley, B.A.; Stanssens, P.; Hahn, U. and Pace, C.N. (1992). Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochemistry*, 31:725-732.

- 58 - Jacobs, D.J. and Dallakyan, S. (2005). Elucidating Protein Thermodynamics from the Three-Dimensional Structure of the Native State Using Network Rigidity. *Biophysical Journal*, 88:903 - 915.
- 59 - van Oss, C.J. (2003). Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *Journal of Molecular Recognition*, 16:177-190.
- 60 - Eisenberg, D. and Crothers, D. (1979). Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA.
- 61 - Rupley, J.A. and Careri, G. (1991). Protein Hydration and Function. In.: *Advances in Protein Chemistry*, 41:37-172.
- 62 - Castellan, G. (1986). Fundamentos de Físico Química (Trad.: C.M.P.Santos e R.B. Faria). Livros Técnicos e Científicos Ed. S.A., Rio de Janeiro, R.J.
- 63 - CRC Handbook of Chemistry and Physics. David R. Lide Editor-in-Chief, CRC Press, Boca Raton, 84 th ed. 2004.
- 64 - Cooper, A.; Johnson, C.M.; Lakey, J.H. and Nollmann, M. (2001). Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophysical Chemistry*, 93:215-230.
- 65 - Stickle, D.F.; Presta, L.G.; Dill, K.A. and Rose, G.D. (1992). Hydrogen bonding in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, 226:1143-1159.

- 66 - Privalov, P.L. and Gill, S.J. (1988). Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Advances in Protein Chemistry*, 39:191-234.
- 67 - Burley S.K. and Petsko, G.A. (1988). Weakly polar interactions in proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 39:125-189.
- 68 - Betz, S. F. (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Science*, 2:1551 - 1558.
- 69 - Davie, E.W. and Neurath, H. (1955). Identification of a Peptide Released During Autocatalytic Activation of Trypsinogen. *Journal of Biological Chemistry*, 212:515 - 530.
- 70 - Desnuelle, P. and Fabre, C. (1955). The N-terminal sequence of trypsinogen and its removal during its activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 18:49-57.
- 71 - Kunitz, M. (1939). Formation of Trypsin from Crystalline Trypsinogen by means of Enterokinase. *The Journal of General Physiology*, 22:429 - 446.
- 72 - Kay, J. and Kassell, B. (1971). The Autoactivation of Trypsinogen. *Journal of Biological Chemistry*, 246:6661 - 6665.
- 73 - Schroeder, D.D. and Shaw, E. (1968). Chromatography of Trypsin and Its Derivatives. Characterization of a new active form of bovine trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 243:2943 - 2949.
- 74 - Foucault, G.; Seydoux, F. and Yon, Y. (1974). Comparative kinetic properties of alpha, beta and psi forms of trypsin. *European Journal of Biochemistry*, 47:295 - 302.

- 75 - Smith, R.L. and Shaw, E. (1969). Pseudotrypsin. A Modified Bovine Trypsin Produced by Limited Autodigestion. *Journal of Biological Chemistry*, 244:4704 - 4712.
- 76 - Teixeira, A.E. (1977). Purificação e caracterização de uma nova forma ativa de tripsina bovina, MSc thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- 77 - Perkins, S.J. and Wuthrich, K. (1980). Conformational transition from trypsinogen to trypsin. ^1H nuclear magnetic resonance at 360 MHz and ring current calculations. *Journal of Molecular Biology*, 138:43-64
- 78 - Notredame, C.; Higgins, D.G. and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302:205-17.
- 79 - Fersht, A.R. (1972). Conformational equilibria in A- and B-chymotrypsin. The energetics and importance of the salt bridge. *Journal of Molecular Biology*, 64:497-509.
- 80 - Knights, R.J. and Light, A. (1976). Disulfide bond-modified trypsinogen. Role of disulfide 179-203 on the specificity characteristics of bovine trypsin toward synthetic substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 251:222 - 228.
- 81 - Fehlhhammer, H.; Bode, W. and Huber, R. (1977). Crystal structure of bovine trypsinogen at 1-8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, refined crystal structure and comparison with bovine trypsin. *Journal of Molecular Biology*, 111:415-438.

- 82 - Kossiakoff AA, Chambers JL, Kay LM et al. (1977). Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 16:654-664.
- 83 - Santoro, M.M., Liu, Y., Khan, S.M.A.; Hou, L. and Bolen, D.W. (1992). Increased thermal stability of proteins in the presence of natural occurring osmolytes. *Biochemistry*, 31:278-283.
- 84 - Leiros, H.S.; Willassen, N.P. and Smalås, A.O. (2000). Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins: Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *European Journal of Biochemistry*, 267:1039 - 1049.
- 85 - Vieille, C and Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65:1 - 43.
- 86 - Szabó, E.; Böcskei, Z.; Náráy-Szabó, G. and Gráf, L. (1999). The three-dimensional structure of Asp189Ser trypsin provides evidence for an inherent structural plasticity of the protease. *European Journal of Biochemistry*, 263:20 - 26.
- 87 - Jelinek, B.; Antal, J.; Venekei, I. and Gráf, L. (2003). Converting Chymotrypsin to Trypsin. *Protein Engineering, Design & Selection*, Ed. By Valerie Daggett. Oxford University Press. England
- 88 - Bode, W and Huber, H. (1992). Natural protein protease inhibitors and their interaction with proteases. *European Journal of Biochemistry*, 204:433 - 451.

- 89 - Feeney, R.E.; Means, G.E. and Bigler, J.C. (1969). Inhibition of Human Trypsin, Plasmin, and Thrombin by Naturally Occurring Inhibitors of Proteolytic Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 244:1957 - 1960.
- 90 - Helland, R.; Otlewski, J.; Sundheim, O.; Dadlez, M. and Smalas, A. O. (1999). The Crystal Structures of the Complexes Between Bovine b-Trypsin and Ten P1 Variants of BPTI. *Journal of Molecular Biology*, 287:923-942.
- 91 - Parsegian, V.A. (2002). Protein-water interactions. *Int Rev Cytol*, 215:1-31.
- 92 - Timasheff, S.N. (1992). Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry*, 31:9857-64.
- 93 - Fischer, S., Verma, C.S., Hubbard, R.E. (1998). Rotation of Structural Water inside a Protein: Calculation of the Rate and Vibrational Entropy of Activation. *Journal of Physical Chemistry B*, 102:1797-1805,
- 94 - Guinto, E. R.; Caccia, S; Rose, T.Y.; Tterer, K.F.; Waksman, G. and Di Cera, E. (1999). Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. *PNAS*, 96:1852-1857.
- 95 - Sanschagrín, P.C., and Kuhn, L.A. (1998). Cluster analysis of consensus water sites in thrombin and trypsin shows conservation between serine proteases and contributions to ligand specificity. *Protein Science*, 7:2054 - 2064.
- 96 - Ernst, J.A., Clubb, R.T., Zhou, H.X., Gronenborn, A.M. and Clore, G.M. (1995). Demonstration of positionally disordered water within a protein hydrophobic cavity by NMR. *Science*, 267:1813-1817.

- 97 - Davis-Searles, R.R, Saunders, A.J., Erie, D.A., Winzor, D.J., Pielak, G.J. (2001). Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30:271-306.
- 98 - Wade, R.C., Mazor, M.H., McCammon, J.S. and Quiocho, F.A. (1991). A molecular dynamics study of thermodynamic and structural aspects of the hydration of cavities in proteins. *Biopolymers*, 31:919-931.
- 99 - Fischer, S. and Verma, C.S. (1999). Binding of buried structural water increases the flexibility of proteins, *PNAS*, 96:9613-9615.
- 100 - Camacho, C.J.; Kimura, K.R.; DeLisi, C. and Vajda, S. (2000). Kinetics of Desolvation-Mediated Protein-Protein Binding. *Biophysical Journal*, 78:1094–1105.
- 101 - Camacho, C.J.; Weng, Z.; Vajda, S. and DeLisi, C. (1999). Free Energy Landscapes of Encounter Complexes in Protein-Protein Association. *Biophysical Journal*, 76:1166 - 1178.
- 102 - Parsegian, V.A.; Rand, R.P. and Rau, D.C. (2000). Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives. *PNAS*, 97:3987 - 3992.
- 103 - Colombo, M.F.; Rau, D.C. and Parsegian, V.A. (1992). Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. *Science*, 256:655-659.
- 104 - Colombo, M.F.; Rau, D.C. and Parsegian, V.A. (1994). Reevaluation of Chloride's Regulation of Hemoglobin Oxygen Uptake: The Neglected Contribution of Protein Hydration in Allostery. *PNAS*, 91:10517 - 10520.

- 105 - Reid, C. and Rand, R.P. (1997). Probing protein hydration and conformational states in solution. *Biophysical Journal*, 72:1022 - 1030.
- 106 - Somero, G.N. (1992). Adaptations to high hydrostatic pressure. *Annual Review of Physiology*, 54:557-77.
- 107 - Timasheff, S.N. (1992). A Physicochemical Basis for the Selection of Osmolytes by Nature. *In Water and Life*, Springer-Verlag, Berlin.
- 108 - Yancey, P.H. (1992). Compatible and Counteracting Aspects of Organic Osmolytes in Mammalian Kidney Cells in Vivo and in Vitro. *In Water and Life*, Springer-Verlag, Berlin.
- 109 - Parsegian, V.A.; Rand, R.P. and Rau, D.C. (1995). Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods in Enzymology*, 259:43-94.
- 110 - LiCata, V.J. and Allewell, N.M. (1998). Measuring Hydration Changes of Proteins in Solution: Applications of Osmotic Stress and Structure-Based Calculations. *Methods in Enzymology*, 295:42-62.
- 111 - Martz, E. (2002). Protein Explorer: Easy Yet Powerful Macromolecular Visualization, *Trends in Biochemical Sciences*, 27:107-109. <http://proteinexplorer.org>.
- 112 - Perozzo, R.; Folkers, G. and Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 24:1-52.
- 113 – SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Catálogo de Reagentes Bioquímicos 2004-2005. Página 2034

- 114 - Dias, C.L. and Rogana, E. (1986). Autolysis of beta-trypsin at pH 3.0. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 19:11-18.
- 115 - Bittar, E.R.; Caldeira, F.R.; Santos, A.M.; Gunther, A.R.; Rogana, E. and Santoro, M.M. (2003). Characterization of β -trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36:1621-1627.
- 116 - Martins, N.F.; Ferreira, E.; Torres, K.C. and MM Santoro, M.M. (2003). The denaturation of alpha, beta and psi bovine trypsin at pH 3.0: evidence of intermediates. *Protein and Peptide Letters*, 10:73-81.
- 117 – Erlanger, B.F.; Kokowsky, N. and Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278
- 118 - Keil, B. (1971) Trypsin. *In* The Enzymes III, Hydrolysis: Peptide Bonds (Boyer, P.D., ed.), pp. 250-275. Academic Press, New York and London.
- 119 - Chase Jr, T. and Shaw, E. (1967). p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoate-HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29: 508-514
- 120 – Gomori, G. Preparation of Buffers for use in Enzyme Studies. *In*, Methods in Enzymology. v.1, p138. Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan, Ed. Academic Press, Inc.; Pub. NY., 1955

- 121 – Wiseman, T., Williston, S., Brandt, J.F. and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 179: 131-135.
- 122 - Wyman Jr., J, (1964). Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Advances in Protein Chemistry*, 19: 223-286.
- 123 – Fukada, H. and Takahashi, K. (1998). Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins*, 33: 159–166.
- 124 - Colombo, M.F. and Bonilla-Rodriguez, G.O. (1996). The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/Glycine Solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 271:4895 - 4899.
- 125 - Rogana, E.; Penha-Silva, N. and Mares-Guia, M. (1989). The substituent effect on complex formation between alpha-trypsin and para-substituted benzamidinium ions: a thermodynamic study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 22:1177-1190.
- 126 - Stewart JJ (1990). MOPAC: A semi empirical molecular orbital program. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, 4: 1-105.
- 127 – Goodsell, D.S.; Morris, G.M. and Olson, A.J. (1996). Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition*, 9: 1-5.
- 128 - Sybyl 6.5, Tripos Associates: St. Louis, MO, USA, 1999.

- 129 – Alexandre M. Santos (2003). Informação transmitida durante discussões em seminário do Laboratório. A ocorrência de agregações foi também observada durante cromatografias com elevadas concentrações de sais (Tris-HCl 100 mM mais NaCl 300 mM, pH 8,0).
- 130 - Mares-Guia, M.; Nelson, D.L. and Rogana, E. (1977). Electronic effects in the interaction of para-substituted benzamidines with trypsin: the involvement of the pi-electronic density at the central atom of the substituent in binding. *Journal of the American Chemical Society*, 99: 2331-2336.
- 131 - Gallagher, K. R. and Sharp, K. A. (2003). A New Angle on Heat Capacity Changes in Hydrophobic Solvation. *Journal of the American Chemical Society*, 125:9853-9860.
- 132 - Gallagher, K. and Sharp, K. (1998). Electrostatic Contributions to Heat Capacity Changes of DNA-Ligand Binding. *Biophysical Journal*, 75:769–776.
- 133 - Aoki, K.; Taguchi, H.; Shindo, Y.; Yoshida, M.; Ogasahara, K.; Yutani, K. and Tanaka, N. (1997). Calorimetric Observation of a GroEL-Protein Binding Reaction with Little Contribution of Hydrophobic Interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 272:32158 - 32162
- 134 – Spolar, R.S.; Ha, J.H. and Record Jr, M.T. (1989). Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86: 8382-8385

- 135 - Talhout, R. and Engberts, J.B. (2004). Probing the effect of the amidinium group and the phenyl ring on the thermodynamics of binding of benzamidinium chloride to trypsin. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2:3071-3074.
- 136 – Salvay, A.G.; Grigera, J.R. and Colombo, M.F. (2003). The Role of Hydration on the Mechanism of Allosteric Regulation: In Situ Measurements of the Oxygen-Linked Kinetics of Water Binding to Hemoglobin. *Biophysical Journal*, 84: 564-570.
- 137 - PCMOD for Windows, version 4; Serena Software, Bloomington, IN. USA.
- 138 - Ragone, R. (2001). Hydrogen-bonding classes in proteins and their contribution to the unfolding reaction. *Protein Science*, 10:2075–2082.
- 139 - Oliveira, M.G.A.; Rogana, E.; Rosa, J.C.; Reinhold, B.B.; Andrade, M.H.; Greene, L.J. and Mares-Guia, M. (1993). Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 26893-26903.
- 140 - Sharrow, S.D.; Edmonds, K.A.; Goodman, M.A.; Novotny, M.V. and Stone, M.J. (2005). Thermodynamic consequences of disrupting a water-mediated hydrogen bond network in a protein:pheromone complex. *Protein Science*, 14:249–256.
- 141 – Xu, D.; Tsai, C.J. and Nussinov, R. (1997). Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein Eng.*, 10: 999 – 1012.
- 142 – International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition (1997); online version (second edition (1997), compiled by Alan D. McNaught and Andrew Wilkinson.

ANEXO 1 – EQUAÇÕES DA TERMODINÂMICA

Toda a química, incluindo a química de sistemas biológicos, pode ser interpretada com base nos fatores físicos inter-relacionados: energéticos, estruturais e dinâmicos. Mas os energéticos podem ser considerados os principais uma vez que determinam o comportamento dinâmico e estrutural das biomoléculas, e conseqüentemente a reatividade [Bloomfield, 2002; ref.47].

O objetivo da análise termodinâmica de um sistema biomolecular é medir as alterações nos parâmetros atinentes tais como energia livre, entalpia, entropia e volume, que acontecem durante os processos ocorrendo no seu interior. Embora o sistema seja muito complexo é possível se obter informações preciosas através de considerações relativamente simples, com a aplicação de algumas poucas equações básicas.

Dada a equação genérica, onde M representa uma macromolécula e L um ligante qualquer,



A condição de equilíbrio é estabelecida quando a relação das concentrações dos componentes da preparação se tornam constante. Esta relação é conhecida como constante de equilíbrio K , dada, no exemplo acima, por

$$K = [ML]/([M][L])$$

Dentre as equações utilizadas para descrever, ou melhor analisar o sistema sob um enfoque energético, com base nas leis da termodinâmica, a mais prática e também a mais usada é a relação entre a constante de equilíbrio K e mudanças na energia livre, ou energia de Gibbs, dada por:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \mathbf{A.1}$$

Esta equação, muitas vezes, é mais prática quando considerada na sua forma exponencial.

$$K = \exp^{-(\Delta G / RT)}$$

Uma outra equação muito útil relaciona mudanças na energia livre com variações de entalpia e de entropia, a temperatura e pressão constantes [62] e é derivada da definição da energia livre de Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

A.3

A entalpia (H) é uma grandeza relacionada com a formação, quebra ou distorção de ligações (ligações não covalentes no caso de simples associações inter ou intramoleculares), enquanto a entropia (S) é uma grandeza relacionada com a ordem do sistema, ou melhor, com probabilidades de interações.

Muitas vezes as medições das grandezas termodinâmicas são dificultadas por questões operacionais. Portanto é desejável a obtenção de relações práticas. Uma delas é a capacidade calorífica do sistema a pressão constante, C_p' , definida como $C_p \equiv (dQ_p / dT)$, onde Q_p é o calor envolvido com a vizinhança e dT é a variação de temperatura associada ao processo.

De relações precedentes e da definição de entalpia ($dH \equiv dQ_p'$) [Castellan, 1986], obtem-se:

$$dQ_p' = (\delta H / \delta T)_p dT.$$

A.4

È obtida uma relação entre o calor envolvido com a vizinhança com a variação da temperatura do sistema, a pressão constante. Combinando a equação **A.4** com a de definição de C_p , obtém-se,

$$C_p = (\delta H / \delta T)_p. \quad \text{A.5}$$

Esta é uma equação que relaciona uma derivada parcial com a quantidade mensurável C_p . Ademais, pode ser demonstrado que a diferencial total dH , a pressão constante, resulta em:

$$dH = C_p dT \quad \text{A.6}$$

Para variações finitas de estado, com C_p constante no intervalo de T analisado, medições de ΔH em diferentes temperaturas e com os dados sendo plotados em gráfico de ΔH versus T deve resultar uma reta cuja inclinação fornece diretamente o valor de C_p .

Uma outra forma de expressar as variações na energia de Gibbs, e extremamente útil para as análises bioquímicas, é baseada em uma das quatro equações fundamentais da termodinâmica [62]. Levando em conta variações infinitesimais no número de moles dos componentes do meio reacional, tem-se que:

$$dG = -SdT + Vdp + \sum_i (\mu_i dn_i). \quad \text{A.7}$$

Nesta equação μ_i corresponde ao potencial químico do componente i , e n_i é o número de moles do componente i .

Para sistemas a temperatura e pressão constantes ($SdT = Vdp = 0$), e para variações infinitesimais no número de moles e no potencial químico de um componente, a equação acima pode ser expressa em uma forma mais compacta, conhecida como equação de Gibbs-Duhem.

$$dG = \sum_i (n_i d\mu_i + \mu_i dn_i) \quad \mathbf{A.8}$$

A combinação desta com a equação **A.7**, resulta, para o sistema em equilíbrio ($\Delta G = 0$):

$$\sum_i (n_i d\mu_i) = 0 \quad \mathbf{A.9}$$

Esta relação, para sistemas com dois componentes, por exemplo água a e um soluto s , resulta após rearranjo em:

$$d\mu_s = -(n_a / n_s) d\mu_a \quad \mathbf{A.10}$$

A equação **A.10** indica que as variações nos potenciais químicos dos componentes do sistema são interdependentes e permite que se focalize a atenção sobre as influências direta e indireta do soluto e da água sobre um estado macromolecular. Entretanto, apesar da obtenção de relações matemáticas entre os potenciais químicos e os números de

moles dos componentes do sistema, tem-se uma equação com utilidade prática limitada. Portanto é desejável estender a relação analítica. Em Parsegian e col. [104], é apresentada uma descrição de um estado macromolecular formado por três componentes: uma macromolécula, M ; água, a e um co-soluto s ; com correspondentes análises matemáticas. Um resumo desta análise é apresentado a seguir.

Fazendo a concentração de M suficientemente pequena de modo que moléculas individuais estejam separadas uma das outras eliminam-se as interações eletrostáticas entre elas. Nesta situação M interage apenas com a e com s . Seja N_a e N_s respectivamente o número de moléculas de água e do co-soluto em interação com M . Para as condições experimentais M é considerada como uma membrana semi permeável e a preparação semelhante a uma solução em equilíbrio osmótico em equilíbrio com n_a e n_s moléculas da solução global; a solução que banha o estado macromolecular considerado ($M + N_a + N_s$), tomada como de referência. A partir das eq. **A.7** e **A.9** obtém-se, no equilíbrio,

$$dG = 0 = -SdT + Vdp - \sum_i n_i dn_i . \quad \mathbf{A.11}$$

E, para situações nas quais a temperatura e pressão são mantidas constantes, as vinculações da equação **A.11** ligam as alterações no potencial químico macromolecular, ou energia livre, a alterações nos potenciais químicos da água e do co-soluto. Ou:

$$dG_M = -N_a d\mu_a - N_s d\mu_s, \quad \mathbf{A.12}$$

A solução de referência permanece sujeita aos vínculos estabelecidos pela equação **A.9** (ou **A.10**).

Os vínculos estabelecidos na equação **A.12** são também pouco elucidativos. Entretanto combinando as equações **A.9** e **A.12**, ou seja, estabelecendo-se o vínculo entre dois sistemas comunicantes e fazendo os rearranjos pertinentes para isolamento de N_i , obtemos:

A.13

$$dG_M = -N_a \left\{ 1 - \left[(n_a / n_s) / (N_a / N_s) \right] \right\} d\mu_a = -N_{ea} d\mu_a$$

onde, N_{ea} corresponde ao número de águas excluídas.

Seja por exemplo uma macromolécula que pode passar de uma configuração a para uma configuração b .



O estado de equilíbrio entre as duas formas pode ser descrito em consonância com a equação **A.2**.

$$[b]/[a] = K = \exp^{-(\Delta G_{ab} / RT)}. \quad \text{A.14}$$

Da equação **A.13**, obtemos que

$$d\Delta G_{ab} = -\Delta N_{ea}^{ab} d\mu_a. \quad \text{A.15}$$

Gráficos de $\Delta\Delta G$, ou de uma grandeza equivalente, versus $\Delta\mu_a$, ou grandezas também equivalentes como por exemplo atividade, coeficiente de atividade, pressão parcial, etc., devem fornecer uma reta cuja inclinação dá diretamente o valor de ΔN_{ea}^{ab} , o número de moléculas de água excluídas na transição do estado macromolecular de a para b .

Considere-se ainda uma interpretação de modo muito simples o envolvimento de moléculas de água no processo de associação entre uma enzima E e um ligante L .



Mantidos constantes T, p e a composição da preparação, mudanças no potencial químico da água, a , são dadas por:

$$d\mu_a = d[RT \ln(a_a)], \quad \text{A.16}$$

onde a_a é a atividade do solvente. Associando esta equação com a **A.15** resulta

$$d\Delta G_{EL} = -\Delta N_{ea} \times d\mu_a = -\Delta N_{ea} \times d[RT \ln(a_a)]. \quad \text{A.17}$$

$$-RTd(\ln K) = -\Delta N_{ea} \times RTd(\ln a_a) \quad \text{A.18}$$

$$d \ln K^{EL} = \Delta N_a \times d(\ln a_a) \quad \text{A.19}$$

onde $\Delta N_a = N_a^{EL} - (N_a^E + N_a^L)$. A integração no intervalo entre $a_a = 1$ e a_a fornece a relação seguinte.

$$\left(\ln K_{EL} - \ln K_{EL}^{\circ}\right) = \Delta N_a \times (\ln a_a - \ln 1)$$

$$\ln\left(K_{EL} / K_{EL}^{\circ}\right) = \Delta N_a \times \ln a_a.$$

A.21

O gráfico de $\ln\left(K_{EL} / K_{EL}^{\circ}\right)$ versus $\ln a_a$ deve resultar uma reta cuja inclinação dá o número de moléculas de água associadas ao processo de formação do complexo EL .