

Paulo Henrique da Silva

**Estudos da Interação da Proteína Adaptadora
Grb2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*)
com os Flavonoides Morina e Rutina**

São José do Rio Preto - SP

2017

Paulo Henrique da Silva

**Estudos da Interação da Proteína Adaptadora
Grb2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*)
com os Flavonoides Morina e Rutina**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

São José do Rio Preto, 13 de Abril de 2017.

Silva, Paulo Henrique da.

Estudos da interação da proteína adaptadora Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) com os flavonoides morina e rutina / Paulo Henrique da Silva. -- São José do Rio Preto, 2017
82 f. : il., tabs.

Orientador: Fernando Alves de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Proteínas – Estrutura.
4. Proteína adaptadora GRB2. 5. Receptor tipo 2 de fator de crescimento de fibroblastos. 6. Flavonoides. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Paulo Henrique da Silva

**Estudos da Interação da Proteína Adaptadora
Grb2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*)
com os Flavonoides Morina e Rutina**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fernando Alves de Melo

UNESP – São José do Rio Preto – SP

Orientador

Prof. Dr. Júlio César Borges

USP – São Carlos – SP

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

UNESP – São José do Rio Preto - SP

São José do Rio Preto, 13 de Abril de 2017.

“Tudo que não nos destrói, torna-nos mais fortes”

(Friedrich Nietzsche)

Dedicatória

Aos meus pais Sebastião e Aparecida, minhas irmãs Fernanda e Rosângela, meus cunhados Paulo e Everton, meus sobrinhos Flávia, Raphael, Bárbara e Daniel e a todos os familiares e amigos.

Agradecimentos

Nessa etapa da minha vida, muitas pessoas são indispensáveis e com certeza ao longo dela continuarão sendo. Queria agradecer pela convivência propícia, pessoal e profissional, de cada uma.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Alves de Melo, pela orientação, paciência, amizade e por todos os ensinamentos, sempre preocupado com minha formação e por todo apoio, me inspirando um respeito único.

A Prof. Dra. Fátima Pereira de Souza por sempre acreditar em mim, sendo um exemplo de dedicação e amor pela Ciência. Agradeço também por todas as sugestões no meu Exame de Qualificação, contribuindo muito, para um melhor desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Ícaro Putinhon Caruso, por todos os ensinamentos, discussões e confiança. Agradeço também, por todas as sugestões no meu Exame de Qualificação, melhorando muito meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fossey por todos os ensinamentos e discussões. Em especial a sua maior preocupação, em mostrar que a obtenção de ótimos resultados não é nada sem entendê-los.

Ao Prof. Dr. Vitor Leite, onde pude sob sua supervisão realizar o estágio de docência e confiança em mim depositada, podendo ter um primeiro contato com a sala de aula e aprender muito nesse período.

Ao Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira, pelas discussões sobre o trabalho e pela enorme contribuição do mesmo, com a perspectiva da Física Biológica Computacional.

Aos Profs. Drs. Júlio César Borges e Luis Octávio Regasini, por aceitarem participar da minha banca de avaliação, e por todo debate científico gerado, que enriqueceu a todos presente.

A Karoline Sanches por saber melhor do que ninguém todas as dificuldades e alegrias que vivi. Sua amizade foi um presente que recebi ao trabalhar com você nesse período. Agradeço ainda, toda a leitura crítica desse texto, com sugestões que contribuíram muito.

Ao Raphael Vinícius Rodrigues Dias, por sempre me ouvir, sugerir ideias e desempenhar um trabalho essencial em nosso grupo de pesquisa.

Aos Drs. Fábio Moraes, Thiago Salem e Ricardo Mariutti, pela amizade e por todos os ensinamentos. Em especial, ao Fábio, pela ajuda nos experimentos de STD.

Aos amigos dos laboratórios de Biofísica Molecular e Biologia Molecular, agradeço cada um por toda amizade desenvolvida e por todos os ensinamentos que tive, além das opiniões que contribuíram em muito para a apresentação deste trabalho.

Aos amigos João, Mateus, Érika, Thalita, Adriana Roncalho, Renan, José Bruno, Hugo, Daniel, Paulo Mouro, Josimar, Tiago, Evelyn, Hemily, Giovanna, Denis, Aline, Alessandra, Jéssica, Amanda Dias, Alessandro, Amanda, Gabi, Larissa Adolfo, Larissa Santos, Vitor, Isabella, Carolina Tatiani, Rafaela, Fernanda, Ingrid, Volpe, Marcelo Tozo, Guilherme, Andreia, Joyce, Marcel, Gustavo e Fernando por sempre demonstrarem um carinho inestimável, dando forças em momentos de fraquezas. Em especial a Aline, por ler e revisar meu texto de forma rigorosa, na qual contribuiu para uma melhor leitura do mesmo.

Ao Prof. Dr. Altair, por disponibilizar o uso do espectrofluorímetro tão essencial no desenvolvimento desse trabalho (Processo FAPESP: 2014/17511-0). Da mesma forma agradeço ao Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo pela disponibilidade do AKTA, essencial para obtenção da proteína pura.

Agradeço ainda, os Profs. Drs. Lucas Fugikawa Santos, Sidney Jurado de Carvalho, Jorge Chahine e Jose Ramon Beltran Abrego pela amizade e aos demais professores e colegas do Departamento de Física por todos os ensinamentos. Principalmente aos técnicos Marcelino, Bruno, Barbosa e Paulinho, além da ex-secretária Ilva e da atual Valéria, que hoje considero bons amigos e que me auxiliaram em todos os momentos que precisei.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP pelo financiamento, apoiando o desenvolvimento dessa pesquisa, Processo 2014/17630-0.

Por fim agradeço a Deus, pela linda família que tenho, que mesmo com tanta saudade, me concede forças a seguir com o carinho indispensável de cada um.

Resumo

A proteína adaptadora Grb2 é uma importante reguladora da proteína quinase FGFR2 antes de estímulos extracelulares e é conhecida por formar complexos protéicos responsáveis por ativar a via de sinalização da MAPK, relacionada com a proliferação celular. Quando Grb2 é fosforilada ela se dissocia de FGFR2. Está por sua vez, adquire a capacidade de recrutar proteínas parceiras do citosol para iniciar vias de sinalização importantes para realização do metabolismo celular. A desfosforilação de Grb2 pela fosfatase Shp2 refaz o complexo FGFR2-Grb2 retomando controle sobre FGFR2. Desta maneira, devido a esta versatilidade em executar funções variadas dentro da célula, Grb2 torna-se um alvo importante para testar sua interação com moléculas conhecidas por apresentar propriedades farmacológicas. Sendo assim, as moléculas Morina (2',3,4',5,7-pentahidroxi*flavona*) e Rutina (Quercetina-3-O- α -L-Rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopiranosídeo), foram escolhidas devido a suas propriedades anti-tumorais conhecidas na literatura e pela ausência de estudos em nível molecular que relacionem as propriedades destas moléculas com as proteínas que atuam nesta via de sinalização. Por conseguinte, utilizou-se espectroscopia de fluorescência em estado estacionário e ressonância magnética nuclear, com o objetivo de caracterizar a interação entre Morina e Rutina com Grb2. Através da determinação do perfil termodinâmico de interação destas moléculas com Grb2, obtidos por fluorescência, pudemos inferir um mecanismo entropicamente dirigido, compatível com interações hidrofóbicas para ambas moléculas, com constantes de associação compreendidos entre 10^4 e 10^5 M⁻¹. Corroborando com os resultados, a ressonância magnética nuclear forneceu os epítomos da interação entre estas moléculas com Grb2 e mostrou por experimentos de competição que esta proteína liga-se mais fortemente à Morina que na Rutina. Posteriormente, os epítomos obtidos previamente, foram utilizados como guia para realizar simulações computacionais, como *docking* molecular, que indicaram que ambas moléculas ligam-se preferencialmente ao domínio SH2 de Grb2. Estes resultados contribuem para criação de uma base de conhecimento sobre o mecanismo de interação de moléculas variadas com proteínas, com o intuito em desenvolver fármacos mais eficientes de combate ao câncer.

Palavras-chave: Grb2, FGFR2, Morina, Rutina.

Abstract

Grb2 adaptor protein is an important regulator of FGFR2 before extracellular stimuli and is known to form complexes that activate MAPKinase pathway. When phosphorylated Grb2 dissociates from FGFR2 that gets able to recruit protein partners from the cytosol in order to start important signaling pathways inside cells. Dephosphorylating of Grb2 by Shp2 recue the FGFR2-Grb2 complex resulting in a control upon FGFR2. Because Grb2 shows to be versatile to performing functions inside the cell other than adaptor protein, it becomes an important target to test the interaction with molecules known to have anti-tumor properties. Therefore, the molecules Morin (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone) and Rutin (quercetin-3-O- α -L-Ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside), were chosen because to its anti-inflammatory and anti-tumor properties known in the literature and because the absence of studies at the molecular level that brings up information about the properties of these molecules to specific protein targets. Thus, we have used static fluorescence spectroscopy and nuclear magnetic resonance in order to characterize the interaction between those molecules and Grb2. The thermodynamic profile got from fluorescence assays allow us to infer that the interaction between the molecules with Grb2 is entropically driven, compatible with hydrophobic interactions for both molecules where the equilibrium constants can be found between 10^4 and 10^5 M⁻¹. Furthermore, nuclear magnetic resonance has provided us important information about the epitopes of the protein-ligand interaction, which have been used to do computation simulations to show that both molecules bind in the Grb2-SH2 domain. Competition assays have shown that Morin binds stronger then Rutin to Grb2. These results contribute to create knowledge about the interaction mechanism of these molecules with target proteins. Such characterization would help us to develop more effective drugs to treat cancer.

Key Words: Grb2, FGFR2, Morin, Rutin.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema representativo da via de sinalização de Ras-MAPK.....	4
Figura 2: Representação em <i>Cartoon</i> da proteína Grb2 em dímero com os triptofanos destacados, em duas perspectivas.....	6
Figura 3: Representação em <i>Cartoon</i> do domínio SH2.....	7
Figura 4: Representação em <i>Cartoon</i> do domínio SH3 de Sem-5.....	8
Figura 5: Estado Base do complexo FGFR2-Grb2.....	9
Figura 6: Três Classes de “flavonoides”.....	11
Figura 7: Estrutura geral de um flavonoide.....	12
Figura 8: Flavonoide Morina e sua estrutura química	13
Figura 9: Flavonoide Rutina e sua estrutura química.....	14
Figura 10: Representação dos níveis de energia dos elétrons em uma molécula, em função da coordenada Q que descreve as posições nucleares.....	17
Figura 11: Diagrama de Jablonski.....	19
Figura 12: Esquema básico de um espectrofluorímetro.....	20
Figura 13: Espectro de fluorescência no estado estacionário.....	21
Figura 14: Espectro de absorção e fluorescência de aminoácidos aromáticos em água, pH 7,0.....	22
Figura 15: Mecanismos de supressão dinâmico e estático.....	24
Figura 16: Representação para as duas orientações possíveis para spin 1/2..	28
Figura 17: Variação do NOE homonuclear com o tempo de correlação.....	32
Figura 18: Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a expressão da proteína Grb2 em <i>E.coli</i> BI21 Gold DE3.....	39

Figura 19: Cromatograma da purificação por afinidade da proteína Grb2.....	40
Figura 20: Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a purificação por cromatografia de afinidade.....	41
Figura 21: Cromatograma referente a purificação por cromatografia de gel filtração.....	42
Figura 22: Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a purificação por cromatografia de gel filtração.....	43
Figura 23: Espectro de absorção dos flavonoides Morina e Rutina.....	44
Figura 24: Espectro de absorção da proteína Grb2.....	44
Figura 25: Termograma de desnaturação da proteína Grb2 obtido por calorimetria diferencial de varredura.....	45
Figura 26: Espectro de emissão de fluorescência da proteína Grb2 na presença dos flavonoides na temperatura de 295 K.....	46
Figura 27: Gráfico de Stern-Volmer.....	48
Figura 28: Gráfico duplo-log.....	49
Figura 29: Gráfico de van't Hoff.....	51
Figura 30: Perfil termodinâmico dos complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina, em temperaturas de 291K, 295K e 299K.....	52
Figura 31: Espectro de STD do complexo Grb2-Morina.....	54
Figura 32: Espectro de STD do complexo Grb2-Rutina.....	55
Figura 33: Epítomos de interação do complexo Grb2-Morina.....	57
Figura 34: Epítomos de interação do complexo Grb2-Rutina.....	59
Figura 35: Espectro do experimento de competição dos flavonoides por Grb2	60
Figura 36: Gráfico de linhas.....	63

Figura 37: <i>Docking</i> Molecular entre Grb2 com Morina e Rutina	65
Figura 38: LigPlot dos complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina	67
Figura 39: Representação da sobreposição de Morina e Rutina, em <i>surface</i> ...	68

Lista de Tabelas

Tabela 1: Constantes de supressão K_{sv}.....	48
Tabela 2: Número de sítios de ligação (n) e constante de associação (K_a).....	50
Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos.....	51
Tabela 4: Determinação dos epítomos de interação do complexo Grb2-Morina.....	56
Tabela 5: Determinação dos epítomos de interação do complexo Grb2-Rutina.....	58
Tabela 6: Transferência de magnetização dos hidrogênios dos flavonoides do espectro individual para o espectro de competição.....	61
Tabela 7: Diferença percentual dos epítomos.....	62

Lista de Abreviações

DSC - *Differential scanning calorimetry*

FGFR2- *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*

Gab - *Grb2-associated binding*

Grb2 – *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*

GTP - *Guanosina trifosfato*

MAPK – *Mitogen-activated Protein Kinase*

NF1 – *Neurofibromin*

NF-κB – *fator nuclear kappa β*

NOE – *Efeito Nuclear Overhauser*

Pi – *Fosfato inorgânico*

ppm – *parte por milhão*

PTK – *Proteína Tirosina Quinase*

Ras – *Rat Sarcoma*

RMN – *Ressonância Magnética Nuclear*

RTK – *Receptor Tirosina Quinase*

SHC - *SH2 containing protein*

SH2 – *Src Homology 2*

SH3 – *Src Homology 3*

Sos - *Pro-rich domain of the GTP-GDP exchange factor*

Shp2 - *Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2*

Ser – *Serina*

STD – *Saturation Transfer Difference*

TNF- α – Fator de necrose tumoral

Thr - Treonina

Tyr - Tirosina

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

ϵ - Coeficiente de Extinção Molar

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Sinalização Celular.....	1
1.2 Proteína Grb2 e sua função biológica.....	6
1.3 Flavonoides.....	11
1.4 Espectroscopia de Biomoléculas.....	15
1.4.1 Princípios Básicos da Fluorescência no estudo de Proteínas.....	16
1.4.2 Ressonância Magnética Nuclear.....	27
1.4.2.1 Teoria Básica de Ressonância Magnética Nuclear.....	27
1.4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Proteínas em Solução.....	29
1.4.2.3 Interação entre Proteínas e Ligantes por STD.....	30
2. Objetivos.....	35
3. Materiais e Métodos.....	36
3.1 Expressão e Purificação da Proteína Grb2.....	36
3.2 Preparo dos Ligantes.....	36
3.3 Determinação da Concentração de Grb2.....	37
3.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	37
3.5 Fluorescência em Estado Estacionário.....	37
3.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	38
4. Resultados e Discussão.....	39
4.1 Expressão e Purificação da Proteína Grb2.....	39
4.2 Espectroscopia de UV-Vis.....	43
4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	45
4.4 Fluorescência em Estado Estacionário entre Grb2-Morina e Grb2- Rutina.....	46
4.5 Ressonância Magnética Nuclear de Grb2 com Flavonoides.....	53
4.6 Estudos computacionais de interação entre Grb2 e os flavonoides Morina e Rutina.....	64
5. Conclusões e Trabalhos Futuros.....	69
6. Referências Bibliográficas.....	72

1- INTRODUÇÃO

1.1 Sinalização Celular

As células respondem a estímulos extracelulares que são essenciais para a vida, sendo os receptores de membrana responsáveis pelo monitoramento de eventos do meio extracelular em relação a alguns fatores como o pH, luz, oxigênio, temperatura, pressão osmótica, entre outros fatores, promovendo, assim, uma resposta específica. Em animais, esses sinais são chamados autócrinos, ou seja, que atuam na mesma célula que o produz. Além deles existem os parácrinos, que agem em uma célula adjacente, e os endócrinos, que são transportados pela corrente sanguínea até uma célula-alvo distante. Em qualquer um dos casos, o sinal é detectado por um receptor específico e convertido em uma resposta celular [1-3].

Dessa forma, a atividade desempenhada pelas células é mediada pela sinalização, que é regulada por atividades enzimáticas dependentes da fosforilação reversível das cadeias laterais dos aminoácidos. Proteínas com capacidade de catalisar reações químicas são conhecidas como enzimas e são formadas por uma sequência de aminoácidos em que a interação entre as cadeias laterais determina sua forma e sua função [4].

Para essas reações, são exigidas grandes quantidades de energia nos processos metabólicos e a parte significativa da energia livre se obtém pela oxidação de nutrientes e substratos disponíveis durante o catabolismo. Essa energia é conservada e transferida por meio de reações acopladas à produção de ADP (Adenosina difosfato) e fosfato inorgânico - Pi (reação de fosforilação do ADP), a partir de ATP (adenosina trifosfato), tornando-se, assim, sistemas de transmissão de energia e vínculos entre as reações produtoras e reações consumidoras de energia. O ATP e ADP são reagentes obrigatórios em quase todas as reações enzimáticas de transferência de grupos fosfato. O ADP serve como intermediário receptor do grupo fosfato originário de compostos fosfatados de alta energia, e o ATP, como doador do grupo fosfato para compostos de baixa energia [5].

As enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através de um grupo fosfato de ATP ou, em raros casos, GTP (Guanosina trifosfato), para resíduos de Serina (Ser), Tirosina (Tyr) ou Treonina (Thr), são conhecidas como Proteínas

Tirosina Quinase (PTK). O processo de fosforilação ocorre nesses aminoácidos, já que eles possuem o radical OH em suas cadeias laterais, levando o radical hidroxila a condições ideais para a reação de hidrólise do ATP para liberar o fosfato presente. A adição ou a remoção de grupos fosfatos é um mecanismo essencial na regulação de proteínas intracelulares, as quais podem ser enzimas, mensageiros secundários ou ainda receptores. Receptores mediam uma vasta quantidade de respostas celulares, e vias metabólicas e podem ser ativadas pelas quinases e desativadas pelas fosfatases, em que a primeira adiciona grupo fosfato ao grupo hidroxila de um resíduo de Ser, Tyr e/ou Thr e a segunda retira grupos fosfatos, atuando concomitantemente com quinases de modo que ativa e desativa várias proteínas dentro da célula. A adição de grupos fosfato é catalisada, onde essa reação é unidirecional e o ATP é quebrado para suprir as necessidades energéticas básicas da célula. Proteínas que são fosforiladas podem passar rapidamente de um estado ativado para o outro inativo, funcional em resposta a um estímulo externo [1-3;6].

Em 1959, Edwin Krebs e Edmond Fisher fizeram o primeiro relato sobre às proteínas quinases. Muitas pesquisas [5,7] têm sido feitas desde que elas começaram a ser descobertas, estima-se que o genoma humano tenha em torno de duas mil quinases [4]. Cânceres, como o de próstata, ovário e doenças, como de Hodgkin e asma, são associadas as proteínas quinases. O câncer é uma doença comum no mundo e sua incidência tem aumentado de forma significativa nas últimas décadas em decorrência da mudança de hábitos da população, da má alimentação e do crescimento populacional, o que se torna um problema de saúde pública, o qual se agrava ao longo dos anos [8]. Em função do seu papel essencial no processo de proliferação celular, metabolismo do glicogênio, apoptose, neurotransmissão, oncogênese, desregulação ou superexpressão de receptores em geral, elas são motivos de muitos estudos e muitas pesquisas [9-10].

Algumas proteínas quinases são proteínas receptoras (RTKs), do inglês *Receptor Tyrosine Kinase*, como, por exemplo, FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*). Estas exercem um papel fundamental na regulação do metabolismo celular, na expressão gênica, no crescimento, divisão e diferenciação celular, na qual muitas cascatas de transdução de sinais são transmitidas da membrana celular para o núcleo [3,11].

Desses grupos de RTKs, encontra-se a família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), que consiste em, pelo menos, dez diferentes fatores de

crescimento que controlam os processos celulares [12] como o crescimento e diferenciações celulares [11]. As respostas biológicas por FGF induzem ligação e ativação de uma família de receptores de superfície celular com a atividade intrínseca da proteína tirosina quinase, denominados receptores de FGF [13]. Essas respostas biológicas são mediadas por quatro diferentes receptores tirosina quinase (FGFR), dentro dessa família será destacada a proteína FGFR2 [13-14], uma vez que esta está associada a displasias humanas e diversos tipos de câncer. A dimerização de receptores de FGF, é essencial para a ativação da quinase, que resulta num aumento da regulação da sua atividade quinase e numa subsequente autofosforilação de resíduos de Tyr, em sua região C-terminal. Por isso, FGFR2 fornece sítios de ligação para o recrutamento de proteínas do citosol e formar complexos de sinalização primários e a ativação de vias de sinalização como a da MAPK [15-16]. Isso requer a ação de FGF em conjunto com os proteoglicanos de sulfato de heparano solúvel ou de superfície celular (HSPG), já domínios de quinase FGFR2 na ausência da proteína adaptadora Grb2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*), que é uma reguladora de FGFR2 (como será explicado ao longo do texto), são capazes de se tornarem ativos acessando resíduos de tirosina que estão colocados na interface do receptor de Grb2 por trans-fosforilação [13-14,17]. O receptor tirosina-quinase, tem especificidade em fosforilar tirosina (Tyr), ao invés de treonina (Thr) ou ainda serina (Ser), pois a cadeia lateral da tirosina é longa, de tal forma que alcança o sítio ativo [1].

A proteína FGFR2 tem em sua composição uma região extracelular, dois ou três domínios do tipo imunoglobina, uma região transmembrana, uma região intracelular, que consiste em um domínio citoplasmático de tirosina quinase e uma sequência polipeptídica complementar de 58 aminoácidos e um único segmento de membrana hidrofóbica [15,18]. O receptor enzimático é uma proteína que fosforila resíduos de Tirosina (Tyr) em proteínas-alvo específicas. Na sinalização celular, um dos mecanismos é a interação entre proteínas que são responsáveis em transmitir a informação dos receptores da membrana plasmática até o núcleo celular, onde ocorre o processamento da informação. As proteínas de células eucarióticas que respondem à fosforilação de resíduos de Tyr, contêm um ou mais domínios que mediam a interação entre essas proteínas através do reconhecimento de uma sequência polipeptídica específica localizada nas proteínas parceiras da interação, como Grb2, Sos, Ras, etc. [19].

Uma dessas proteínas parceiras é a proteína conhecida como Grb2, a qual é constituída por um domínio SH2 flanqueado por dois domínios SH3. Trata-se da proteína, em questão desse estudo, a qual será mais detalhada ao longo do texto. Na Figura 1, tem-se representada a via de sinalização RAS-MAPK, onde se mostra, de forma geral, que sinais hormonais levam à fosforilação de proteínas alvo por PTK (FGFR2).

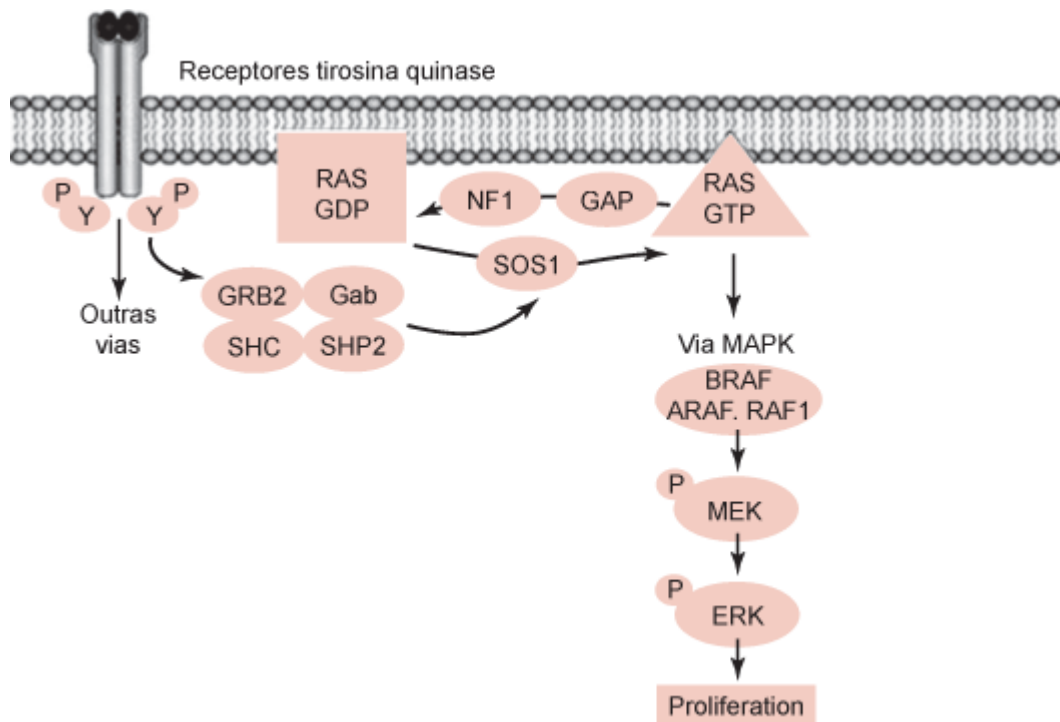


Figura 1: Esquema representativo da via de sinalização de Ras-MAPK. O primeiro passo ocorre com a ativação de uma proteína transmembrana, FGFR2, o receptor do fator de crescimento, este por sua vez ativa a proteína RAS através da molécula adaptadora Grb2 que recruta um fator de troca do nucleotídeo guanina (Sos) e este faz a catálise, induzindo RAS a trocar seu GDP por um GTP. O processo é seguido por uma estimulação sequencial de proteínas quinases citoplasmáticas, como a Raf (uma quinase específica para Ser/Thr), a MEK e as ERK. As ERK, migram então para o núcleo celular, onde fosforilam um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, iniciando, deste modo, a proliferação celular. Figura adaptada de Schubbert et al [20].

Na Figura 1, os fatores de crescimento se ligam a receptores localizados na superfície celular (HSPGs) os quais, por consequência, ativam a FGFR2 que media a sinalização e fazem o recrutamento de proteínas adaptadoras como Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), SHC (*SH2 containing protein*) e Gab (*Grb2-associated binding*). Essas proteínas fazem o recrutamento de Shp2 (*Src-homology 2 domain containing phosphatase 2*) e Sos (*Pro-rich domain of the GTP-GDP exchange factor*) [21]. Esta última, quando ligada a Grb2, atua na catálise de substituição do GDP (Guanosina difosfato) ligado em Ras (*Rat Sarcoma*), por GTP

[21-22]. Em seguida, há o complexo formado por GAP (*GTPase-activating protein*) e NF1 (*neurofibromin*) que se ligam a Ras-GTP, acelerando sua conversão para Ras-GDP, onde esta finaliza a sinalização com a consequente ativação da via de sinalização de MAPK. Raf1, MEK e ERK que são proteínas presentes nesta via, são ativadas pela fosforilação numa reação em cascata que tem por resultado a ERK migrando para dentro do núcleo celular [20]. A ERK fosforila um conjunto de moléculas responsáveis pela transcrição, iniciando a proliferação celular.

Alterações nesse processo de sinalização acometem uma variedade de displasias humanas como o câncer e a má-formação fetal, bem como no desenvolvimento esquelético, devido à transdução de sinal aberrante [23]. Mutações na região C-terminal, que ocorrem em sequências conservadas de FGFR2, foram identificadas em material genético de pacientes que possuíam síndromes, tais como de Crouzon (foram relatadas 39 diferentes mutações, por exemplo, Cys278Phe, Cys342Tyr, Ser347Cys) [18] e Pfeiffer (36 mutações relatadas) [19], além de ter sido relacionado com o desenvolvimento de melanoma (quatro mutações: Glu475Lys, Asp530Arg, Ile642Val, Ala648Thr) e a expressão em excesso em células gástricas cancerosas (mutação Ser267Pro) [12]. Muitas das displasias humanas como craniossinostose (mutação Lys659Glu), câncer de mama (mutações Arg203Cys, Asn550Lys, Ser588Cys e Lys660Asn), câncer de próstata (mutação Gly388Arg), câncer de bexiga (mutação Met186Thr), câncer de cólon (mutações Arg203His, Arg210Gln, Asp334Asn), câncer de pulmão (Glu116Lys e Pro253Leu) e ovário (mutação Gly272Val) se associam à atividade enzimática aberrante dessas proteínas [24-26]. Logo, FGFR2 precisa de um mecanismo minucioso de controle de sua atividade, para não haver transdução de sinais aberrantes. Nesse contexto, Grb2 além de ser uma proteína adaptadora, exerce um papel fundamental de reguladora de processos de sinalização celular envolvendo FGFR2, impedindo que esta tenha ativação total até a exposição a fatores de crescimento [27]. A proteína Grb2 é o objeto principal deste estudo e, a seguir, essa proteína será descrita quanto a sua função biológica dentro da célula.

1.2 Proteína Grb2 e sua função biológica

A proteína Grb2 é uma proteína adaptadora, envolvida na transdução/sinalização celular [28-29]. Ela possui 217 resíduos de aminoácidos compreendendo um domínio SH2 entre dois domínios SH3, um C-terminal e um outro N-terminal [28,30-31]. Sua massa molar é de 25,2 kDa [28, 32-33], possuindo um ponto isoelétrico teórico (pI) de 5,89, além de possuir 5 triptofanos (Trp) essenciais para serem utilizados como sondas em espectroscopia de fluorescência. Dois desses triptofanos estão localizados no domínio SH2 (Trp60 e Trp121), dois no domínio C-SH3 (Trp193 e Trp194) e um no domínio N-SH3 (Trp36) [34]. Seu coeficiente de Extinção Molar no comprimento de onda de 280 nm é de $38055 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Além disso, ela foi cristalizada como um dímero, que pode ser observado em solução, em altas concentrações de Grb2 ($>10 \text{ mg/ml}$) [35]. A Figura 2, na qual está representada, em duas perspectivas, a proteína Grb2 em dímero, mostra a visualização do domínio SH2 entre os dois domínios SH3, de forma frontal (A) e depois rotacionada 90° (B), com os triptofanos destacados.

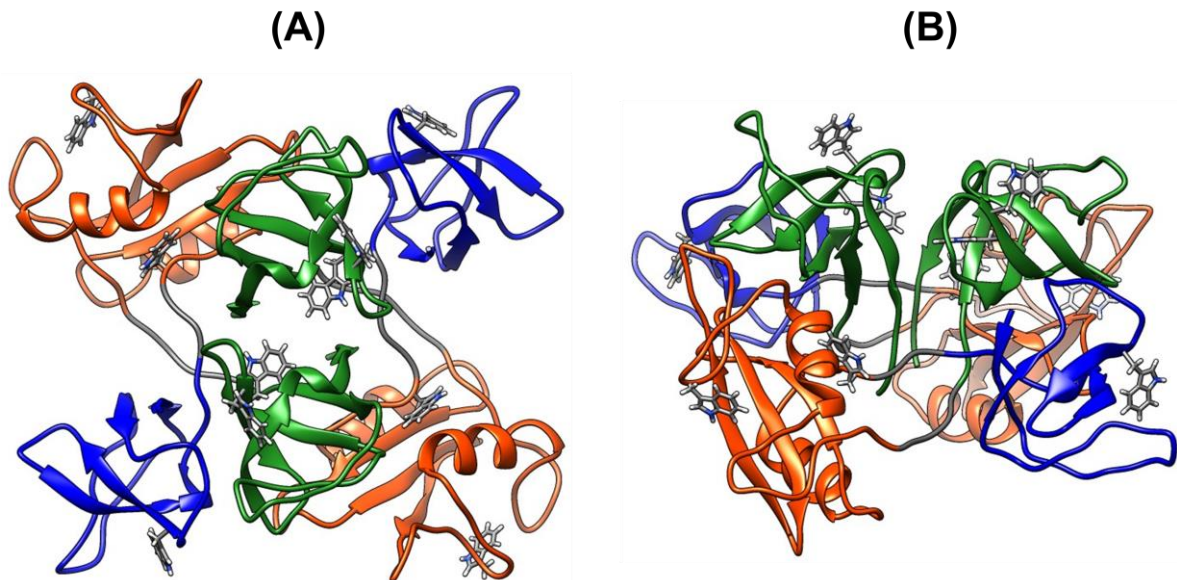


Figura 2: Representação em *Cartoon* da proteína Grb2 em dímero com os triptofanos destacados, em duas perspectivas. Representação em *Cartoon* da estrutura da proteína Grb2, em duas perspectivas A (vista frontal) e B (vista A rotacionada 90°), com os triptofanos destacados em cinza. A figura foi obtida utilizando o programa Chimera, com o código 1GRI.pdb, da proteína Grb2 em dímero. Em verde tem-se representado o domínio C-SH3, em azul o domínio N-SH3 e em laranja o domínio SH2 entre os dois domínios SH3. Figura cedida pelo aluno de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, Raphael Vinicius Rodrigues Dias, que faz parte do grupo de pesquisa.

Dos domínios que compõem a Grb2, como visto na Figura 2, foi identificado primeiramente o domínio SH2 (*Src homology-2*), nomeado dessa maneira por ser uma região conservada em também famílias de PTKs e diferente do domínio catalítico (*Src homology-1*) na família de tirosinas quinase [36]. As quinases também são reguladas pela fosforilação de resíduos de tirosina (Tyr) e o domínio SH2 reconhece estes resíduos fosforilados em uma curta sequência específica de peptídeos [19,36-37].

O domínio SH2 é composto por uma estrutura composta da ordem de 100 resíduos que se enovelam em uma folha- β antiparalela constituída por cinco fitas [38-39]. A folha- β do centro divide o domínio em dois sítios com funções diferentes, onde um desses sítios, paralelo a uma hélice- α (α B), se liga à fosfotirosina, já o outro lado que está paralelo à hélice- α (α A) e os loops formados, fornece resíduos que interagem com as cadeias laterais de proteínas que se encontram na região C-terminal das fosfotirosina (Figura 3) [19].

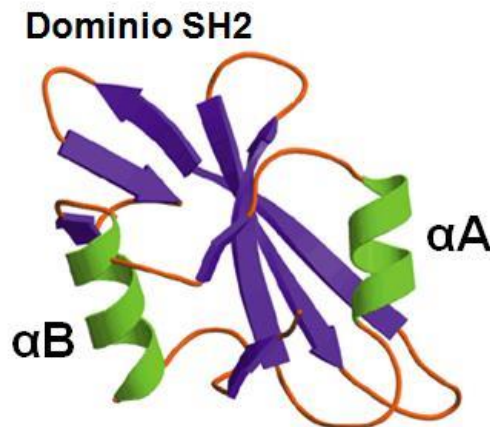


Figura 3: Representação em Cartoon do domínio SH2. Em roxo tem-se representada as folhas- β , onde a antiparalela é constituída por cinco fitas e a do centro reparte o domínio em dois sítios com funções diferentes. Em verde as alfa-hélices, em que α A tem loops formados que fornecem resíduos que interagem com as cadeias laterais de proteínas que se encontram na região C-terminal de fosfotirosinas e α B que se liga a fosfotirosina. Este domínio consiste, em duas folhas- β principais, que estão flanqueadas por alfa-hélices. Sua principal função é reconhecer resíduos de fosfotirosinas. Adaptada de Yaffe et al, 2002 [40].

A Grb2 possui também o domínio SH3 (*Src homology-3*), cuja função desse domínio não está bem esclarecida. Entretanto, alguns estudos envolvendo proteínas pequenas e adaptadoras apontam que esse domínio pode se ligar a outras proteínas dentro da célula através da interação com os domínios SH2 e SH3 [41]. Em média, os domínios SH3 possuem 60 resíduos de aminoácidos que se ligam a sequências que contêm resíduos de prolina ordenados em característicos motivos

PxxP, no qual o duplo x, significa dois outros resíduos quaisquer naquele motivo (Figura 4) [41,24, 35, 38-39, 42-43].



Figura 4: Representação em Cartoon do domínio SH3 de Sem-5. Em média, os domínios SH3 possuem 60 resíduos de aminoácidos que se ligam a sequências que contém resíduos de prolina ordenados em característicos motivos PxxP. Retirada de J.C. Ferreón et al [44].

Essas pequenas adaptadoras SH não possuem atividade de catálise que seja própria e servem para acoplar proteínas que têm fosfotirosina (pTyr), tais como a tirosina quinase, a outras proteínas que não tem seus próprios domínios SH2 e SH3 [45]. Estudos na literatura mostram que, através de seus domínios SH2 e SH3, a proteína Grb2 pode interagir com uma variedade de outras proteínas, como, por exemplo, o receptor do fator de crescimento epidérmico e os receptores do fator do crescimento derivado de plaquetas, por meio do seu domínio SH2. Atuando assim em várias vias de sinalização mediadas por PTKs. Como um ativador central do controle do ciclo celular e das vias de motilidade a jusante de vários receptores do fator de crescimento, a Grb2 está envolvida na sinalização oncogênica numa grande variedade de tumores humanos. Por exemplo, a Grb2 interage diretamente com Sos-1 e a porção Bcr da proteína de fusão Bcr-Abl, uma oncoproteína de tirosina quinase que tem sido implicada na patogênese de leucemias positivas para cromossomos Filadélfia [24,35;46].

O domínio N-SH3 da Grb2 é o principal responsável pela sinalização através da Sos, onde este apresenta dez vezes mais afinidade que o C-SH3 da Grb2 [47]. Já o domínio C-SH3 se liga às proteínas de ancoragem Gab1/Gab2,

facilitando seu recrutamento para FGFR2, onde desempenha importante função [48]. A Grb2 exerce de forma crucial o controle da atividade da FGFR2, para que não ocorra transdução de sinais aberrantes, gerando uma proliferação de células cancerígenas. Esse mecanismo de controle é ilustrado na Figura 5.

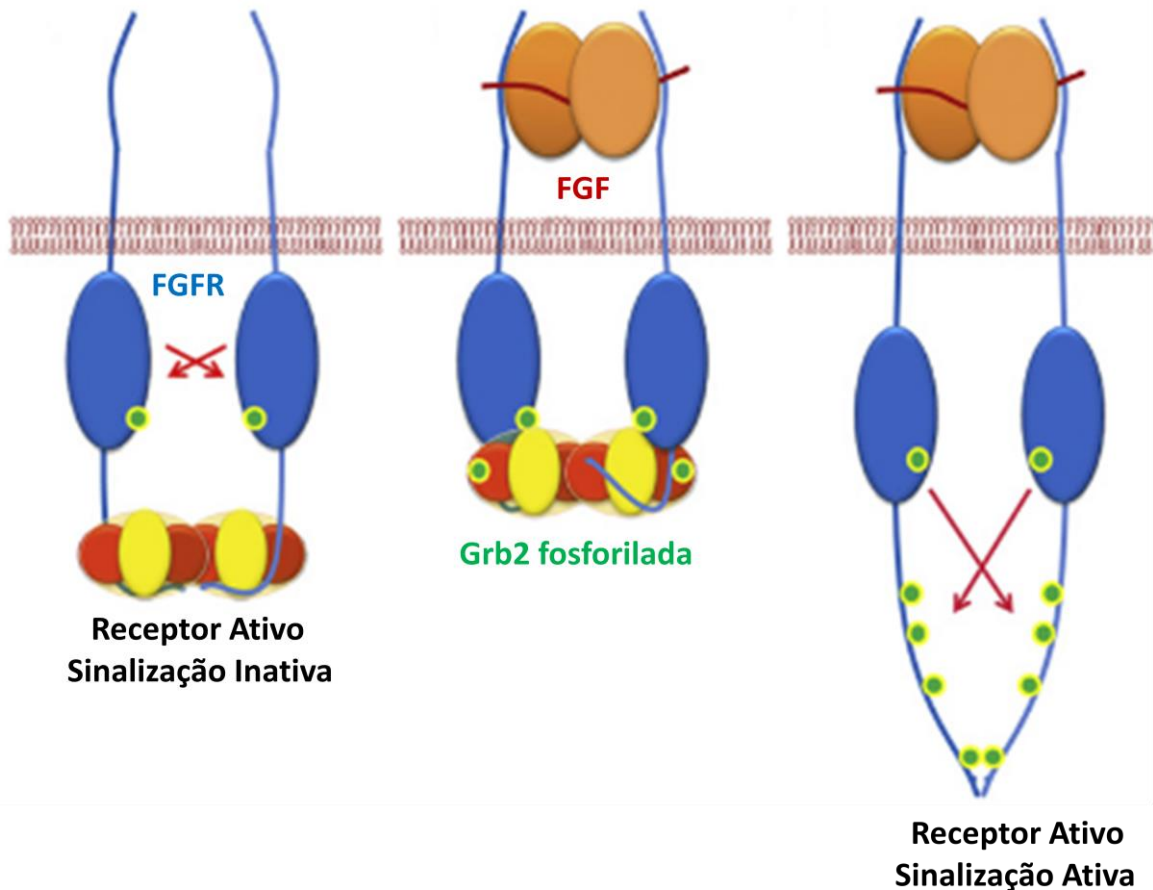


Figura 5: Estado Base do complexo FGFR2-Grb2. Grb2 dimérica com os domínios SH3 em vermelho e o domínio SH2 em amarelo é ligada por meio de seu domínio C-SH3 a região C-terminal do receptor em azul, resultando em um heterotetrâmero 2:2. O domínio quinase de FGFR2 (azul ovais) tem mudança conformacional suficiente para permitir a fosforilação do subconjunto de resíduos de receptor tirosina, incluindo-se Y653 e Y654. FGF extracelular em laranja e HSPG em linha vermelha ligada a FGFR2. Os resultados das alterações conformacionais resulta em Grb2 tornar-se fosforilada pelo domínio quinase FGFR2. Grb2 uma vez fosforilada não pode se ligar ao receptor, devido a repulsão eletrostática. Domínios de quinase FGFR2, estão ativos, porém inoperantes, e na ausência de Grb2, são capazes de se tornarem ativos, acedendo a resíduos de tirosina que estão colocados na interface do receptor de Grb2 por transfosforilação. Adaptada de Chi ChuanLin et al [27].

Na Figura 5, FGFR2, em seus últimos 15 aminoácidos se liga com Grb2 dimérica através do seu domínio C-SH3, causando o recrutamento de uma segunda molécula de FGFR2. Com isso, há uma formação de um heterotetrâmero,

favorecendo a transfosforilação de resíduos de Tirosina ao longo da cadeia de 58 aminoácidos da região C-terminal de FGFR2 [49,27]. Quando um fator de crescimento se liga, ele induz mudanças conformacionais onde Grb2 é fosforilada e se dissocia de FGFR2, o que anula a interação entre as duas proteínas, devido a repulsão eletrostática. FGFR2, por sua vez, passa a recrutar proteínas do citosol, dando início a complexos de sinalização primários. Até que uma fosfatase, conhecida como Shp2 desfosforile Grb2, retome o complexo Grb2-FGFR2, que é inibitório para FGFR2 [27].

É um processo complexo relacionar a transdução de sinais e a fosforilação, já que a fosforilação de FGFR2 foi observada abundantemente em várias linhagens de células antes mesmo de estímulos extracelulares [45,50]. Entretanto, em nível basal de FGFR2, esse nível de fosforilação não é capaz de ativar uma via de sinalização até que haja, de fato, estímulos por fatores de crescimento. Dessa forma, vale destacar que a FGFR2 está em um estado fosforilado não sinalizante, o que torna esse mecanismo regulado por Grb2 importante, para não haver transdução de sinais aberrantes [23].

Foi demonstrado um mecanismo dinâmico que faz Grb2 controlar a sinalização celular mediada pela FGFR2, regulando, de uma só vez, a atividade fosfatase e quinase, provenientes de Shp2 e FGFR2, respectivamente, mesmo na falta de estímulo extracelular. As atividades de FGFR2 e Shp2 são inibidas pela ligação da Grb2 a FGFR2 [23]. Por isso Grb2 é a controladora geral destas reações mutuamente dependentes, onde na sua forma dimérica ela exerceria uma função inibitória, enquanto que na forma monomérica ela promoveria a sinalização proliferativa [50].

Este complexo conjunto de interações entre as proteínas FGFR2-Grb2-Shp2 estão acompanhados de mudanças conformacionais que ainda hoje não estão bem entendidas, mas sabe-se que estão relacionadas com a sinalização aberrante [23]. Nesse contexto, além de a Grb2 ser uma adaptadora ela é uma reguladora de processos envolvendo FGFR2, e buscar compreender o mecanismo de interação entre elas, a torna um alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos, com base na estabilização na sua formação de dímeros, inibindo processos de sinalização celular descontrolada, que levam ao desenvolvimento tumoral [23,51].

1.3 Flavonoides

Ao longo dos últimos anos, existe um crescente interesse em compostos fitoquímicos com potencial anticarcinogênico e baixa toxicidade [52]. Flavonoides são um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis que está presente naturalmente em plantas e que apresenta baixa massa molar [53]. Os flavonoides têm sido investigados nas últimas décadas devido aos seus benefícios à saúde humana, já que possuem atividade anticarcinogênica, antioxidante, anti-inflamatória e antiviral [54]. Diversos estudos mostram a ação anticarcinogênica dos flavonoides como inibidores, uma vez que eles controlam a proliferação celular e bloqueiam a ligação de enzimas do metabolismo carcinogênico [55-57]. Eles ocorrem de forma livre, conhecida também como aglicona ou ligados a açúcares, conhecidos como glicosídeos [56].

Conforme a posição de ligação do anel aromático à subunidade benzopirano, os “flavonoides” podem ser distribuídos em três grupos: os flavonoides (2-fenil-benzopiranos), isoflavonoides (3-benzopiranos) e neoflavonoides (4-benzopiranos). Flavonoides e isoflavonoides ocorrem comumente com ésteres, éteres ou derivados glicosídicos ou ainda uma mistura deles [58]. Essas três classes estão representadas a seguir, na Figura 6 [59].

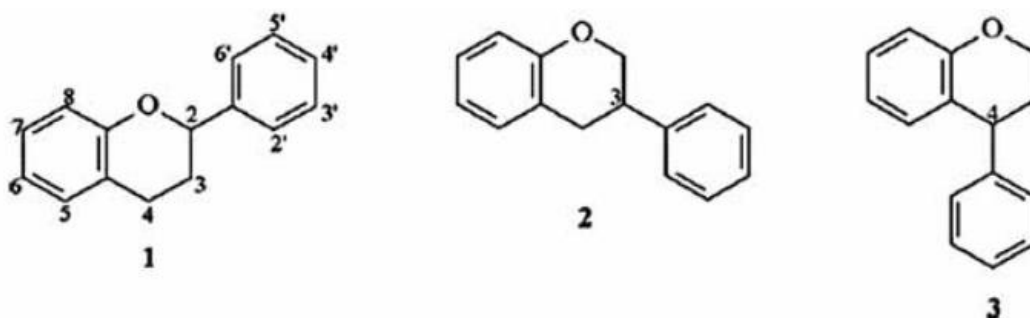


Figura 6: Três Classes de flavonoides. Representação de: os flavonoides (1), os isoflavonoides (2) e os neoflavonoides (3) com sua estrutura molecular básica. Os flavonoides tem seu anel B ligado ao carbono 2 do anel pirona C, os isoflavonoides tem o anel B ligado ao carbono 3 do anel pirona C e os neoflavonoides tem o anel B ligado ao carbono 4 do anel pirona. Retirada de Grotewold, 2006 [59].

Os flavonoides têm como composição básica uma estrutura de difenilpropano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos (A e B) e um anel pirona (C) ligado entre eles. O nível de saturação e/ou oxidação que ocorre no anel heterocíclico C difere os diferentes grupos de flavonoides existentes. Dentro desses grupos, compostos individuais se diferenciam pelo padrão de substituição nos anéis A e B,

por metoxilas, hidroxilas (OH), glicosilações e acilações [59-60]. Na Figura 7, tem-se representada a composição básica dos flavonoides.

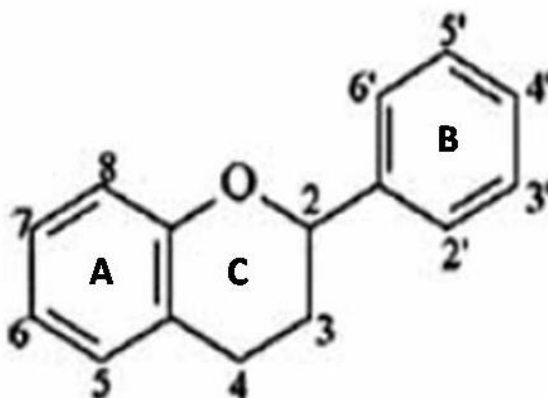


Figura 7: Estrutura geral de um flavonoide. Os anéis A e B são anéis benzênicos e o anel pirona C. Os vários grupos de flavonoides diferem quanto ao nível de oxidação e/ou saturação presente no anel heterocíclico C. Desses grupos temos a catequina, flavonona, flavona, flavonol, diidroflavonol e os flavanóis (flavan-3-ol, flavan-4-ol e flavan-3,4-ol). Mudanças nos números dos anéis A e B como metilação, acilação e glicosilação geram a diferenciação de compostos individuais dentro de uma classe. Adaptada de Grotewold, 2006 [59].

Devido à tendência intrínseca dos núcleos fenólicos em desenvolverem interações moleculares, não é surpresa que um dos grandes alvos da comunidade científica seja o estudo da interação dos flavonoides com as proteínas, uma vez que esses compostos polifenólicos têm propriedades antioxidantes que protegem contra o câncer, verificando a regressão do câncer em cultura de células [58,61-63]. Essas células apresentam alguns estágios, nos quais se destacam a desaceleração e o estacionamento [64], eventos esses, que esse estudo futuramente tentará e procurará descrever em nível molecular. Dentre muitos dos flavonoides que existem na natureza, buscamos estudar a interação de dois específicos, Morina e Rutina, com a proteína Grb2, devido à importância dessa proteína na via da FGFR2. Alguns estudos mostram a interação dessas moléculas com proteínas [53;65-67] *in vitro*. Em adição, os dois flavonoides possuem atividade anticarcinogênica [68-71] em células relacionadas a essa via de sinalização, o que os torna agentes interessantes no bloqueio de células cancerígenas devido à atividade aberrante de FGFR2, o que torna esse estudo de interação Grb2-flavonoides algo inédito e importante como base para trabalhos futuros.

A Morina (2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona) é um flavonol, subgrupo dos flavonoides, isolado a partir de várias espécies vegetais, como, por exemplo, agrião,

laranja de osage (mesma família das amoras), folhas de goiabeira, folhas de oliveira [68,72], possuindo uma massa molar de 302,24 g/mol com coeficiente de extinção molar determinado em 271 nm de $16949 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. A estrutura química da Morina está ilustrada na Figura 8.

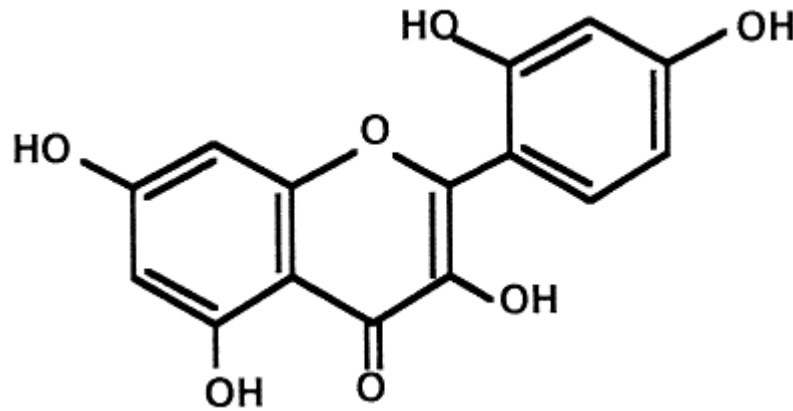


Figura 8: Flavonoide Morina e sua estrutura química. O flavonoide Morina (2',3,4',5,7-pentahidroxi-flavona) apresenta hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel benzênico A, nas posições 6' e 4' do anel benzênico B e na posição 3 do anel pirona. Retirada de Kawabata et al, 1999 [73].

A Morina apresenta hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel benzênico A e nas posições 2' e 4' do anel benzênico B, além de uma hidroxila na posição 3 do anel pirona, de acordo com a composição básica de um flavonol da Figura 6.

Estudos apontam que o flavonoide Morina, inibe a proliferação celular em diversos tipos de células carcinogênicas, inibindo o ciclo celular em tumores como carcinoma oral e em hepatócitos humanos [74-75]. A Morina induz morte celular por apoptose em linhagens de células de câncer de pulmão do tipo não pequenas (H460), dependendo da concentração e período de tempo, alterando a função mitocondrial [68], câncer esse associado à atividade aberrante na via de sinalização estudada [76]. Estima-se que 80 a 85% dos cânceres de pulmão são do tipo dessas células não pequenas. É mostrado ainda que, Morina possui baixa toxicidade para o organismo, tornando-a um agente em potencial de desenvolvimento de fármacos [77-78], porém mais testes devem ser realizados com o objetivo de elucidar as vias de indução por apoptose promovida pela Morina nessa linhagem neoplásica [68].

O flavonoide Rutina (Quercetina-3-O- α -L-Rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopiranosídeo) é um flavonol glicosilado, Quercetina e o dissacarídeo Rutinose (α -L-Rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glucopiranosídeo), conforme esquematizado na Figura 9, possuindo uma massa molar de 610,52 g/mol (um pouco mais que o dobro

da Morina, devido ao dissacarídeo), com coeficiente de extinção molar em 363 nm de $14500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [79].

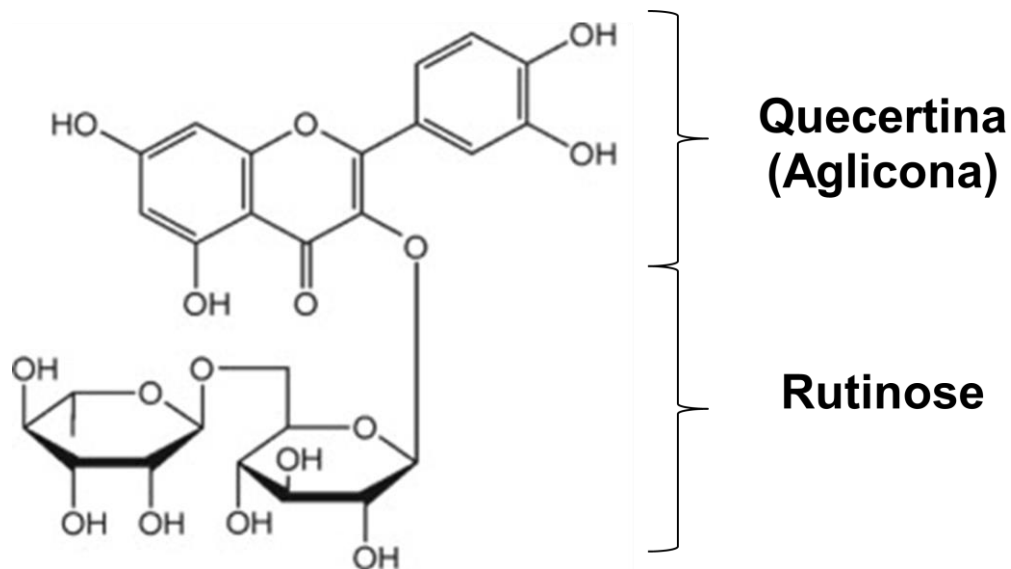


Figura 9: Flavonoide Rutina e sua estrutura química. A Rutina é composta de um flavonol quercetina, com hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel benzênico A e nas posições 4' e 3' do anel benzênico B, e um dissacarídeo Rutinose ligado a posição 3 do anel pirano. Adaptada de Chua et al, 2013 [80].

A Rutina foi isolada pela primeira vez em 1930 de laranjas. A princípio, pensava-se tratar da vitamina P, mas posteriormente foi demonstrado se tratar-se de um flavonoide. Esse flavonoide é encontrado em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto [80,81]. A Rutina é um flavonoide que apresenta um dissacarídeo (ramnose + glicose) ligado à posição 3 do anel pirano, hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel benzênico A e nas posições 4' e 3' do anel benzênico B, de acordo com a Figura 6 com a composição básica de um flavonoide [61].

A Rutina tem se destacado por sua diversidade em atividades farmacológicas [61,76]. Entre as atividades farmacológicas destaca-se a atuação da Rutina no câncer de cólon e de pulmão. Ela possui baixa toxicidade para as células, o que a torna uma candidata promissora para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos [81], podendo inibir várias doenças, entre elas o câncer, em especial os cânceres aqui mencionados, que estão relacionados à atividade aberrante da FGFR2 [70], podendo inibir o desenvolvimento de células cancerígenas associadas a essas displasias [81-84]. A Rutina induz a apoptose através da via mitocondrial,

em células cancerígenas HT-29 do cólon humano, diminuindo a viabilidade celular de forma dependente da concentração [81]. A Rutina atua também como uma libertadora de quercetina para o intestino grosso, melhorando ratos que apresentavam colite, induzida por ácido trinitrobenzeno, ao menos em parte, inibindo TNF- α dependente da ativação de NF- κ B [83]. Foi mostrado que o pré-tratamento com Rutina inibiu não apenas as alterações histopatológicas nos tecidos pulmonares, mas também a infiltração de granulócitos polimorfonucleares no fluido de lavagem broncoalveolar em lesão pulmonar aguda, induzida por lipopolissacarídeo. Além disso, a rutina suprimiu a fosforilação de NF- κ B e MAPK e a degradação de I κ B, um inibidor de NF- κ B. As atividades diminuídas de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e heme oxigenase-1 causada por lipopolissacarídeo foram revertidas pela Rutina. Ao mesmo tempo, verificou-se que a melhoria de lesão pulmonar aguda por quelação de íons metálicos extracelulares com Rutina é mais eficaz. Este estudo indica que o mecanismo protetor da Rutina é através da inibição da ativação de MAPK-NF- κ B e da regulação positiva das enzimas antioxidativas [85].

1.4 Espectroscopia de Biomoléculas

A espectroscopia pode ser utilizada como ferramenta para verificar a interação de qualquer radiação eletromagnética com a matéria. Para átomos e moléculas, nas biomoléculas, a espectroscopia é uma fonte rica de informações a respeito delas. Muitos dos conceitos utilizados pela espectroscopia estão associados à Mecânica Quântica, e a uma visão semi-clássica encontra-se o entendimento dos fenômenos oriundos da espectroscopia, como espectro eletrônico de absorção e emissão.

Utilizando a técnica de espectroscopia, pode-se obter informações quanto as propriedades, como composição química, estrutura secundária e conformação de estrutura terciária de proteínas, além de caracterizar interações, por exemplo, proteína-ligante. Nesse sentido, pretende-se utilizar as técnicas espectroscópicas de Fluorescência em estado estacionário e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), além de *Docking* e Dinâmica Molecular, para verificar e caracterizar a interação da proteína Grb2 com os ligantes Morina e Rutina.

1.4.1 Princípios Básicos da Fluorescência no estudo de Proteínas

A espectroscopia de fluorescência relaciona-se à análise da luz emitida por um material exposto à radiação na região UV-próximo ou visível, numa faixa de comprimentos de ondas de 280 e 650 nm. A energia E depende da frequência da luz utilizada ν ou do comprimento de onda λ e h é a constante de Planck, dada pela relação:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

Na região espectral considerada, as energias estão entre 4,43 e 1,91 eV. O processo mais comum nesse intervalo relacionado à absorção e à emissão de energia que envolve transições entre estados eletrônicos [86].

O fenômeno é descrito supondo que um elétron em um átomo sofra interação atrativa com os prótons dos núcleos e interação repulsiva com o restante dos elétrons do átomo em questão. Porém, os átomos podem interagir entre si e, em situações vantajosas, alguns elétrons estão fortemente ligados a um par de núcleos, onde há formação de ligações covalentes entre os átomos, constituindo moléculas. Tal compartilhamento de elétrons de um átomo qualquer pode ocorrer com mais de um parceiro [86].

Cada elétron é descrito por uma função de onda ψ_e , tanto em átomos quanto em moléculas. Numa molécula, o conjunto formado por elétrons e por núcleos forma um sistema descrito pelas interações entre seus constituintes que devem obedecer a regras específicas definidas pelo princípio de exclusão de Pauli [87]. Descreve-se o sistema segundo a hipótese de Born-Oppenheimer, onde o movimento dos elétrons e dos núcleos pode ser estudado distintamente e, por consequência, a função de onda total é formada por funções de onda separadas para elétrons e para núcleos [86,88], assim:

$$\Psi_{\text{total}} = \psi_{\text{elctr}}(r, Q) \times \psi_{\text{nucl}}(Q) \quad (2)$$

sendo que r se relaciona a coordenadas para elétrons e Q são coordenadas que descrevem posições nucleares.

No cerne dos elétrons, os orbitais atômicos, ou funções de onda dos elétrons de átomos isolados são ligados a funções de onda dos elétrons de outros átomos que formam a molécula, resultando em um sistema complexo, contudo com estados de energia bem definidos. A energia eletrônica de cada estado do sistema molecular depende do arranjo espacial, ou da geometria dos núcleos presentes na molécula.

Usando uma coordenada generalizada Q , podemos descrever o arranjo dos núcleos, que mede as coordenadas em relação a um sistema de referência que seja conveniente. Em um dado valor de Q , verifica-se que a energia eletrônica possui um valor mínimo, correspondente ao arranjo nuclear mais estável para a distribuição eletrônica daquele estado. Na Figura 10, a curva E_1 representa a energia em seu estado fundamental, ou seja, o estado de menor energia, já a curva E_2 se relaciona à energia do primeiro estado excitado. Dentro de um estado eletrônico E_i qualquer, vale ressaltar, que os núcleos podem vibrar em volta de suas posições de equilíbrio, com frequências ν_j^{vib} dadas pelos seus j modos normais de vibração. Na Figura 10 representa-se pelas linhas horizontais, cada energia dos estados eletrônicos E_i que fica acrescentada das energias, $h\nu_j^{\text{vib}}$ correspondente às energias vibracionais da molécula [86].

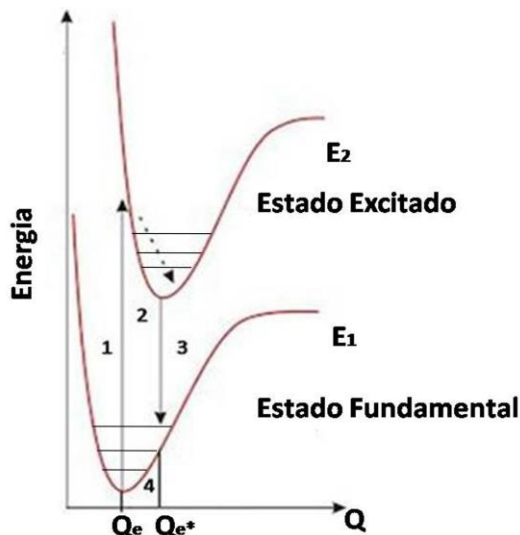


Figura 10: Representação dos níveis de energia dos elétrons em uma molécula, em função da coordenada Q que descreve as posições nucleares. Os níveis vibracionais dos núcleos da molécula correspondem as linhas horizontais. Temos representado a absorção da luz (1), relaxação da molécula no estado eletrônico excitado (2), emissão fluorescente (3) e relaxação da molécula no estado eletrônico fundamental (4). Autoria própria.

Em uma molécula há vários estados eletrônicos com energias $E_1, E_2, E_3, \dots, E_n$ onde esses valores dependem da coordenada Q , onde normalmente apenas o estado fundamental está populado na situação em que a molécula encontra-se em temperatura ambiente ou inferior. Se no estado fundamental a molécula for irradiada com energia $h\nu_a$, igual a diferença entre as energias dos estados eletrônicos $E_2(Q_e) - E_1(Q_e)$, haverá absorção de energia, o que fará a molécula passar para seu primeiro estado eletrônico excitado, havendo assim absorção da radiação de frequência ν_a ou de comprimento de onda λ_a

$$\Delta E = E_2(Q_e) - E_1(Q_e) = h\nu_a = \frac{hc}{\lambda_a} \quad (3)$$

A transição eletrônica ocorre num tempo muito pequeno, em torno de 10^{-15} segundos, não havendo assim alteração nas posições nucleares. A transição é chamada de transição vertical nesse modelo (Figura 10, etapa 1), correspondendo ao princípio de Franck-Condon [86,88], em que as posições nucleares não mudam, enquanto os elétrons assumem a configuração do estado excitado. Assim, ocorre a distribuição eletrônica do estado excitado, enquanto o arranjo espacial dos núcleos é aquele do estado fundamental, não correspondendo ao equilíbrio do sistema. Dessa forma, em toda a molécula, ocorre a relaxação para uma nova geometria nuclear da coordenada Q_e^* , onde se mostra no valor mínimo a curva da Energia E_2 , (Figura 10, etapa 2).

No retorno de seu primeiro estado eletrônico excitado para o fundamental (Figura 10, etapa 3), com os núcleos na coordenada Q_e^* , haverá emissão fluorescente, de radiação ou de um fóton com frequência ν_f ou comprimento de onda λ_f :

$$\Delta E_f = E_2(Q_e^*) - E_1(Q_e^*) = h\nu_f = \frac{hc}{\lambda_f} \quad (4)$$

Se a diferença de energia entre os dois estados eletrônicos é maior quando a molécula está na geometria do estado fundamental (coordenada Q_e) comparada com a geometria no estado excitado (coordenada Q_e^*), temos que

$$h\nu_a > h\nu_f, \quad \text{ou seja,} \quad \frac{hc}{\lambda_a} > \frac{hc}{\lambda_f} \quad (5)$$

o que implica que $\lambda_f > \lambda_a$. Esse efeito é conhecido como deslocamento de Stokes, onde experimentalmente observa-se que o comprimento de onda da luz emitida é maior que o comprimento de onda da luz absorvida. O processo é finalizado com a volta da geometria nuclear da molécula no estado excitado (coordenada Q_e^*), para a geometria do estado fundamental (coordenada Q_e) (Figura 10, etapa 4) [86].

A Figura 11 representa o diagrama de Jablonski que é uma maneira mais simples de entender os níveis energéticos de uma molécula. A luz incidente sobre uma amostra pode ser espalhada, refletida, transmitida ou absorvida.

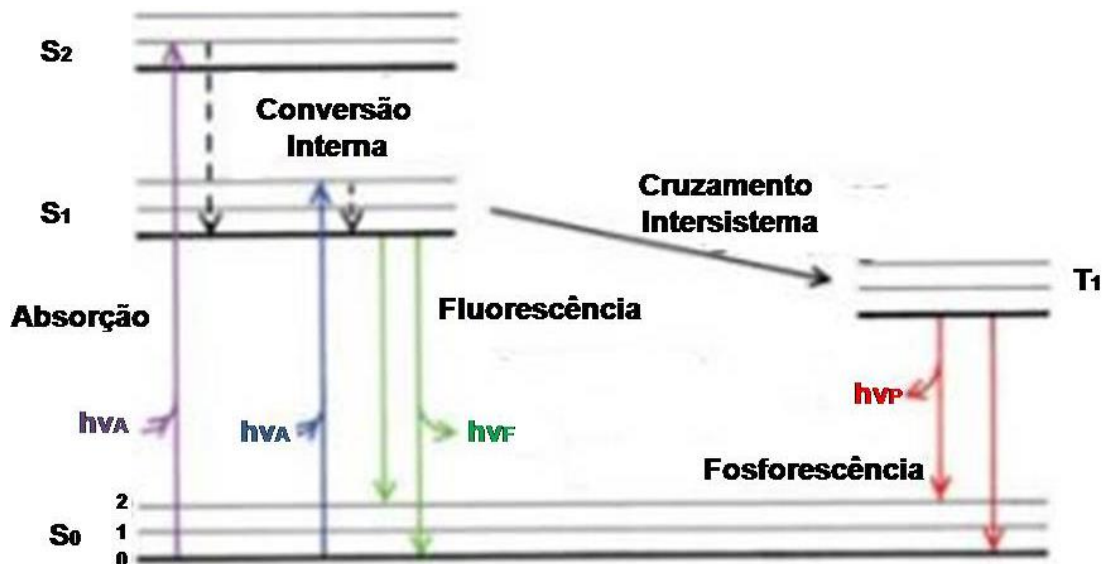


Figura 11: Diagrama de Jablonski. O diagrama de Jablonski mostra os níveis de energia singletes (S_0 , S_1 e S_2) e o estado tripleto (T_1) e vibracionais (0, 1 e 2) de uma molécula. A absorção de radiação ($h\nu_a$) está representada pelas setas dirigidas para cima e leva o átomo ou a molécula para estados eletrônicos mais energéticos (S_1 e S_2), porém os átomos e moléculas não permanecem em seus estados mais energéticos, uma vez que a energia absorvida é degradada ou perdida fazendo com que eles retornem aos seus estados fundamentais (S_0), assim, as setas dirigidas para baixo indicam a emissão de radiação para fluorescência ($h\nu_f$) e fosforescência ($h\nu_p$), respectivamente. Por fim as setas pontilhadas indicam as conversões internas, onde ocorre o processo de relaxação entre nível eletrônico excitado. Figura adaptada de Lakowicz, 2013 [89].

A irradiação de uma amostra com luz monocromática e a medida da intensidade da radiação emitida no fenômeno de fluorescência, em função do comprimento de onda de emissão são realizadas através de um espectrofluorímetro. O aparelho conta com uma fonte de luz para irradiar a amostra, um monocromador

de excitação para controlar o comprimento de luz incidente, um monocromador de emissão para definir o comprimento de onda em que será feita a medida e um sistema de detecção, que geralmente é uma fotomultiplicadora, para determinar a intensidade de luz emitida em função do comprimento de onda (Figura 12). A detecção de emissão tenta evitar a detecção simultânea da luz que excitou a amostra, de tal forma que haja uma configuração experimental conhecida como “L”, onde o canal de detecção forma um ângulo de 90° com o canal de excitação [86].

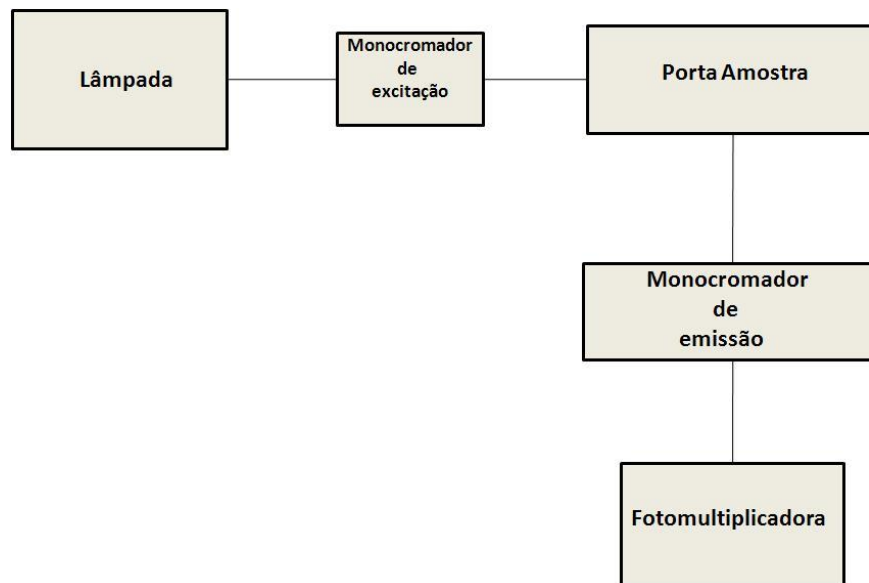


Figura 12: Esquema básico de um espectrofluorímetro. Esse esquema mostra a composição básica de um espectrofluorímetro, composto de uma lâmpada, monocromador de excitação, porta amostra, monocromador de emissão e uma fotomultiplicadora. Autoria própria.

A fluorescência em estado estacionário é assim denominada por não acompanhar no tempo os processos que influenciam a permanência da molécula no seu estado excitado. Além disso, a amostra é incidida com feixe de luz contínua. O tempo característico no processo de absorção é da ordem de 10^{-15} s e o tempo correspondente ao processo de emissão de fluorescência está tipicamente no intervalo de 10^{-10} a 10^{-7} s. Por causa da escala de tempo na fluorescência de nanosegundos, a maioria das medidas são feitas em estado estacionário. Quando a amostra é exposta à radiação, o estado estacionário é alcançado quase que de forma imediata. Esse estado é uma média dos fenômenos resolvido no tempo sobre o decaimento da intensidade da amostra [89]. Um espectro típico de fluorescência nesse estado, é mostrado a seguir, na Figura 13.



Figura 13: Espectro de fluorescência no estado estacionário. Quando a amostra é exposta a radiação o estado estacionário é obtido quase que imediatamente. Figura adaptada de Lakowicz, 2013 [89].

A utilização do espectrofluorímetro é muito útil, pois a fluorescência de proteínas é de suma importância, uma vez que auxilia na caracterização físico-química, na análise de propriedades estruturais e nas dinâmicas de biomoléculas e de complexos biomoleculares. A variação de temperatura nessa técnica oferece informações acerca da estabilidade e dos parâmetros cinéticos. Ela apresenta vantagens quando se trabalha com amostra em baixas concentrações, na faixa de μM , por apresentar alta sensibilidade [87].

As proteínas, como as outras macromoléculas biológicas não apresentam grupos com grande rendimento quântico, de fluorescência, que por definição é o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos pela molécula [89]. Contudo a espectroscopia de fluorescência tem sido utilizada com grande sucesso no estudo de sistemas biológicos [86].

Os aminoácidos que constituem as proteínas não absorvem luz visível e apenas três dos vinte aminoácidos presentes nas proteínas apresentam absorção de luz na região ultravioleta [88]. Moléculas denominadas fluoróforos, no caso de proteínas, Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr) e Triptofano (Trp), têm a capacidade de absorver fótons em seus correspondentes máximos de absorção 250, 275, 280 nm, sendo esses aminoácidos denominados aromáticos. Essa absorção faz com que os elétrons da molécula que está em seu estado fundamental passem a um estado

excitado de maior energia. No caminho reverso, ou seja, quando o elétron retorna ao seu estado de menor energia, o estado fundamental, essa perda de energia acarreta emissão de um fóton de comprimento de onda maior, conforme mostra a Figura 14 [88-89].

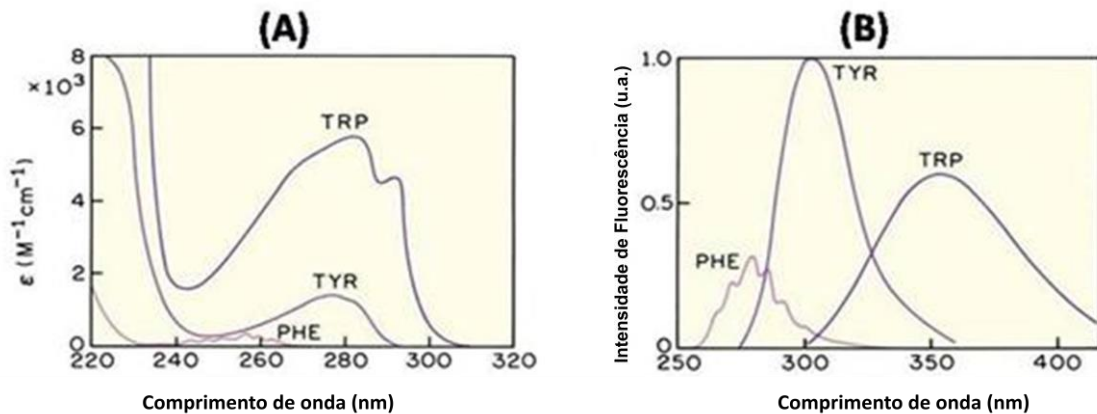


Figura 14: Espectro de absorção e fluorescência de aminoácidos aromáticos em água, pH 7,0.

Espectro de absorção o qual no eixo Y tem-se o coeficiente de extinção molar para cada comprimento de onda (A). Espectro de fluorescência sendo no eixo Y a intensidade de fluorescência para cada comprimento de onda (B). Ao retornar ao seu estado de menor energia o elétron emite um fóton de comprimento maior em relação a sua absorção, quando este foi excitado a um estado de mais alta energia, esse efeito é conhecido como deslocamento de Stokes. O triptofano é excitado em 290 nm, evitando interferência na emissão da tirosina. Figura adaptada de Lakowicz, 2013 [89].

O rendimento quântico da fenilalanila é menor que 0,05, sendo assim muito baixo, o que torna extremamente difícil utiliza-lá para o estudo de fluorescência de proteínas. A tirosina, por sua vez, tem rendimento quântico de 0,14 mas seu coeficiente de extinção molar é relativamente baixo e, ainda apresenta reações em seu estado excitado, o que a limita como sonda fluorescente em proteínas. Já o triptofano tem rendimento quântico de 0,13, e é amplamente utilizado em estudos de proteínas por fluorescência. Ele pode ser excitado por volta de 290 nm, o que evita a interferência na emissão de fluorescência tirosina, que normalmente está presente em proteínas, em maior quantidade [86].

Os triptofanos presentes na proteína, serão utilizados como sonda fluorescente, para monitorar mudanças fisico-químicas, ocasionadas por interações destas macromoléculas com um ligante de interesse. Eles irão emitir fluorescência e estes quando interagem com alguma molécula terão seu sinal suprimido. A máxima intensidade de emissão em meio aquoso ocorre entre 350 e 360 nm, e desloca-se para a região do azul, entre 330 e 340 nm em meio de baixa polaridade.

A sensibilidade da emissão do triptofano com a polaridade e as características físico-químicas do meio que o circunda, condicionam o espectro de emissão do mesmo, no qual o espectro é a região de alcance de comprimentos de onda que a molécula emite fluorescência. No caso do resíduo de triptofano em proteínas, por exemplo, a emissão ocorre em comprimentos de onda maiores quando o mesmo se encontra exposto ao solvente e em comprimentos de onda menores quando o resíduo está no interior da proteína. Em adição, pode-se obter informações sobre qual região o ligante interage com a proteína. Essa propriedade é observada na maioria das sondas fluorescentes intrínsecas e permite obter informações sobre a polaridade do meio ao redor da sonda [86].

O espectro de fluorescência resultante da interação proteína-ligante acarreta a supressão de fluorescência que está relacionada a qualquer processo cuja intensidade do espectro de emissão de fluorescência da amostra diminui com o acréscimo de molécula supressora. Sendo assim, existem vários mecanismos de interação que podem ocasionar supressão [88-89].

A supressão pode ser definida como estática ou dinâmica. A supressão estática ocorre quando há a formação de um complexo de estado fundamental não fluorescente entre uma fração dos fluoróforos e o agente supressor. Quando este complexo absorve luz ele retorna ao estado fundamental sem emitir fótons, e o sinal de fluorescência observado é dos fluoróforos não complexados. Já a supressão dinâmica ou colisional, ocorre quando o fluoróforo no estado excitado entra em contato com alguma molécula supressora. O fluoróforo que encontrar o supressor, retorna então ao estado fundamental sem a emissão de fótons. Neste tipo de supressão não ocorre alteração química nas moléculas, isso ocorre porque essa supressão afeta apenas os estados excitados dos fluoróforos não alterando, assim, o espectro de absorção das espécies em contato, ao contrário da supressão estática onde nota-se uma mudança no espectro de absorção do fluoróforo (Figura 15) [88-91].

A distinção entre supressão estática e dinâmica consiste em suas diferentes dependências relacionadas à temperatura, à viscosidade e/ou de forma preferencial ao tempo de vida de fluorescência [89]. Uma ilustração dos dois mecanismos é descrita na Figura 15.

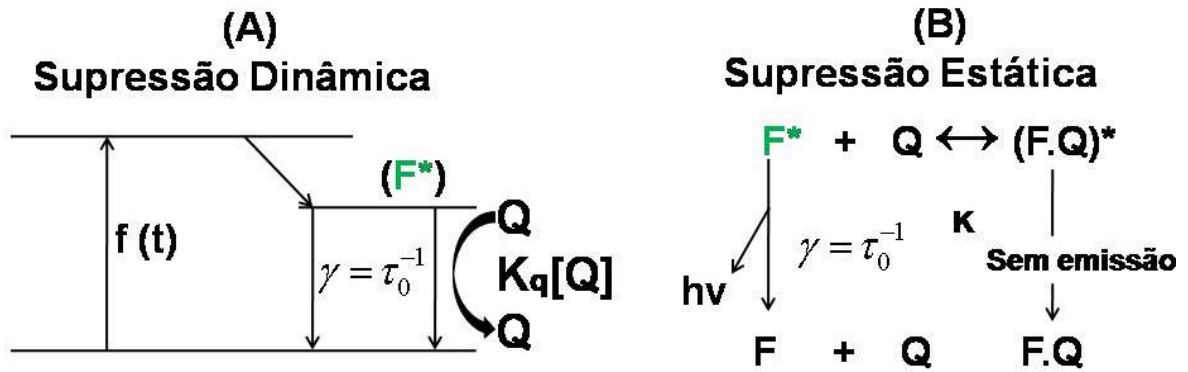


Figura 15: Mecanismos de supressão dinâmico e estático. (A) A supressão dinâmico ou colisional, ocorre quando o fluoróforo no estado excitado entra em contato com alguma molécula supressora. (B) A supressão estática ocorre quando há a formação de um complexo de estado fundamental não fluorescente entre uma fração dos fluoróforos e o agente supressor. Quando este complexo absorve luz ele retorna ao estado fundamental sem emitir fótons e o sinal de fluorescência observado é dos fluoróforos não complexados. Autoria própria.

Pela equação de Stern-Volmer [92] a supressão de fluorescência pode ser analisada pela equação (6), onde F e F_0 é a intensidade de fluorescência de estado estacionário na presença e ausência do agente supressor $[Q]$, respectivamente; K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, K_q é a constante de supressão biomolecular e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (6)$$

A razão de $\frac{F_0}{F}$ é esperada representar uma reta, ou seja, uma relação linear com a concentração do supressor. Se existir mais de uma classe de fluoróforos, cujas acessibilidades ao supressor são distintas, pode haver tanto mecanismo dinâmico quanto estático, então o gráfico de Stern-Volmer não será mais linear. Fazendo-se um ajuste linear dos dados de supressão a inclinação da reta ajustada fornece a constante de Stern-Volmer que mede a efetividade da supressão devido a um agente supressor e a partir da sua variação com a temperatura pode-se diferenciar o tipo de mecanismo de supressão que está ocorrendo, acerca da estabilidade do complexo [91]. Na maior parte dos casos que ocorre a supressão colisional, ocorre também uma parcela de supressão estática, gerando uma concavidade positiva, desviando da linearidade da equação (6), ocorrendo assim uma dependência quadrática com a concentração de ligante [89].

A equação que rege o equilíbrio da reação é dada por:



onde P é a proteína ou qualquer outra molécula, n é o número de sítios de ligação, L é o ligante e LnP é a molécula do novo complexo cuja constante de associação é K_a , na qual calcula-se, como:

$$K_a = \frac{[LnP]}{[L]^n[P]} \quad (8)$$

onde [LnP] é a concentração do novo complexo proteína-ligante, [L] é a concentração de ligante e [P] é a concentração de proteína. No caso, em que a proteína pode se encontrar complexada ou livre do ligante, temos:

$$[P_t] = [LnP] + [P_f] \quad (9)$$

onde [P_f] é a concentração de proteína livre e [P_t] a concentração de proteína total. A razão entre a intensidade de fluorescência da solução que dispõe de proteína livre F₀ e a intensidade de fluorescência após a adição de ligante na solução F é igual a razão entre a concentração de proteína total por proteína livre:

$$\frac{[P_t]}{[P_f]} = \frac{F_0}{F} \quad (10)$$

Fazendo,

$$[P_a] = [LnP] \quad (11)$$

tem-se:

$$[P_t] = [P_a] + [P_f] \quad (12)$$

$[P_t]$ é a concentração de proteína total, n o número de sítios de ligação, $[P_f]$ a concentração de proteína livre e $[P_a]$ a concentração de proteína ligada.

Substituindo as equações (10) e (11) em (8), temos:

$$K_a = \frac{[P_t] - [P_f]}{[L_f]^n [P_f]} \quad (13)$$

Prosseguindo,

$$K_a = \frac{[P_t] - [P_f]}{[L_f]^n} \quad (14)$$

Assim,

$$\frac{[P_t] - [P_f]}{[P_f]} = \frac{F_0 - F}{F} \quad (15)$$

Logo,

$$\frac{F_0 - F}{F} = K_a [L_f]^n \quad (16)$$

Admite-se, então, que a concentração de ligante na solução é maior que a concentração de proteína, sendo a concentração de ligante total aproximadamente igual a concentração de ligante livre $[L_t] \cong [L_f]$. Logo, a equação de supressão para o equilíbrio de ligação, torna-se:

$$\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_a + n \log [L] \quad (17)$$

na qual se observa uma dependência linear, podendo-se obter os valores relativos ao número n de sítios de ligação por proteína e à constante de associação K_a relativa à interação dos ligantes com as proteínas [89,91-92].

A técnica de fluorescência permite fazer um estudo termodinâmico da interação proteína-ligante. As interações entre ligantes e proteínas podem ser interações, tais como ligações de Hidrogênio, interação de Van der Waals, interações eletrostáticas e contatos hidrofóbicos no sítio de ligação [87].

Os parâmetros termodinâmicos fornecem o tipo mais predominante de interação que ocorre no sistema devido a contribuições energéticas decorrentes da entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) as quais podem ser calculados a partir do gráfico de van't Hoff, (Equação 18). De acordo com a literatura, se $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, o sistema é dominado por interações hidrofóbicas; se $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, o sistema é dominado por ligações de hidrogênio ou Van der Waals; se $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$, o sistema é dominado por interações eletrostáticas [91,93].

Se ΔH não varia de forma significativa no intervalo de temperatura estudado [87-88], as variações entálpicas (ΔH) e as entrópicas (ΔS) podem ser analisadas pela equação de van't Hoff que relaciona a constante de equilíbrio com a temperatura:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (18)$$

sendo que R é a constante universal dos gases ideais ($8,31 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) e K_a é a constante de associação em uma correspondente temperatura. A partir da inclinação e da ordenada, obtemos ΔH e ΔS , respectivamente, a partir da relação de van't Hoff (18). Já, a energia livre de Gibbs (ΔG) será calculada pela equação (19) e é de extrema importância pois mostra o caráter espontâneo da interação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (19)$$

1.4.2 Ressonância Magnética Nuclear

1.4.2.1 Teoria básica de Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é aplicável a qualquer átomo que apresenta spin nuclear diferente de zero. Os núcleos de ^1H , ^{13}C , ^{15}N apresentam spin nuclear (I) $\frac{1}{2}$ e, assim, assumem duas possíveis orientações na

presença de um campo magnético externo (\mathbf{B}_0). Além disso, do ponto de vista biofísico-químico, esses átomos são constituintes essenciais de biomoléculas [94-95]. O STD (*Saturation Transfer Difference*) pode ser direcionado ao núcleo de ^1H , por esse apresentar apenas um próton e, assim, permitir o desenvolvimento dessa teoria. Com um spin nuclear (I) de $\frac{1}{2}$ unidade de $(\hbar/2\pi)$ e momento magnético nuclear, surge da rotação dos prótons e nêutrons, (sendo na essência) um momento de dipolo magnético (μ) proporcional a I , tem-se o que é conhecido como razão giromagnética (γ). Essa grandezas, se relacionam através da equação (20) [94]:

$$\mu = \frac{\gamma \hbar}{2\pi} \quad (20)$$

sendo que a constante γ é única para cada núcleo. Essa constante é um fator de proporcionalidade entre a frequência de ressonância de um núcleo e o campo aplicado, podendo adotar valor positivo ou negativo [94-95].

No campo magnético, há $2I+1$ orientações permitidas para o spin nuclear. Para o caso do ^1H , a interação com o campo magnético dá origem a dois níveis de energia e têm-se duas orientações permitidas (*up* e *down*), definida pelo valor do número quântico magnético m_I . Para o ^1H , têm-se valores de $\pm 1/2$. Conforme mostra a Figura 16.

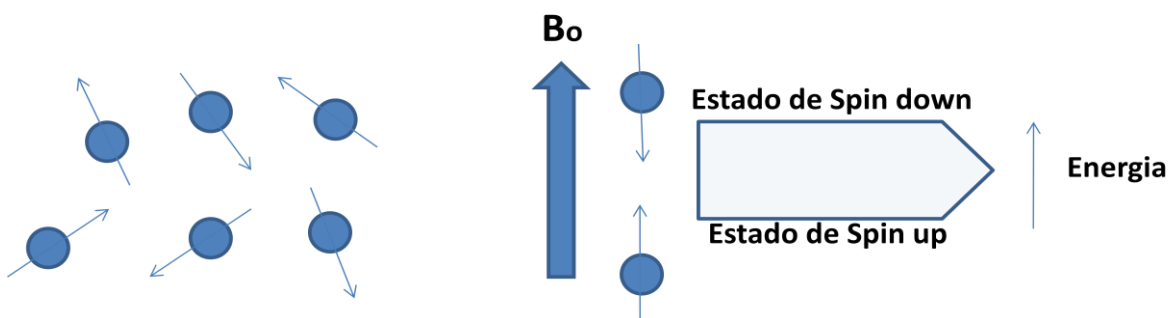


Figura 16: Representação para as duas orientações possíveis para o spin $\frac{1}{2}$. Na ausência de campo magnético os spins possuem diferentes orientações possíveis. Já na presença de campo magnético (\mathbf{B}_0) esses spins se alinham a favor (*up*) ou contra (*down*) o campo. Autoria própria.

A energia de interação do núcleo e o campo magnético externo é igual o campo do momento magnético nuclear. Usando a equação (20), obtém-se a equação (21), sendo \mathbf{B}_0 o campo magnético aplicado.

$$\mathbf{E} = -\frac{\gamma\hbar}{2\pi m_I} \mathbf{B}_0 \quad (21)$$

A regra de seleção para as transições de RMN é $\Delta m = \pm 1$, sendo que m_I somente pode mudar de uma unidade. Dessa forma, a condição para todos os experimentos de ressonância é dada pela equação (22):

$$h\nu = \Delta E = \frac{\gamma\hbar\mathbf{B}_0}{2\pi} \quad (22)$$

eliminando h , a frequência de ressonância para todos os experimentos de RMN é dada pela equação (23):

$$\nu = \frac{\gamma\mathbf{B}_0}{2\pi} \quad (23)$$

sendo que ν é chamada de frequência de Larmor, que é a frequência de precessão do núcleo em torno do campo externo [94].

1.4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Proteínas em Solução

A técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta aplicada ao estudo de propriedades estruturais e dinâmicas de moléculas orgânicas em solução, em especial proteínas. Trata-se de uma técnica poderosa para caracterizar as interações moleculares de pequenas moléculas com macromoléculas, tais como as proteínas [96].

As proteínas são constituídas por aminoácidos que são ricos em Hidrogênios, possuindo spin $\frac{1}{2}$, o que torna estas moléculas bons alvos para o estudo por RMN em solução [96].

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear determina as frequências de ressonância para absorção de radiofrequências, na presença de um campo magnético externo. Este campo tem a finalidade de desdobrar os níveis nucleares degenerados, criando um hiato energético que possa ser transposto por absorção das radiofrequências aplicadas. Quanto mais intenso for o campo magnético externo aplicado, mais vantajoso ele se torna, uma vez que a população do nível superior se apresenta o mais diferente possível da população de nível inferior, aumentando o sinal de absorção. O nível de menor energia, e

portanto mais populado, de acordo com a distribuição de Boltzmann, corresponde ao alinhamento do momento de dipolo paralelo ao campo magnético externo. Essa diferença populacional é da ordem de 10^{-6} , extremamente pequena, porém é essa frequência associada ao relaxamento dos núcleos, que o espectrômetro detecta devido à diferença de energia das populações de spins [95].

Os espectros de RMN unidimensionais consistem em apresentar as intensidades de ressonância em função da frequência. Uma escala de deslocamentos químicos, que é a diferença de um sinal de RMN para um dado núcleo, é utilizada, segunda a qual se dá a diferença da molécula a um composto de referência, que seja independente do campo magnético aplicado. Isso faz com que se possa analisar o espectro de uma mesma substância em aparelhos de campos magnéticos de intensidade diferentes. Essa escala é conhecida por ppm (parte por milhão) referente à diferença populacional já citada e é dada por:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \quad (24)$$

sendo que δ é o valor da ressonância em ppm (parte por milhão), ν é a frequência e ν_{ref} é a frequência de referência. Os desvios entre as frequências são multiplicados por 10^6 para chegar a valores próximos da unidade.

Para RMN de ^1H ou ^{13}C o composto utilizado como referência é o TMS (tetrametilsilano) ou $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$. Ele apresenta apenas um sinal, o que o torna um bom espectro de referência. Isso ocorre porque, os 12 Hidrogênios estão no mesmo ambiente químico, já que cada H_3 está ligado a um C que estão ligados ao Si [95].

1.4.2.3 Interação entre Proteína e ligantes por STD

Muitos métodos de RMN de ^1H têm sido desenvolvidos para caracterizar processos de ligação a nível molecular. Um desses métodos é o STD, uma técnica que busca verificar em solução se há interação, entre a proteína e o ligante. A técnica de STD é comumente utilizada para grandes proteínas (em torno de 30 kDa), ou seja, aquelas que possuem maiores massas molares. Essas proteínas possuem ainda um grande tempo de correlação τ_c que aumentam a difusão de spin e a

transferência de saturação para o ligante. Além disso, no STD, observa-se apenas o sinal dos ligantes que ligam-se moderadamente ao receptor, o que torna os espectros mais simples [97-98]. A partir de alterações de deslocamentos químicos, de tempos de relaxação (T_1 , T_2), de constantes de difusão (D) e de NOEs ou transferência de saturação, metodologias têm sido desenvolvidas para detectar interações entre ligantes e receptores macromoleculares, tais como as proteínas [97].

As proteínas são, do ponto de vista da RMN, um sistema complexo de Hidrogênios acoplados de forma dipolar nos quais o tempo de relaxação longitudinal (a qual está associada à recuperação da distribuição de Boltzmann de equilíbrio após pulso de rádio frequência) é dominado pela taxa de relaxação cruzada intramolecular [94;97-98]. A saturação de uma proteína espalha-se de forma rápida para outros sinais com mudanças das amplitudes dos sinais da proteína denominado difusão de spin, devido ao Efeito Nuclear Overhauser (NOE). O NOE é a alteração da intensidade de magnetização longitudinal por acoplamento dipolar entre spins [94], ocorrendo através do espaço. Um ligante que esteja próximo espacialmente à proteína sentirá esse efeito através da relaxação intermolecular cruzada. Boa parte das pesquisas farmacêuticas se baseiam nesse princípio, para entender a ligação de moléculas pequenas com proteínas que participam de processos celulares específicos [97].

Quando um ligante, que é normalmente uma molécula pequena, se liga a uma proteína, o seu NOE sofre alterações que levam a observar a transferência de magnetização [99]. Isso acarreta numa diversidade de esquemas experimentais (sequências de pulsos) que são utilizados para detectar e também caracterizar a ligação. Moléculas pequenas ou médias apresentam NOEs positivos, que chegam a um incremento máximo de sinal de 50%, e curtos τ_c ($\omega_0\tau_c < 1$), que é definido como o tempo médio entre as colisões moleculares para uma molécula, depois de alguns segundos da excitação. Por outro lado, grandes moléculas exibem intensos NOEs negativos que chegam a um incremento máximo de sinal de -100% com menos de 200 ms e longos τ_c ($\omega_0\tau_c > 1$) [98].

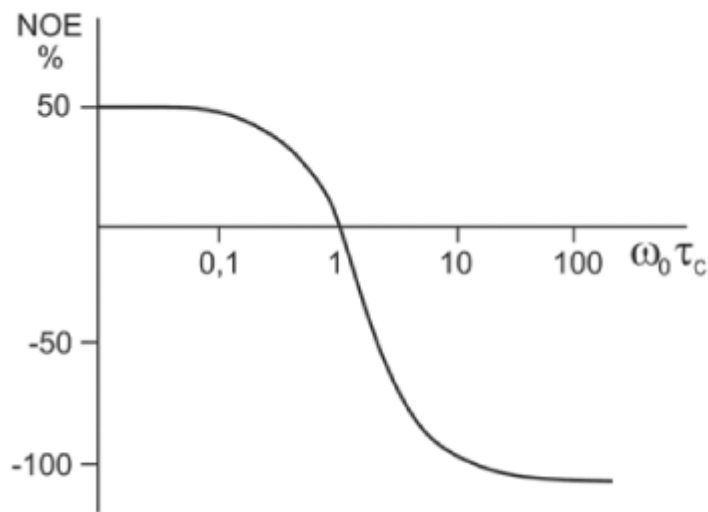


Figura 17: Variação do NOE homonuclear com o tempo de correlação. Neste gráfico evidencia-se à dependência do NOE homonuclear entre os hidrogênios em função do produto $\omega_0\tau_c$ devido ao efeito de relaxação longitudinal. Figura Retirada de Figueiredo et al, 2007 [97].

Quando ocorre a interação entre o ligante e a proteína, o ligante passa a comportar-se como parte da proteína. Dessa forma, o ligante adota o comportamento da proteína, passando a ter um NOE fortemente negativo, que mostra a conformação do ligante interagente ao receptor [97]. A partir dessa intensidade observada e da fase, a ligação de um ligante à proteína pode ser facilmente diferenciada.

O experimento de STD é o experimento mais conhecido de transferência de NOE. Isso talvez se deva ao fato de esse experimento ser mais sensível e prático, além de tornar possível o cálculo das constantes de dissociação entre as moléculas interagentes [97,100].

O STD consiste da diferença de dois experimentos, o *off-resonance* e *on-resonance*. No primeiro experimento (*on-resonance*), a magnetização dos Hidrogênios da macromolécula é seletivamente saturada via pulsos de radiofrequência. Os pulsos de radiofrequência são aplicados numa frequência a qual abrange somente os sinais da proteína. Hidrogênios saturados da proteína propagam saturação para outros Hidrogênios via rede de interações dipolares intramolecular H-H [97-98,100], por difusão de spin. O processo de difusão de spin torna-se bem eficiente devido à massa molar da proteína, por isso quanto maior for o tamanho da proteína, da ordem de 30 kDa, mais eficiente será esse processo. As moléculas de ligante que interagem com a proteína recebem magnetização dela, se

dissociando e voltando para a solução onde seu estado saturado persiste devido ao pequeno tempo de relaxação longitudinal do mesmo [101-102]. O segundo experimento *off-resonance*, é o experimento de referência, obtido a partir de uma sequência de pulsos fora da região espectral, onde não há nenhum sinal da proteína nem do ligante. Os experimentos *off-resonance* e *on-resonance* são subtraídos e, com a diferença dos dois experimentos, têm-se apenas os sinais do ligante que recebeu magnetização da proteína, resultado da interação proteína-ligante. Quanto maior esse sinal, mais específica é a interação [100].

No experimento de STD, o grau de saturação de um Hidrogênio individual de um ligante mostra o quanto ele está próximo da proteína [98]. Quanto mais orientado um Hidrogênio individual do ligante está da proteína, mais intensa será a magnetização que ele sofrerá devido à influência da macromolécula. Assim, define-se por epítipo a superfície de contato proteína-ligante que pode ser mapeada através dos hidrogênios saturados na interface [97].

O mapeamento dos epítipos se revela pela razão entre as intensidades do espectro STD e do espectro de referência, onde o próton ou o conjunto deles mostre um maior A_{STD} (fator STD). A normalização é feita multiplicando-se por 100% e os demais são normalizados de forma relativa ao maior valor. De forma matemática, tem-se [103]:

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} = \frac{I_{STD}}{I_0} \quad (25)$$

Onde I_0 é a intensidade do espectro de referência (*off-resonance*), I_{SAT} é a intensidade do espectro de saturação (*on-resonance*) e I_{STD} é a intensidade do espectro de diferença (*off-resonance* – *on-resonance*).

A determinação dos epítipos de interação determinam quais regiões das moléculas estudadas interagem mais fortemente com a macromolécula. Nesse trabalho, os epítipos são importantes, fornecendo informações estruturais da interação entre as moléculas estudadas e que auxiliam, por exemplo, em simulações computacionais de *Docking* e Dinâmica Molecular. Essas por sua vez, buscam entender como a molécula se liga à proteína sob o olhar da biologia estrutural, desvendando, por exemplo, quais resíduos coordenam a interação em questão e também possíveis mudanças conformacionais, que a macromolécula sofre para

acomodar o ligante em sua estrutura. A obtenção destas informações, nos confere a possibilidade de inferir a respeito dos mecanismos de ação, que norteiam a interação em questão, que por sua vez, contribui como base de conhecimento para desenvolvimento de fármacos mais eficazes.

2- Objetivos

A proteína Grb2 atua como uma reguladora de processos de sinalização envolvendo FGFR2, que quando encontra-se desregulada tem sua atividade associada à sinalização aberrante e ao câncer. Nesse contexto, Grb2 é fundamental nessa via e devido sua versatilidade e interações variadas com outras proteínas dentro da célula. Pretende-se obter informações estruturais e parâmetros termodinâmicos a respeito da interação, da Grb2 com Morina e Rutina, contribuindo para uma base de conhecimento que auxilie futuramente no desenvolvimento racional de fármacos mais eficientes no combate e/ou cura do câncer, bloqueando a ação aberrante de FGFR2. Dessa forma, o presente trabalho propõe:

1. Realizar a expressão e purificação da Proteína Grb2;
2. Verificar se existe a interação da proteína Grb2 com a Morina e a Rutina;
3. Caracterizar o perfil termodinâmico da interação, utilizando espectroscopia de fluorescência em estado estacionário;
4. Mapear os epítomos da interação que existe entre os flavonoides e a proteína utilizando a técnica de STD por RMN;
5. Fazer *Docking* Molecular para visualizar o sítio de interação.

3- Materiais e Métodos

3.1 Expressão e Purificação da Proteína Grb2

A proteína Grb2 foi expressa com o vetor pET28b em bactéria *E.coli* Gold (DE3). As colônias foram cultivadas em meio LB líquido com adição de Canamicina (50 µg/mL) e Tetraciclina (50 µg/mL) sob agitação a 37°C até atingir uma OD = 0,6. Acrescentou-se 0,4 mM de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) e induziu-se a 15h em 20 °C. O meio de cultura foi centrifugado a 3583 xg por 40 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, 300 mM NaCl, 1 mM βMe e 0,25 mg/ml de Lisozima, pH= 8,0) com o acréscimo de inibidor de protease (P2714-1BTL - Sigma Aldrich®) e lisadas por sonicação. A amostra foi centrifugada a 34957 xg por 50 minutos a 4 °C. Em seguida o produto lisado foi aplicado em resina de afinidade carregada com Cobalto His Trap MAC HP (5 mL), previamente equilibrada com Tampão A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl e 1 mM βMe, pH= 8,0) e conectado ao purificador automático ÄKTA (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES) Purifier (GE®). A eluição de Grb2 foi feita utilizando-se o Tampão B (Tampão A + 200 mM de Imidazol). As amostras foram concentradas em alíquotas de 1 mL antes de injetar em resina Superdex 200 10/30 GL, equilibrada com Tampão C (20mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, 1 mM βMe, pH 8,0 para experimentos de fluorescência) ou Tampão D (50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaF (Fluoreto de sódio), 1 mM βMe, pH 8,0 para experimentos de RMN) e eluída com o mesmo. O grau de pureza da proteína foi verificado por gel SDS-PAGE 15% e a mesma foi obtida com pureza suficiente, para realizar os experimentos propostos.

3.2 Preparo dos ligantes

Os flavonoides Morina (2',3,4',5,7-pentahidroxiflavona) com massa molar de (302,24 g/mol) e Rutina (Quercetina-3-O-α-L-Rhamnopiranosil-(1→6)-β-D-Glucopiranosídeo) de (610,52 g/mol) foram diluídos em etanol absoluto. Na RMN, utilizou-se para dissolver os flavonoides etanol deuterado absoluto. Para determinar a concentração da solução estoque dos flavonoides preparados, utilizou-se a espectroscopia de absorção UV-Vis. Para a Morina dissolvida em etanol, utilizou-se um coeficiente de extinção molar em 271 nm de $\epsilon_{271} = 16949 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Já, para a

Rutina dissolvida em etanol absoluto, utilizou-se o coeficiente de extinção molar em 363 nm de $\epsilon_{363} = 14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [79]. Coletou-se o espectro de absorção com o espectrofotômetro Cary 3E spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA). Com os espectros de absorção coletados, pode-se determinar os máximo de absorção, com seus respectivos coeficientes de extinção molar em um caminho óptico $l = 1 \text{ cm}$ e determinar a concentração da solução estoque.

3.3 Determinação da Concentração de Grb2

Para a proteína Grb2, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $38055 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ em 280 nm. O espectro de absorção UV-Vis foi coletado em temperatura ambiente em um espectrofotômetro Cary 3E spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA) equipado com uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. O espectro de absorção de UV-Vis foi registrado de 200 a 500 nm, fazendo-se a subtração da linha de base do tampão da solução analisada. O cálculo da concentração foi feito segundo a equação de Beer-Lambert [104-105].

3.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os experimentos de DSC para Grb2 foram realizados utilizando um dispositivo N-DSC III (TA Instruments, EUA) na faixa de temperatura de 22-75 °C, com uma velocidade de varredura de aquecimento de 1 °C/min. A proteína Grb2 foi diluída em tampão C, com concentração final de 0,54 mg/ml. Inicialmente, as duas células calorimétricas foram preenchidas com uma solução tampão, equilibradas a 20 °C durante 10 minutos e varridas na faixa de temperatura descrita acima até a estabilização da linha de base. Subsequentemente, a célula de amostra foi preenchida com Grb2 e analisada da mesma forma. As correções da linha de base foram feitas subtraindo as varreduras “tampão-tampão” das correspondentes varreduras “proteína-tampão” [106-107].

3.5 Fluorescência em Estado Estacionário

Realizaram-se as medidas de fluorescência no Espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian®, equipado com Peltier Single Cell Holder System, em cubetas de

quartzo de 1 cm de caminho óptico, em temperaturas de 291, 295 e 299 K, para realizar a caracterização termodinâmica dos complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina, respectivamente, com abertura das fendas de emissão e excitação ajustadas em 0,5 nm. Os triptofanos da proteína Grb2 foram excitados em 290 nm com a faixa de emissão de 300 a 500 nm. A supressão de fluorescência foi feita com a concentração de Grb2 mantida constante a 2 μM em 2000 μL , adicionando-se titulações de 2 μL de flavonoide, variando o volume total da amostra em 3%. Variou-se a concentração de flavonoide de 0 a 5,9 μM com incrementos de 0,2 μM por titulação.

3.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram coletados em espectrômetro Bruker Avance III 600,13 MHz equipado com uma criosonda de ressonância tripla 5 milímetros, com o gradiente de campo pulsado ao longo do eixo Z. Todos os dados foram analisados com *SOFTWARE* Bruker Topspin versão 3.2. A solução de Grb2 5 μM foi utilizada para determinar a melhor condição de saturação. A condição de melhor saturação da proteína foi na frequência de -1,0 ppm (*on-resonance*), mantendo a frequência *off-resonance* a 20 ppm [108]. O tempo de saturação da Grb2 foi em 2 s. Morina e Rutina, foram titulados em uma concentração de 300 μM . O tempo de equilíbrio foi de 3 e 5 s para o complexo Grb2-Morina e Grb2-Rutina, respectivamente. O total de 2000 *scans* foram coletados para o complexo Grb2-Morina e 512 *scans* para o complexo Grb2-Rutina. O experimento de competição foi feito para uma comparação direta da afinidade dos dois flavonoides por Grb2. Os experimentos foram realizados a 20 °C [108].

4- Resultados e Discussão

4.1 Expressão e Purificação da Proteína Grb2

A proteína Grb2 foi expressa, segundo o protocolo, descrito na seção 3.1 de materiais e métodos, e o resultado pode ser visto na Figura 18. É possível observar a banda correspondente à proteína Grb2 fusionada com seis resíduos de histidinas na região C-terminal, um pouco acima de 25 kDa, o que pode ser explicado devido ao tampão utilizado na corrida, a composição do gel, a composição de aminoácidos que pode mudar a forma de migrar da proteína ou até mesmo porque os marcadores possuem massa molar estimada, e principalmente pelo vetor utilizado para a expressão [109].

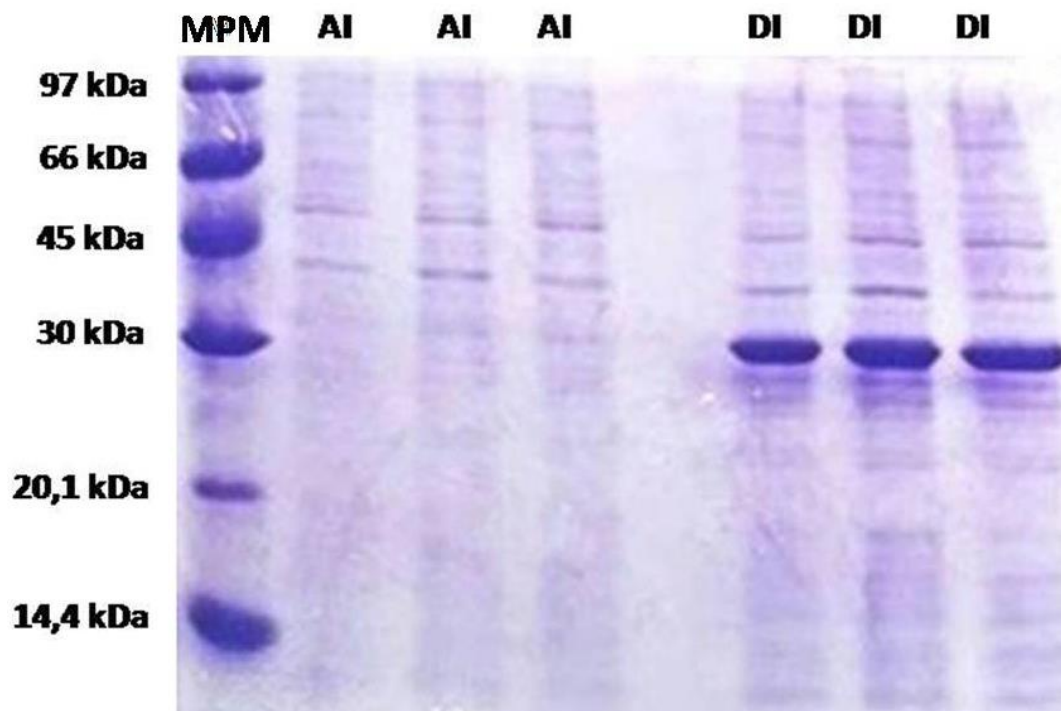


Figura 18: Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a expressão da proteína Grb2 em *E.coli* BI21 Gold DE3. Os valores na lateral do gel indicam referências de massa molar (as proteínas utilizadas são: 97 kDa – Fosfolipase B; 66 kDa – Albumina; 45 kDa – Ovoalbumina; 30 kDa Anidrase Carbônica; 20,1 kDa – Inibidor de Tripsina e 14,4 kDa – Lactoalbumina – α), MPM: marcador de massa molar; AI: antes da indução e DI: depois da indução. A proteína Grb2 fusionada com cauda de Histidina apresenta um valor acima da ordem de 25 kDa, o que pode ser devido ao tampão de corrida, a composição do gel, a composição de aminoácidos que pode mudar a forma de migrar da proteína ou até mesmo porque os marcadores possuem massa molar estimada, além do vetor utilizado para expressá-la.

A proteína Grb2 foi purificada utilizando-se o sistema ÄKTA Purifier (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES), de modo que o processo fosse otimizado, aumentando-se assim o rendimento de proteína, para realização de experimentos. Primeiramente, purificou-se a amostra utilizando-se cromatografia de afinidade com resina equilibrada por Cobalto His Trap IMAC HP (5 ml). As histidinas interagem especificamente com o cobalto (Co^{2+}), uma vez que a proteína com a cauda de histidina é imobilizada no suporte e separada do extrato protéico, à resina pode ser lavada com Tampão A. Na Figura 19, observa-se um pico de alta intensidade e largo, onde proteínas que não se ligam a resina de cromatografia estão saindo da coluna previamente equilibrada com Tampão A. Após a absorção retornar a sua linha de base, com o Tampão B, é feita a eluição da proteína Grb2, pois o Imidazol compete pelo cobalto, fazendo com que a proteína seja eluída.

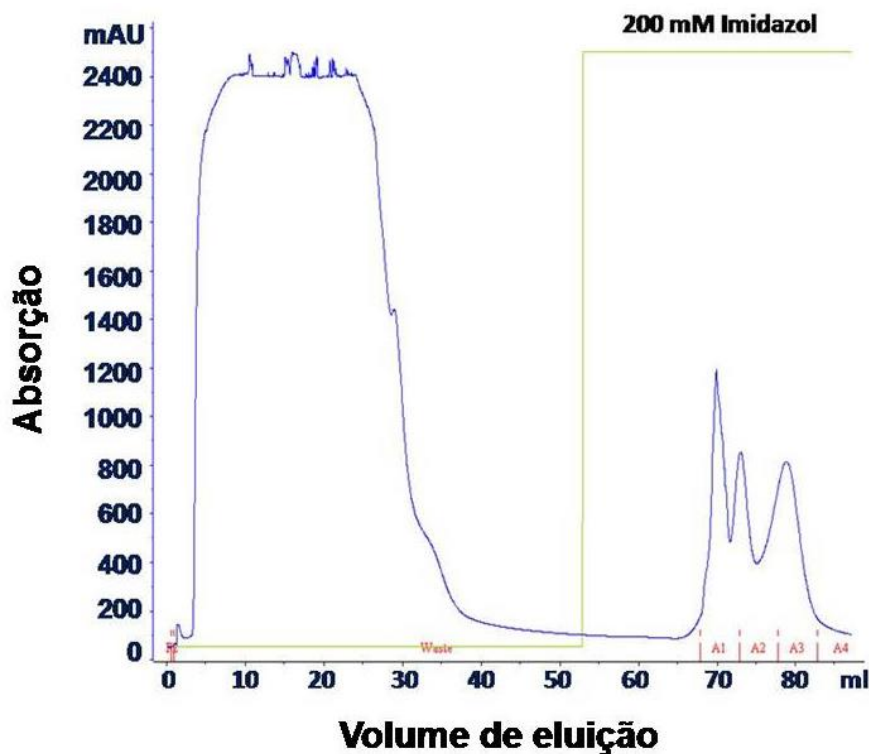


Figura 19: Cromatograma da purificação por afinidade da proteína Grb2. A linha azul indica a absorção em 280 nm das moléculas que passam pela coluna de afinidade. O pico maior e mais largo indica que proteínas com ligações inespecíficas estão sendo retiradas, com lavagem do Tampão A. Ao retornar a linha de base, a proteína Grb2 é eluída com Tampão B, sendo que a eluição começa pouco depois de 50 ml de lavagem, como mostra a linha verde no cromatograma representando a passagem de 100% de Tampão B que contém 200 mM de Imidazol.

O resultado dessa etapa de purificação pode ser verificado pela Figura 20, na qual tem-se uma fração referente a cada pico, além do *FLOW*. Nessa figura, a

proteína é visualizada na frações A1, com A1 mais concentrada porém com alguns contaminantes, a não visualização das bandas correspondentes as frações A2 e A3 pode ser explicada como resultado de uma amostra mais diluída.

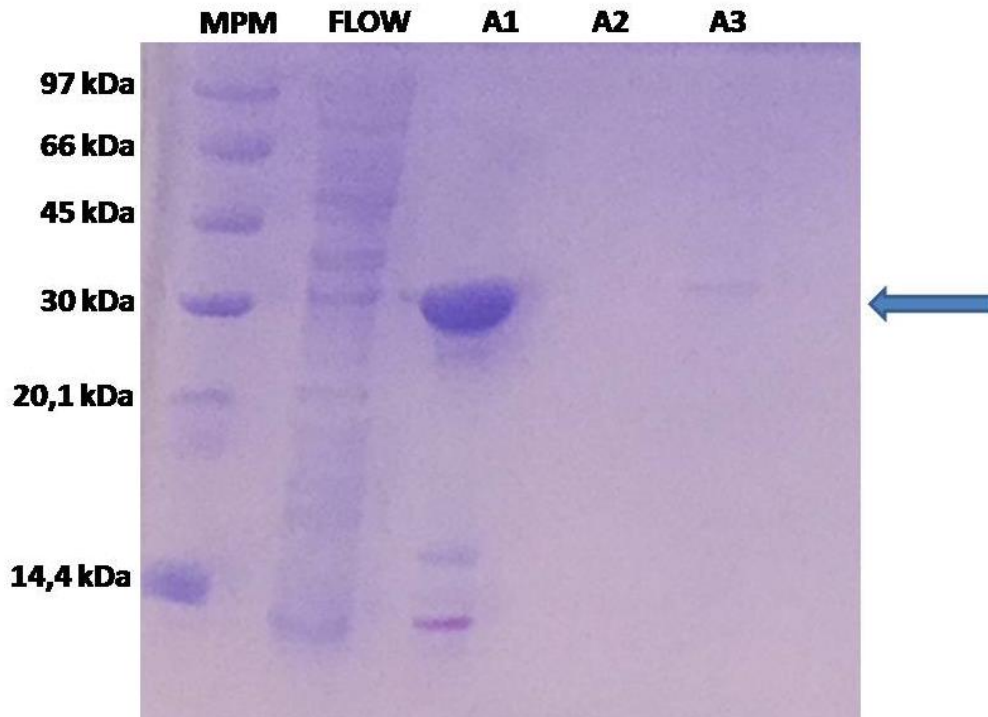


Figura 20: Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a purificação por cromatografia de afinidade. Os valores na lateral do gel indicam referências de massa molar. MPM: marcador de massa molar; *FLOW*; A1 (fração 1); A2 (fração 2) e A3 (fração 3). O valor próximo a 30 kDa pode ser supostamente explicado porque o peso desses marcadores é estimado e sua migração depende da composição do tampão escolhido para a eletroforese e do próprio gel, além do vetor utilizado.

A amostra então, após a cromatografia por afinidade, foi concentrada até o volume de 1 mL por centrifugação. Após concentração, a amostra foi injetada em coluna de gel filtração Superdex 200 10/30 GL, equilibrada com Tampão C ou D, dependendo do experimento a ser realizado. O resultado da purificação pode ser analisado pelo cromatograma da Figura 21.

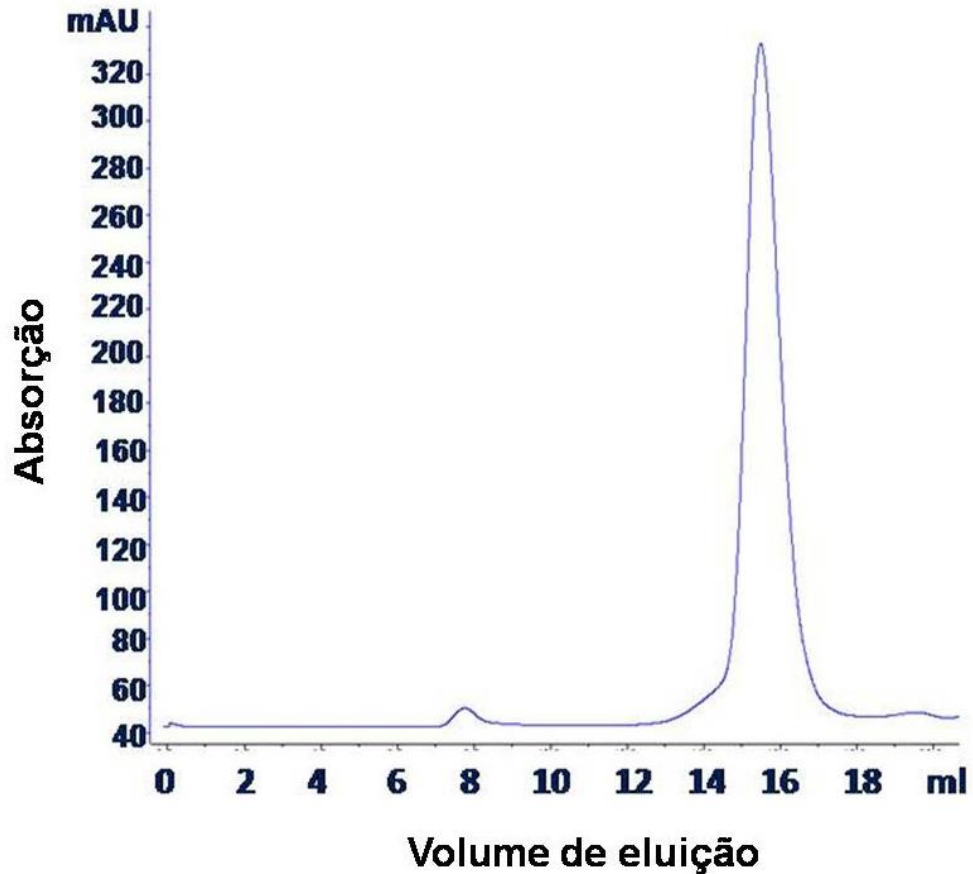


Figura 21: Cromatograma referente a purificação por cromatografia de gel filtração. A linha azul indica a absorção em 280 nm. Sendo este um perfil típico de Grb2 em cromatografia de Gel Filtração em resina Superdex 200 10/30 GL.

Na Figura 21, nota-se o perfil da proteína Grb2 na cromatografia de gel filtração, com dois picos de absorção. Sendo segundo pico o de maior intensidade e no qual a proteína está sendo eluída. O sucesso da purificação pode ser analisado pela Figura 22, no gel SDS-PAGE 15%, no qual coletaram-se frações de 0,5 ml do segundo pico.

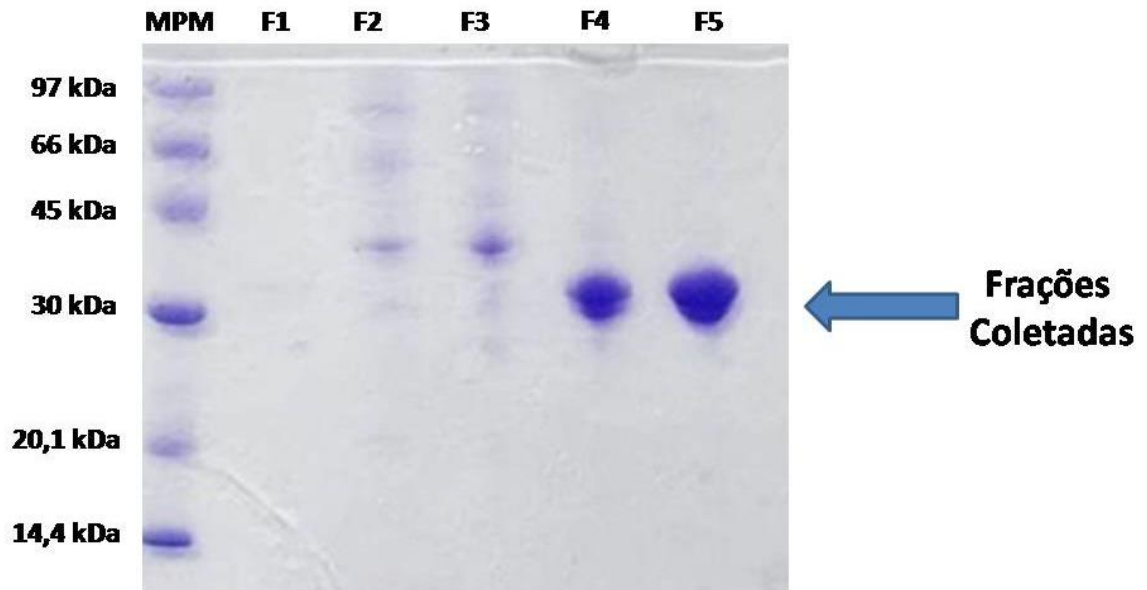


Figura 22: Gel SDS-PAGE 15% corado com Comassie Brilliant Blue referente a purificação por cromatografia de gel filtração. Os valores a lateral do gel indicam referências de massa molar. MPM: marcador de massa molar e as outras bandas “Fs” são as frações coletadas. A proteína Grb2 apresenta um valor em torno de 25,2 kDa. Nota-se que a amostra foi eluída em concentrações relativamente altas, o que foi verificado em espectroscopia de absorção UV-Vis.

4.2 Espectroscopia de UV-Vis

Os espectros de absorção de Morina e Rutina estão mostrados na Figura 23, onde ambos apresentam três picos de absorção característicos. O pico de absorção utilizado para a Morina foi em 271 nm e, para a Rutina, em 363 nm, com o objetivo de determinar a concentração estoque dessas moléculas, para os experimentos de Fluorescência em estado estacionário e RMN.

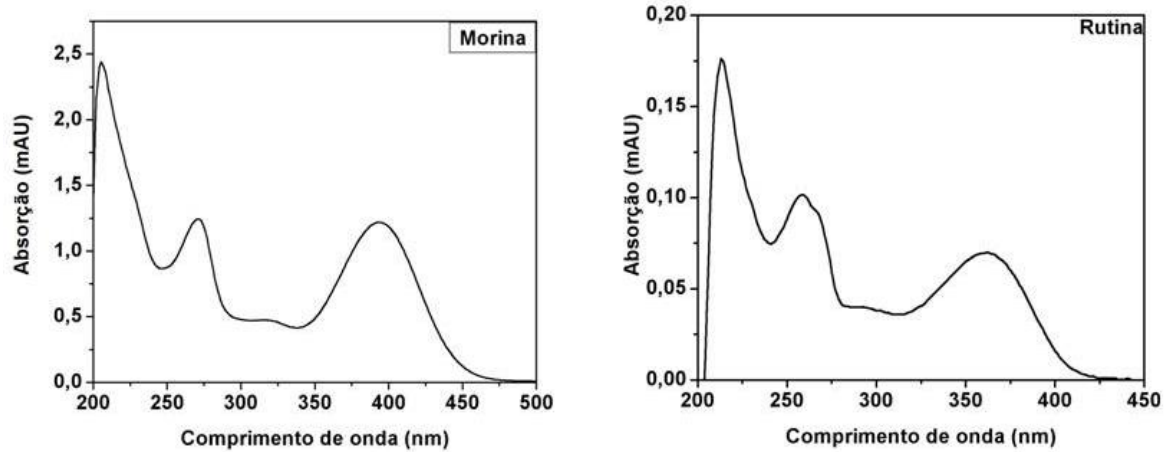


Figura 23: Espectro de absorção dos flavonoides Morina e Rutina. As duas moléculas apresentam, três picos de absorção característicos. Para Morina foi utilizado o pico de absorção em 271 nm, enquanto que para a Rutina foi utilizado o pico de absorção em 363 nm.

Para determinar a concentração estoque de Grb2, utilizou-se também o mesmo método, onde o pico de absorção utilizado foi em 280 nm, com o coeficiente de extinção molar de $38055 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, obtido do servidor ProtParam. O espectro de absorção de Grb2 é apresentado na Figura 24.

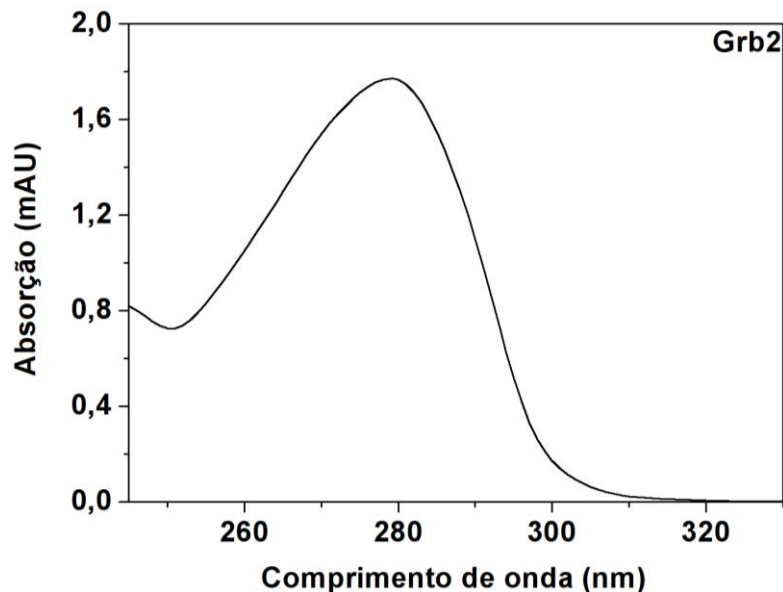


Figura 24: Espectro de absorção da proteína Grb2. A proteína Grb2, apresenta um pico de absorção característico de proteínas, em 280 nm. Para Grb2 foi utilizado este pico de absorção para determinar a sua concentração estoque.

4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A proteína Grb2 foi submetida a técnica de DSC, de tal forma que pudesse definir sua temperatura de melting (T_m) e, assim, escolher as temperaturas apropriadas para a técnica de fluorescência em estado estacionário, onde a proteína se encontraria em seu estado enovelado. O termograma obtido, está representado abaixo, na Figura 25.

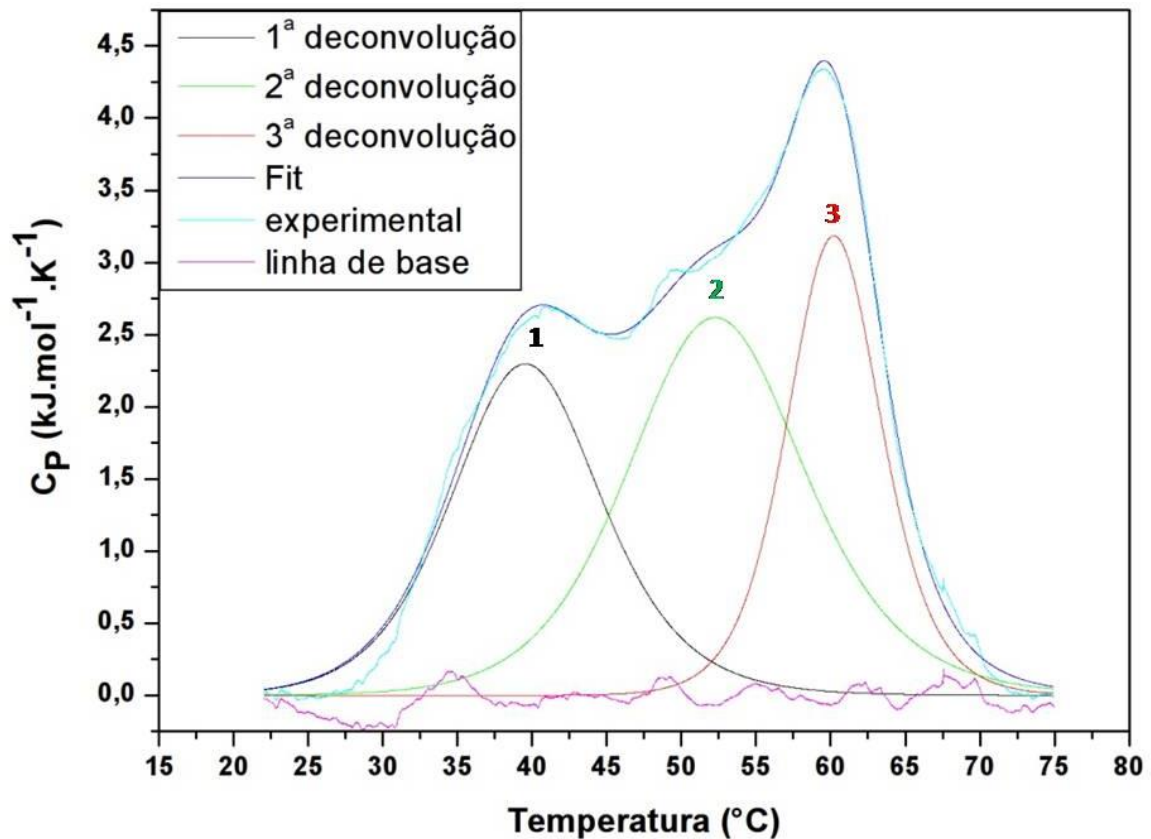


Figura 25: Termograma de desnaturação da proteína Grb2 obtido por calorimetria diferencial de varredura. As curvas de DSC para a proteína Grb2, foram obtidas entre 22-75 $^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Em rosa tem-se representada a linha de base, em azul claro a curva experimental obtida, com seu respectivo *fit* em azul escuro. Em preto tem-se a primeira deconvolução, em verde a segunda deconvolução e em vermelho a terceira deconvolução, com os respectivos picos, o que estaria correlacionado com os três domínios de Grb2.

O termograma da proteína Grb2 apresentou um pico endotérmico, que pode ser ajustado por três curvas gaussianas, seguindo o modelo de dois estados com fator de escala [110]. Essas curvas podem estar relacionadas com os três domínios da Grb2 (N-SH3-SH2-SH3-C), os quais podem apresentar diferentes estabilidades térmicas durante o processo de desnaturação da proteína. O primeiro pico apresenta temperatura de melting de 39,7 $^{\circ}\text{C}$, enquanto o segundo apresenta

em 52,4 °C e o terceiro em 60,2 °C. A entalpia de transição (ΔH) do primeiro pico é de 30,8 kJ/mol, enquanto o segundo apresenta um valor de 41,4 kJ/mol e o terceiro 26,8 kJ/mol. Pode-se notar, pelo termograma da Figura 25, que em torno de 28 °C, a proteína Grb2 já começa a apresentar uma fração de desenovelamento. Dessa forma, para a garantia de verificar a interação dessa proteína com os flavonoides em seu estado nativo, por fluorescência de estado estacionário, foram escolhidas as temperaturas de 18, 22 e 26 °C. Além disso, a proteína foi aplicada ao teste de reversibilidade, o que não foi observado.

4.4 Fluorescência em Estado Estacionário entre Grb2-Morina e Grb2-Rutina

A abertura das fendas de excitação e de emissão utilizada durante o experimentos foi de 0,5 nm. A solução de Grb2 foi excitada em 290 nm, e o espectro de emissão foi coletado na faixa de comprimentos de onda entre 300 a 500 nm, como pode ser visto na Figura 26. Realizaram-se os experimentos, Grb2-Morina e Grb2-Rutina, nas temperaturas de 291, 295 e 299 K, para determinar os parâmetros termodinâmicos da interação Grb2-flavonoides. A supressão de fluorescência da proteína na presença desses flavonoides é notável de acordo com a Figura 26.

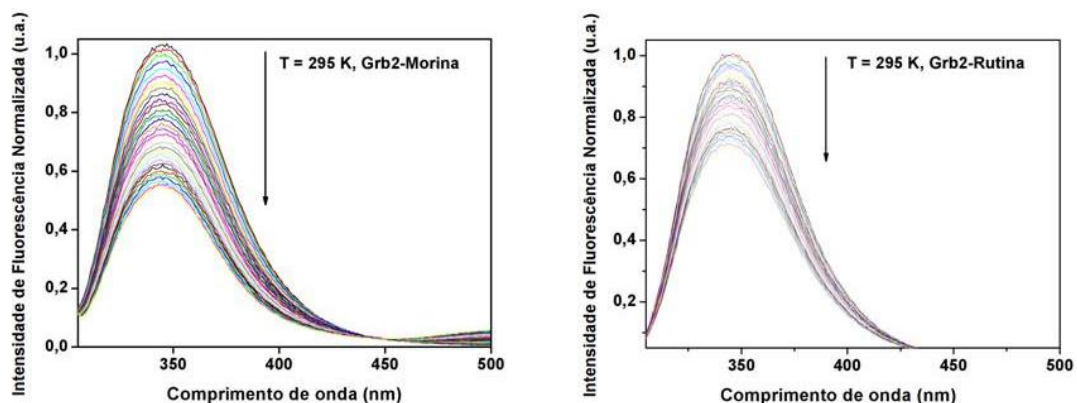


Figura 26: Espectro de emissão de fluorescência da proteína Grb2 na presença dos flavonóides na temperatura de 295K. Conforme titula-se os flavonoides (0 a 5,9 μM) a intensidade de fluorescência da proteína Grb2 (2 μM) diminui, como indica a seta, sugerindo uma provável interação de Grb2 com Morina e Rutina.

Os resultados de supressão de fluorescência mostrados, na Figura 26, indicam que há interação entre Grb2 e os flavonoides. A intensidade de fluorescência se

reduz a cada incremento na concentração dos flavonoides, Morina e Rutina. Assim quanto maior a concentração de flavonoide, no microambiente proteico próximo a resíduos de triptofanos, menos intensa torna-se a fluorescência da Grb2, indicando que há interação em regiões contendo esses resíduos [90-91]. Foi discutido no texto que a Grb2 contém dois triptofanos no domínio SH2, dois no domínio C-SH3 e um no domínio N-SH3, isso explica o fato de não haver supressão total no sistema, pois provavelmente os flavonoides estão interagindo com os triptofanos de um domínio da proteína, de tal forma que os outros emitem fluorescência, por não sentirem a presença do ligante [34].

Embora experimentos de supressão sejam simples, há vários problemas que podem ocorrer. Conforme a intensidade diminui a contribuição da fluorescência de fundo pode tornar-se significativa. Supressores são muitas vezes utilizados em altas concentrações, e eles em si podem conter impurezas fluorescentes. O efeito de filtro interno, devido à absorção, pode diminuir a intensidade de fluorescência aparente, e, assim, distorcer os dados de supressão [89]. Como os efeitos de filtro interno estão presentes, as intensidades de fluorescência observadas foram corrigidas, para não haver alterações nos valores das constantes de Stern Volmer.

Nos experimentos realizados, tanto a Morina quanto a Rutina foram preparadas em etanol absoluto, contudo o volume de etanol atingido para os sistemas Grb2-Morina e Grb2-Rutina não ultrapassou o valor de 3%, de tal forma que o volume atingido não desnaturasse a proteína, não alterando dessa maneira sua estrutura terciária, uma vez que valores acima de 10% de etanol podem causar pequenas alterações [111]. A Figura 27 demonstra que os valores de supressão obtidos estão de acordo com a equação de Stern-Volmer nas temperaturas estudadas de 291, 295 e 299 K, apresentando uma razão linear da intensidade de fluorescência da proteína na ausência e na presença dos flavonoides (F_0/F).

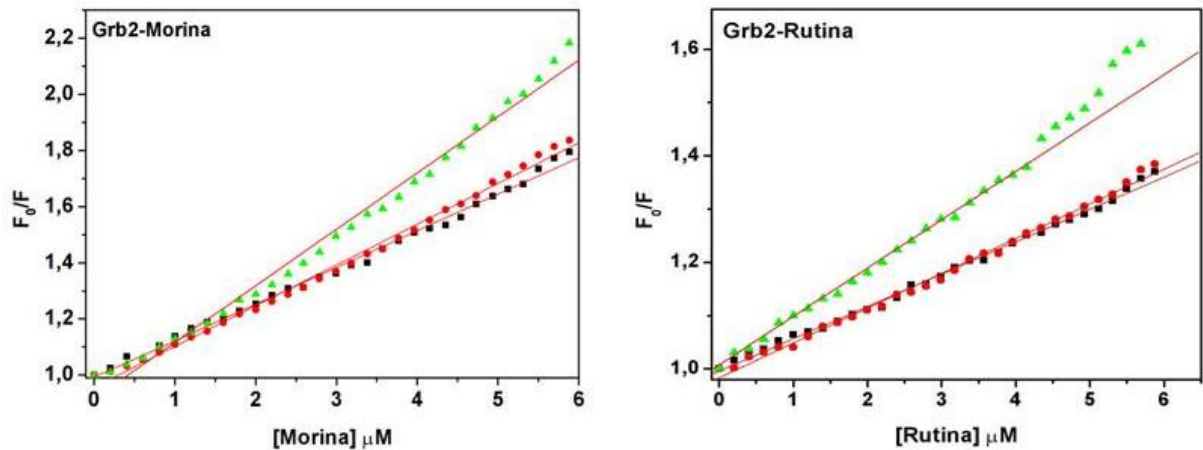


Figura 27: Gráfico de Stern-Volmer. Supressão da fluorescência de Grb2 nas temperaturas de 291 (preto), 295 (vermelho) e 299 K (verde), pelos flavonoides Morina e Rutina. Este gráfico indica um mecanismo de supressão dinâmico, onde a K_{sv} aumenta com a temperatura devido ao aumento no número de colisões dos flavonoides com os fluoróforos.

As constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) nas correspondentes temperaturas foram obtidas através de ajuste linear. Os valores das constantes de K_{sv} para o sistema Grb2-Morina e Grb2-Rutina, mostrados na Tabela 1 são diretamente proporcionais ao aumento de temperatura, o que indica a ocorrência do mecanismo de supressão do tipo dinâmico ou colisional.

Tabela 1: Constantes de supressão K_{sv} . Valores obtidos para os complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina nas temperaturas de 291 K, 295 K e 299 K.

Grb2-Morina			Grb2-Rutina		
	T (K)	$K_{sv} (10^5 M^{-1})$		T (K)	$K_{sv} (10^4 M^{-1})$
pH 8,0	291	$1,1 \pm 0,1$	pH 8,0	291	$3,3 \pm 0,2$
	295	$1,2 \pm 0,1$		295	$3,8 \pm 0,3$
	299	$1,7 \pm 0,1$		299	$6,0 \pm 0,6$

R= 0,996 (coeficiente de correlação) R=0,980 (coeficiente de correlação)

Pela Tabela 1, o sistema Grb2-Morina possui K_{sv} uma ordem de grandeza maior que o sistema Grb2-Rutina, resultando numa eficiência de supressão maior. O aumento da temperatura promove a diminuição da viscosidade do meio reacional favorecendo a difusão do supressor em direção ao fluoróforo no estado excitado. Dessa forma, para o mecanismo dinâmico, o aumento da temperatura induz a um aumento das colisões entre os fluoróforos excitados da proteína com os flavonoides

e, como consequência, observa-se o aumento da constante de supressão (K_{sv}) com a elevação da temperatura [89,91]. Observa-se que para maiores valores de concentração dos flavonoides, para a temperatura de 299 K, os pontos apresentam um pequeno desvio da linearidade, indicando haver também mecanismo de supressão do tipo estático nessa faixa de concentração e temperatura [89].

A partir dos dados de supressão da fluorescência da Grb2 pelos flavonoides, as constantes de associação K_a e o número de sítios de ligação (n) por proteína podem ser estimados, de acordo com a equação do duplo-log (17). Essa equação fornece uma relação logarítmica da razão da diferença entre a fração de proteína livre e ligada pela fração ligada em função da concentração de ligante. Na Figura 28, encontram-se os gráficos para Grb2 e os ligantes Morina e Rutina nas temperaturas de 291, 295 e 299 K, que foram ajustadas por essa equação.

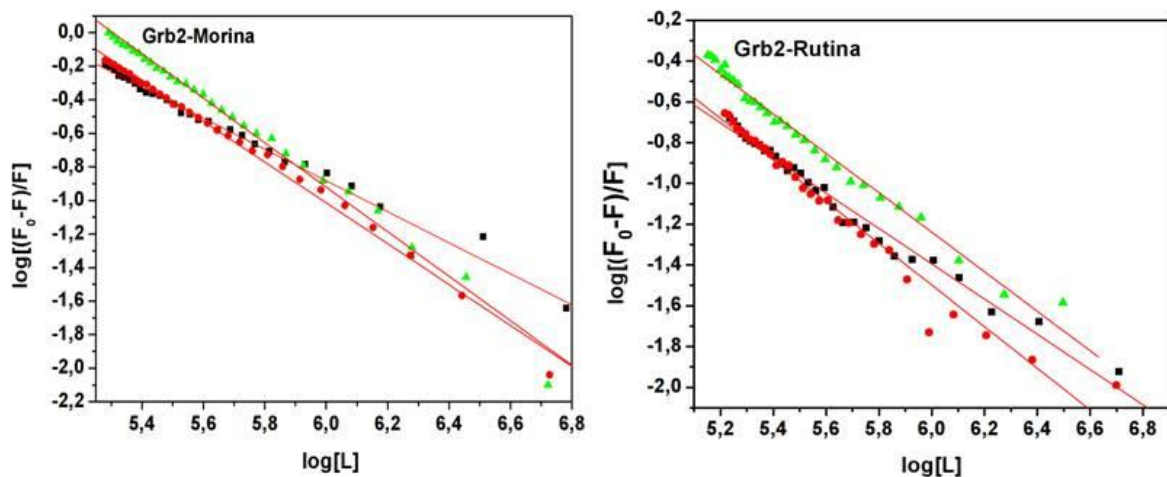


Figura 28: Gráfico duplo-log. Dados relativos ao efeito de supressão de fluorescência sofrido pela proteína Grb2 na presença de Morina e Rutina em temperaturas de 291 (preto), 295 (vermelho) e 299K (verde). A partir desse gráfico pode-se determinar o número de sítios de ligação (n) e a constante de associação K_a das interações estudadas.

Os valores de n e K_a para os sistemas Grb2-Morina e Grb2-Rutina são obtidos a partir da inclinação da reta ajustada e da intersecção das ordenadas, em 291, 295 e 299 K, respectivamente. Esses dados obtidos da análise de equilíbrio de ligação são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Número de sítios de ligação (n) e constante de associação (K_a). Valores referentes aos complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina em temperaturas de 291, 295 e 299K.

Grb2-Morina				Grb2-Rutina			
	T (K)	n	$K_a(10^5M^{-1})$		T (K)	n	$K_a(10^4M^{-1})$
pH 8,0	291	0,9±0,1	1,1±0,1	pH 8,0	291	0,9±0,1	2,4±0,3
	295	1,2±0,1	1,5±0,1		295	1,0±0,1	3,4±0,4
	299	1,3±0,1	2,0±0,2		299	1,0±0,1	5,3±0,7

R= 0,994 (coeficiente de correlação) R= 0,990 (coeficiente de correlação)

Analisando-se a Tabela 2, percebe-se que, para os dois complexos, o número de sítios de ligação é de aproximadamente 1 ligante/proteína. Já os valores de K_a aumentam com o aumento de temperatura, indicando uma maior estabilidade do complexo formado, levando os flavonoides a uma maior afinidade em uma cavidade mais interna da proteína, o que está de acordo com os dados anteriores da K_{sv} , seguindo essa mesma tendência de maior estabilidade. Além disso tanto o complexo Grb2-Morina quanto o complexo Grb2-Rutina, apresentam uma interação que é definida como moderada.

Buscando caracterizar o tipo predominante de interação existente nos dois sistemas, utilizou-se a equação de van't Hoff (18) para determinar os parâmetros termodinâmicos referentes aos complexos formados entre Grb2-Morina e Grb2-Rutina, a partir da constante de associação K_a de cada interação. A Figura 29 mostra o gráfico de van't Hoff para os dois sistemas estudados, em temperaturas de 291, 295 e 299 K. Fazendo-se o ajuste linear, obtiveram-se os parâmetros termodinâmicos para as temperaturas estudadas como a entalpia (ΔH), a partir do coeficiente angular da reta, e a entropia (ΔS), da intersecção das ordenadas (Figura 29).

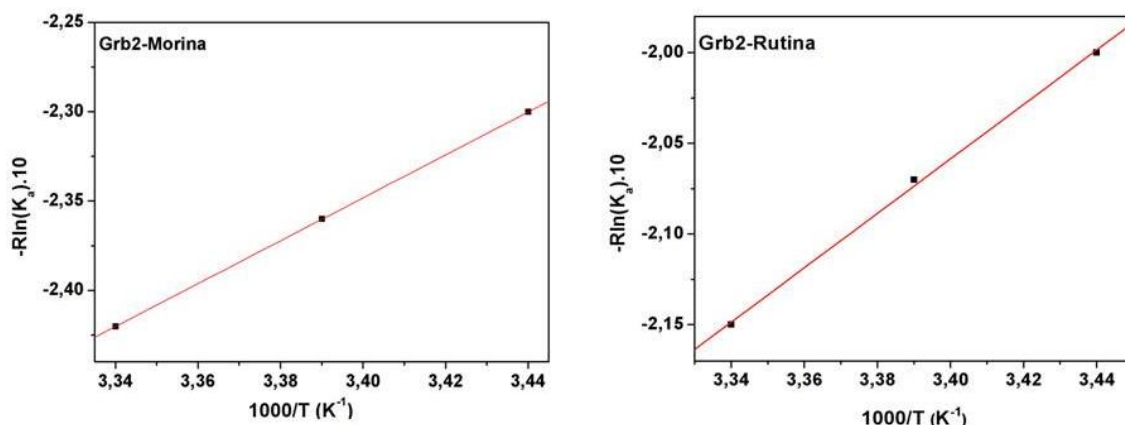


Figura 29: Gráfico de van't Hoff. Análise termodinâmica para os complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina, em três diferentes temperaturas (291, 295 e 299 K). O gráfico de van't Hoff relaciona a variação da constante de associação e a variação de temperatura, mediante a variação de entalpia. Esse gráfico permite obter parâmetros termodinâmicos das interações, como variação de entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS), fundamentais para caracterizar o tipo de interação predominante do sistema. Além disso, com esses parâmetros é possível obter a energia livre de Gibbs (ΔG) da interação.

Na Tabela 3 encontram-se os valores dos parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) determinados a partir do gráfico de van't Hoff, utilizando as equações (18 e 19).

Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos. Referentes aos complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina em temperaturas de 291, 295 e 299 K.

Grb2-Morina				
	T(K)	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$-T\Delta S(\text{kcal/mol})$
pH 8,0	291	$-6,4 \pm 0,4$		$-19,4 \pm 0,9$
	295	$-6,6 \pm 0,6$	$13,0 \pm 0,7$	$-19,6 \pm 1,2$
	299	$-6,9 \pm 0,7$		$-19,9 \pm 1,4$
Grb2-Rutina				
	T (K)	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$-T\Delta S(\text{kcal/mol})$
pH 8,0	291	$-5,8 \pm 0,5$		$-22,3 \pm 1,9$
	295	$-6,1 \pm 0,6$	$16,5 \pm 2,0$	$-22,6 \pm 2,3$
	299	$-6,4 \pm 0,8$		$-22,9 \pm 2,4$

Abaixo, podemos visualizar uma representação quantitativa do perfil Termodinâmico dos sistemas estudados (Figura 30).

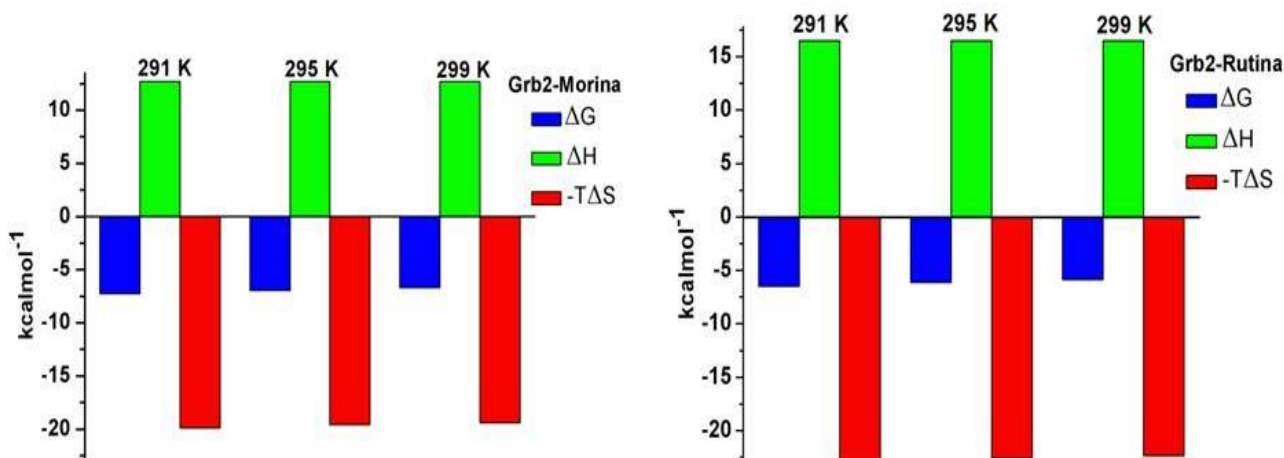


Figura 30: Perfil termodinâmico dos complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina em temperaturas de 291, 295 e 299 K. Em azul tem-se representado a variação da energia livre de Gibbs (ΔG), em verde a variação de entalpia (ΔH) e em vermelho a variação de entropia ($-T\Delta S$) dos dois sistemas. A partir desse perfil, pode-se identificar o tipo de interação predominante na formação dos complexos.

A variação de entalpia dos dois sistemas se mantém constante conforme a Tabela 3, uma vez que o intervalo de temperatura trabalhado não é apreciável. Em adição, os valores de ΔH são positivos, o que caracteriza uma reação endotérmica na qual a ligação entre os flavonóides e a proteína é desfavorecida, quanto maior for esse valor [112]. Já os valores de ΔG para os dois sistemas são negativos, o que mostra ser uma interação espontânea para os dois casos. O sistema Grb2-Morina tem um valor de ΔG que é ligeiramente menor do que para o sistema Grb2-Rutina, indicando que o primeiro sistema tem sua formação mais favorável que o segundo, de acordo com os valores de ΔH .

Na Tabela 3, os valores da contribuição entrópica para os dois sistemas são negativos devido ao sinal que esse termo carrega na equação (19). Nos dois complexos, as contribuições entrópicas e entálpicas são positivas, ou seja, com $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$. Os dois sistemas estudados, possuem essas características mencionadas, como mostra a literatura, sendo entropicamente dirigidos, o que caracteriza interações predominantemente hidrofóbicas [90-91]. Este resultado é esperado, uma vez que essas moléculas, utilizadas como ligantes, são apolares (embora a Rutina possua também uma região hidrofílica correspondente ao dissacarídeo). Como a proteína Grb2 encontra-se em solvente polar, a molécula de flavonoide tende a se encaixar em uma região de bolso hidrofóbico na proteína. Isso provavelmente gera uma pequena mudança conformacional, e expõe fragmentos apolares do interior proteico para o solvente, induzindo a reorganização das

moléculas de água do solvente ao redor da proteína e também dos flavonoides, maximizando a entropia, ocasionada por dois átomos apolares interagentes, ou seja, a aproximação de superfícies hidrofóbicas promove uma desorganização da camada de solvatação favorecendo a interação [91].

4.5 Ressonância Magnética Nuclear de Grb2 com Flavonoides

A proteína Grb2 possui uma massa molar que a torna apta para realizar experimentos de STD [100], devido a sua eficiente difusão de spin. Por essa característica é possível verificar a interação dos flavonoides com a Grb2 por transferência de magnetização e, portanto, corroborar os resultados de fluorescência de estado estacionário (Figura 26) que indicam interação desses flavonoides com Grb2.

Para o complexo Grb2-Morina, utilizaram-se 5 μM de Grb2 e 300 μM de Morina. A proteína foi saturada em -1 ppm em relação ao composto de referência TMS, em uma região na qual os flavonoides não apresentam sinais de ressonância. A partir dos resultados apresentados na Figura 31, é verificada a interação entre a Morina e a Grb2, devido à transferência de magnetização da proteína para o flavonoide.

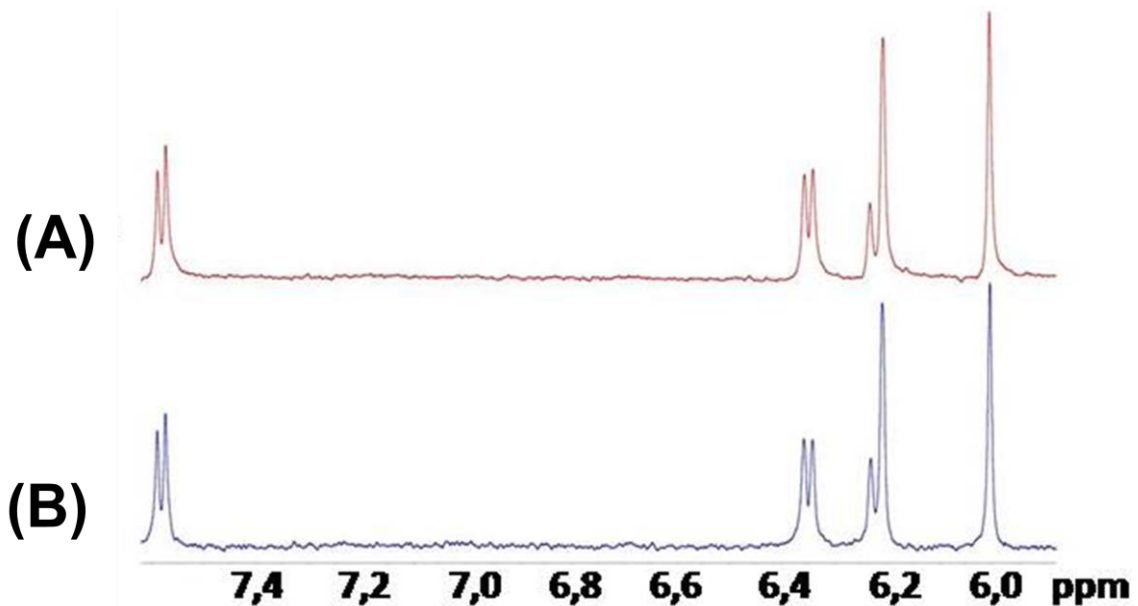


Figura 31: Espectro de STD do complexo Grb2-Morina. (A) O experimento de *off-resonance* (vermelho) é o experimento de referência que é obtido a partir de uma sequência de pulsos fora da região espectral estudada, na qual não há perturbação de nenhum sinal da proteína nem do ligante. (B) O experimento da diferença, *off-resonance – on-resonance* (azul) que mostra apenas os sinais da Morina que recebeu magnetização da Grb2. Os sinais do ligante mostram que há interação entre a Morina e a Grb2.

Pela Figura 31, pode-se afirmar que existe interação entre Grb2 e Morina. Isso acontece, pois após a proteína ser saturada, sua rede de hidrogênios acoplados dipolarmente propaga sua magnetização devido a difusão de spin. A Morina, que está próxima espacialmente da Grb2 sentirá esse efeito devido à relaxação intermolecular cruzada [97-98]. Cada pico nos espectros da Figura 31 representa hidrogênios específicos da Morina, que recebeu transferência de magnetização da Grb2 (na análise dos epítomos de interação, cada hidrogênio será assinalado ao seu pico correspondente de acordo com a estrutura química da Morina, como é verificado na literatura). Em vermelho, tem-se representado o espectro de *off-resonance*, que é o experimento de referência obtido a partir de uma sequência de pulsos fora da região espectral, na qual não há perturbação de nenhum sinal da proteína nem do ligante. Em azul, tem-se o espectro de diferença (*off-resonance – on-resonance*) que mostra apenas os sinais correspondentes aos hidrogênios da Morina que receberam transferência de magnetização. O STD confirma, então, a interação entre Grb2 e Morina conforme a fluorescência de estado estacionário já sugeria.

Para o complexo Grb2-Rutina, utilizaram-se as mesmas condições de concentração de proteína e de flavonoide que foram utilizadas no complexo Grb2-Morina. Além disso, a proteína foi saturada na mesma região em -1 ppm como para o sistema Grb2-Morina. Pela Figura 32, verifica-se também a interação entre Rutina e Grb2 como indicava a supressão de fluorescência, devido à transferência de Magnetização da Grb2 para a Rutina.

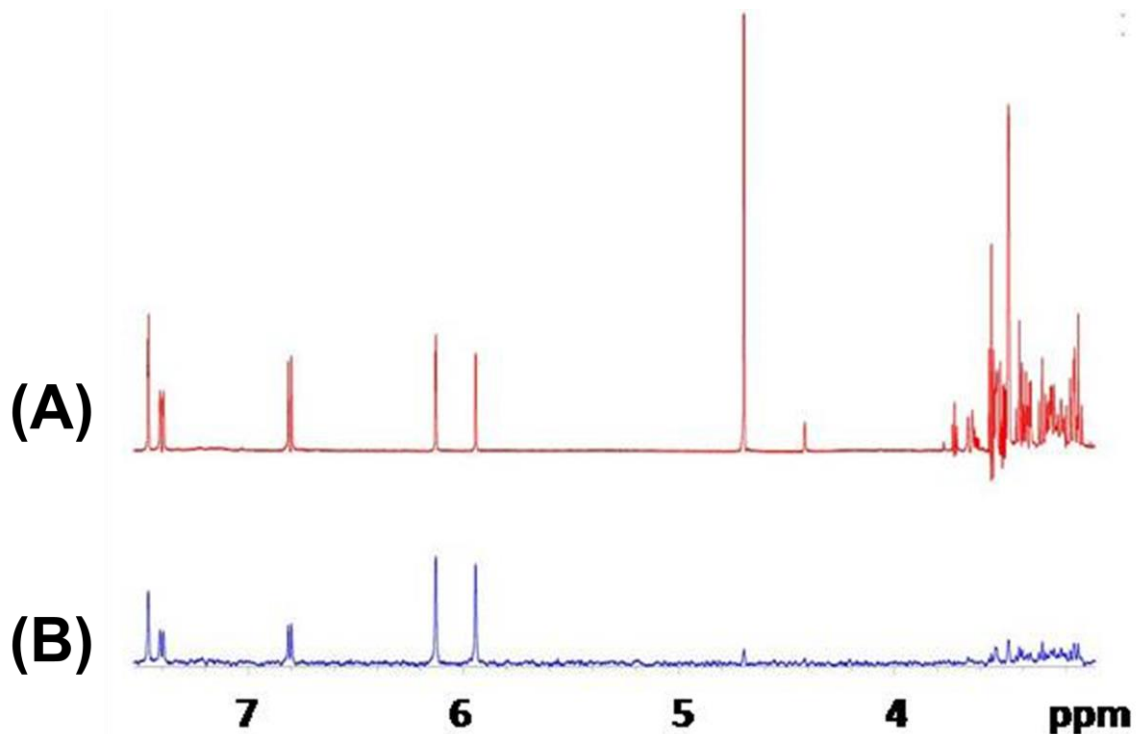


Figura 32: Espectro de STD do complexo Grb2-Rutina. (A) O experimento de *off-resonance* (vermelho) é o experimento de referência que é obtido a partir de uma sequência de pulsos fora da região espectral estudada, na qual não há nenhum sinal da proteína nem do ligante. (B) O experimento da diferença, *off-resonance* – *on-resonance*, (azul) que mostra apenas os sinais da Rutina que recebeu magnetização da Grb2. Os sinais do ligante mostram que há interação entre a Rutina e a Grb2.

Como no caso anterior, verificam-se apenas os picos correspondentes aos hidrogênios da Rutina que sofreram transferência de magnetização. Esses hidrogênios recebem a transferência de magnetização da proteína saturada. No sistema Grb2-Rutina é notável por volta de 3 ppm há uma região com picos muito próximos e praticamente indistinguíveis, devido à sobreposição dos hidrogênios dos dois açúcares que compõem a Rutina. Além disso, a transferência de magnetização da proteína é muito baixa para esses hidrogênios do açúcar [101,113-114].

Se a interação não ocorresse ou fosse muito forte, esses sinais seriam inexistentes. Quando não há interação, ocorre ausência de sinais porque a proteína não transfere magnetização para os flavonoides. Por outro lado, quando a interação é muito forte, o complexo proteína-ligante apresenta velocidade de dissociação lenta o que dificulta verificar o efeito de NOE [95,97,99].

Confirmada as interações por STD, conforme verificadas pelas Figura 31 e Figura 32, o objetivo agora é determinar os epítomos de interação dos flavonoides com a Grb2, ou seja, quais hidrogênios dessas moléculas que estão recebendo uma maior transferência de magnetização devido à saturação da proteína via difusão de spin. Assim, quanto mais intensa for essa transferência, mais orientado esse hidrogênio da molécula de ligante está da proteína, indicando quais regiões do flavonoide se ligam ou interagem mais orientado no bolso hidrofóbico da proteína, podendo-se entender o arranjo espacial de ligação entre eles [98,108].

Os cálculos dos epítomos são feitos a partir da razão entre o experimento de diferença (*off-resonance* - *on-resonance*) com o experimento de *off-resonance*, começa-se a partir do mapeamento das áreas dos picos correspondentes aos flavonoides. Todos os valores da integral da área dos picos calculados são divididos pelo maior valor e, posteriormente, multiplica-se por 100% [103]. Na Tabela 4, encontram-se os valores para os epítomos de interação do complexo Grb2-Morina com o hidrogênio correspondente a cada deslocamento químico [115], utilizando-se da equação (25).

Tabela 4: Determinação dos epítomos de interação do complexo Grb2-Morina. Tem-se representado na Tabela 4 o hidrogênio correspondente a cada deslocamento químico e seu respectivo epítomo.

Hidrogênio	δ (ppm)	Epítomos (%)
6	6.00	100
3'	6.23	92
6'	7.58	83
8	6.21	82
5'	6.35	79

Os dados da Tabela 4 mostram o quanto cada hidrogênio da Morina recebe a transferência de magnetização da proteína, indicando que o hidrogênio da

Morina o qual se liga mais orientado a Grb2 é o 6 (epítipo de 100%). No entanto, o hidrogênio 3' por apresentar o epítipo mais fraco indica estar menos orientado em relação à Grb2. Os dados apresentados são semelhantes a os existentes na literatura em que a Morina está livre e os deslocamentos químicos variam muito pouco, o que provavelmente ocorre devido ao fato de o solvente utilizado ser diferente [115].

A seguir, apresentamos a Figura 33, que permite uma visualização do que a Tabela 4 fornece sobre o sistema Grb2-Morina e seus epítipos de interação.

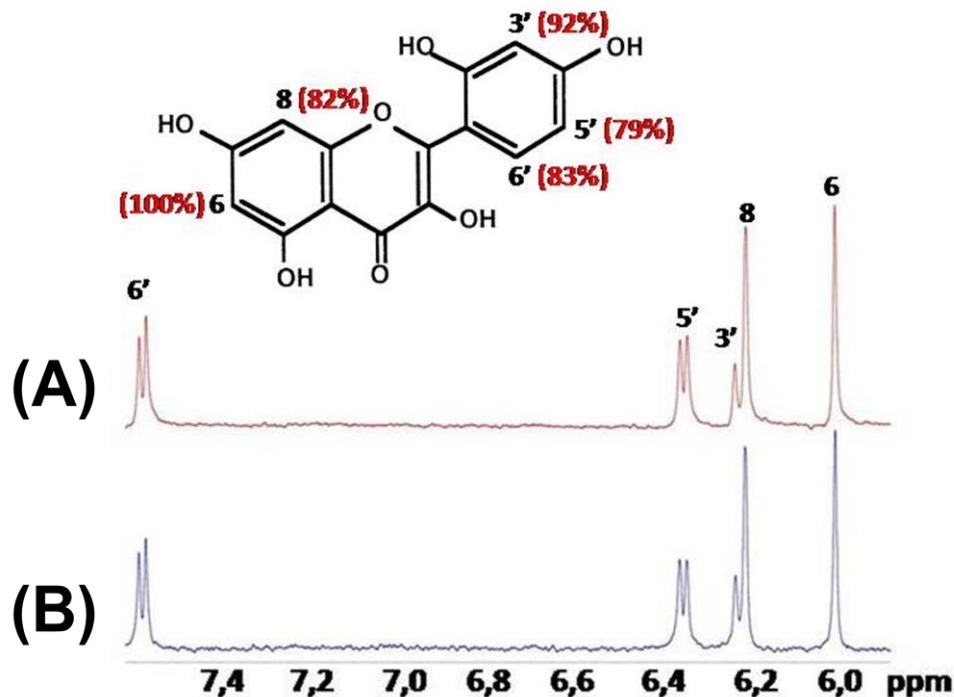


Figura 33: Epítipos de interação do complexo Grb2-Morina. Tem-se representado qual Hidrogênio da Morina é correspondente a cada pico no espectro. Além disso, tem-se representada a estrutura química da Morina, identificando os Hidrogênios nela (em preto) e a intensidade desses epítipos (em vermelho). Em (A) tem-se o espectro *off-resonance* e em (B) o espectro da diferença.

A Tabela 5 apresenta os valores determinados para os epítipos de interação do complexo Grb2-Rutina e os hidrogênios correspondentes [113-114].

Tabela 5: Determinação dos epítomos de interação do complexo Grb2-Rutina. Tem-se representado na Tabela 4 o hidrogênio correspondente a cada deslocamento químico e seu respectivo epítomo.

Hidrogênio	δ (ppm)	Epítomos (%)
1''	5.94	100
6	6.12	89
2'	7.46	50
5'	6.81	47
6'	7.40	46
8	6.79	43

Os resultados da Tabela 5 mostram o quanto cada Hidrogênio da Rutina recebe de transferência de magnetização da Grb2, o que indica que Hidrogênio 1'' da Rutina está mais orientado a Grb2 por ter o epítomo de 100%. O interessante, nesse caso, reflete-se no fato de esse Hidrogênio já fazer parte do grupo Rutinose da Rutina. Por outro lado, o Hidrogênio 8 apresenta o epítomo mais fraco, indicando estar menos orientado em relação à Grb2, enquanto não se observam sinais dos hidrogênios da glicosilação, o que pode ser explicado como causa de um impedimento estérico, onde esse dissacarídeo não se encaixaria no bolso hidrofóbico da proteína. Os resultados de assinalamento apresentados estão de encontro aos deslocamentos químicos que a literatura fornece em relação à Rutina [113]. Os deslocamentos químicos variam muito pouco, como para a Morina, o que provavelmente ocorre devido ao fato de o solvente utilizado ser diferente, como já discutido anteriormente [95].

A Figura 34, a seguir, permite visualizar o que traz a Tabela 5 acerca do complexo Grb2-Rutina, referente aos seus epítomos de interação.

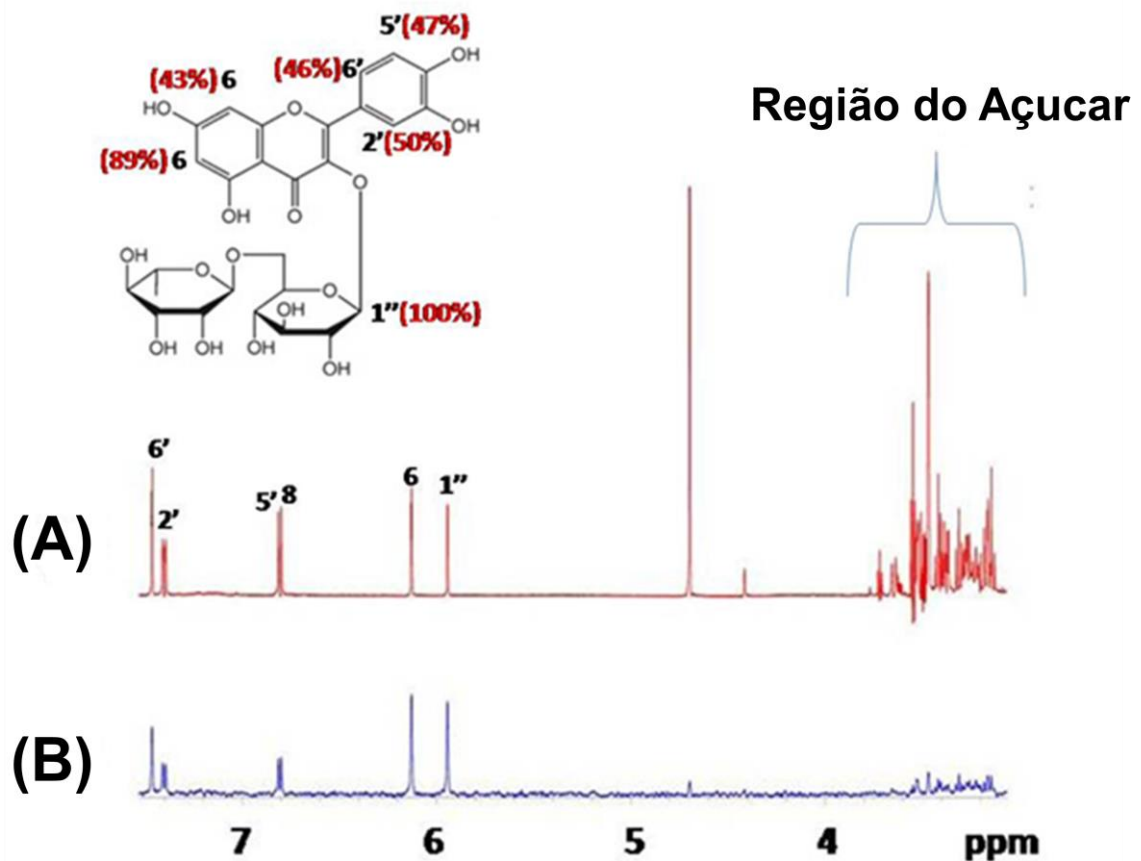


Figura 34: Epítomos de interação do complexo Grb2-Rutina. Tem-se representado qual Hidrogênio da Rutina é correspondente a cada pico no espectro. Além disso, tem-se representada a estrutura química da Rutina, identificando os Hidrogênios nela (em preto) e a intensidade desses epítomos (em vermelho). Em (A) tem-se o espectro *off-resonance* e em (B) o espectro da diferença.

Uma vez verificada a interação e determinado os epítomos de interação, buscou-se verificar a competição entre Morina e Rutina por Grb2, de tal forma que se possa determinar qual tem maior afinidade pela proteína. Dessa maneira, pode-se, assim, comparar esses resultados com os resultados de fluorescência em estado estacionário. A proteína estava em concentração de 5 μM , enquanto os flavonoides estavam numa concentração de 300 μM . É importante ressaltar o fato de as concentrações serem iguais para que as duas moléculas estejam em mesmas condições para competir pela proteína Grb2. Na Figura 35, nota-se a presença dos dois ligantes (em azul) como já era esperado, uma vez que os mesmos apresentavam individualmente interação com a Grb2.

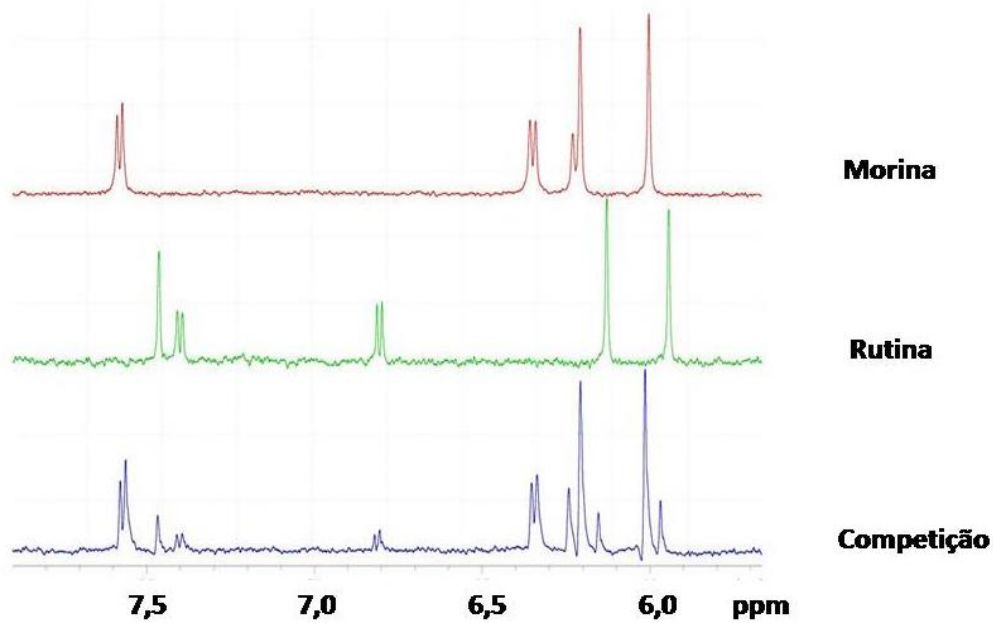


Figura 35: Espectros do experimento de competição dos flavonoides por Grb2. Em vermelho, o espectro de Morina. Em verde, de Rutina. Em azul, o espectro da competição no qual nota-se os picos dos dois flavonoides, ressaltando-se a interação que as duas moléculas apresentam por Grb2.

A Figura 32 mostra, em vermelho, o espectro de STD da Morina com Grb2 (Figura 31), em verde, o espectro de STD da Rutina com Grb2 (Figura 32) e em azul, o espectro com os sinais dos dois flavonoides competindo pela Grb2. Isso reafirma o STD das moléculas individualmente com Grb2 onde há interação, permitindo comparar os sinais delas individualmente com elas na competição a partir de suas posições em seus correspondentes deslocamentos químicos.

Cada pico correspondente a um epítipo de interação das moléculas, no dado deslocamento químico, no experimento de competição teve uma transferência de magnetização que alterou o valor determinado de A_{STD} individualmente [97], conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Transferência de magnetização dos hidrogênios dos flavonoides do espectro individual para o espectro de competição. Essa tabela mostra as diferenças das transferências de magnetização de cada molécula na ausência (individual) e na presença da outra (competição).

Flavonoide	Individual		Competição	
	δ (ppm)	(off-on)/off	δ (ppm)	(off-on)/off
Rutina	6.81	0,04952	6.82	0,04625
	6.79	0,04545	6.80	0,04174
	6.12	0,09438	6.14	0,08771
	7.46	0,05339	7.47	0,04949
	7.40	0,04947	7.40	0,05267
	5.94	0,10626	5.96	0,09609
Morina	6.00	0,16107	6.01	0,14078
	6.21	0,13219	6.20	0,12864
	6.35	0,12761	6.34	0,12756
	6.23	0,14859	6.24	0,13491
	7.58	0,13378	7.56	0,14818

Os resultados da Tabela 6 são importantes, pois mostram que um flavonoide na presença do outro afetam o A_{STD} de cada hidrogênio que os compõe. Além disso, permite visualizar que as transferências de magnetização da Morina são maiores do que as da Rutina, mostrando que a Grb2 tem maior afinidade pela Morina. A Tabela 7, fornece o quanto cada epítipo de cada molécula foi afetado na competição devido à diferença percentual existente.

Tabela 7: Diferença percentual dos epítomos. Essa tabela mostra o quanto cada hidrogênio das moléculas, foram afetados pela outra molécula na competição, a partir da diferença percentual do valor dos epítomos.

Flavonoide	Individual			Competição		Diferença dos epítomos (%)
	Hidrogênio	Epítopo (%)	δ (ppm)	Epítopo (%)	δ (ppm)	
Morina	6	100	6.00	95	6.01	5
	3'	92	6.23	91	6.24	1
	6'	83	7.58	100	7.56	17
	8	82	6.21	87	6.20	5
	5'	79	6.35	86	6.34	7
Rutina	1''	100	5.94	64	5.96	36
	6	89	6.12	59	6.14	30
	2'	50	7.46	33	7.47	17
	5'	47	6.81	31	6.82	16
	6'	46	7.40	35	7.40	11
	8	43	6.79	28	6.80	15

A Figura 36, a seguir, permite visualizar o que traz a Tabela 7 acerca da competição dos flavonoides pela Grb2, e quanto uma molécula afeta a interação da outra pela proteína.

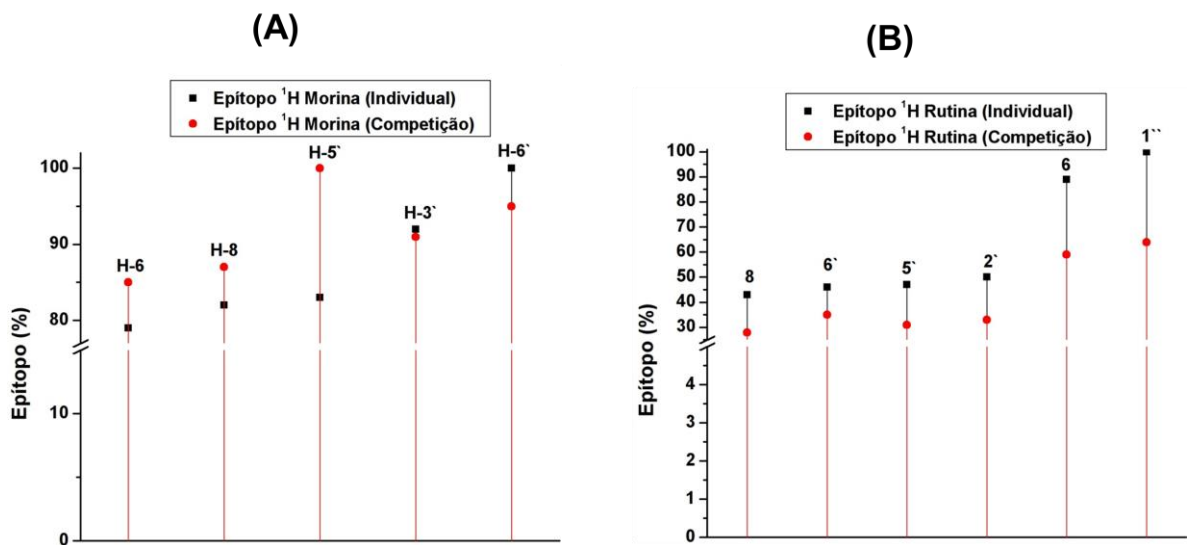


Figura 36: Gráfico de linhas. Representação da diferença percentual dos epítomos para Morina (A) e Rutina (B), individualmente (**preto**) e na competição (**vermelho**). Com esses dados, pode-se inferir que a Morina afeta mais a interação da Rutina pela Grb2, do que o contrário.

Para saber o quanto, de fato, uma molécula afetou a afinidade da outra pela Grb2, soma-se o produto dos epítomos individuais da molécula com a proteína, pela diferença percentual da competição em relação a interação individual e divide-se pela soma dos epítomos individuais, como fator de ponderação. Finalmente multiplica-se por 100%, para se ter o valor efetivo do quanto a interação na ausência do outro competidor foi afetada. De forma matemática, tem-se:

$$I_{af} = \frac{\sum \text{Epit. transf}}{\sum \text{Epit}} 100\% \quad (26)$$

sendo que I_{af} é a interação afetada para cada flavonoide na presença do outro. Essa equação é uma proposta de análise, para verificar o quanto de ligante deixa de se ligar percentualmente devido à presença da outra molécula. Pela equação (26) mensura-se, o quanto a interação de uma molécula com a Grb2 foi afetada na presença da outra.

Pelos cálculos realizados, vemos que a interação do complexo Grb2-Morina de 100%, que representa seu total individual, na competição reduziu-se para 93,2%, isso mostra que a Rutina afeta em 6,8% a interação da Morina com Grb2. Já a interação do sistema Grb2-Rutina de 100% individual na competição reduziu-se

para 75,9%, mostrando que a Morina afeta em 24,1% a interação da Rutina com Grb2. Logo, a Morina é menos afetada, pois apresenta uma queda percentual da ordem de três vezes menor que a Rutina. Esses dados corroboram os obtidos por fluorescência onde a Morina apresenta maior afinidade pela Grb2, possuindo preferência em se ligar em uma região de cavidade da proteína com predominância por interações hidrofóbicas. No mais, os dois flavonoides possuem características que os potencializam ao desenvolvimento de fármacos, a partir da caracterização por fluorescência da interação deles com a Grb2 confirmada por STD. A Morina, a princípio, apresenta vantagem por ter uma ligação mais específica pela proteína e ser termodinamicamente mais estável, conforme mostram os parâmetros termodinâmicos obtidos da fluorescência.

4.6 Estudos computacionais de interação entre Grb2 e os flavonoides Morina e Rutina

Esse trabalho também está iniciando estudos de *Docking* Molecular, com o intuito, de obter informações a respeito de qual domínio e/ou domínios de Grb2 estaria ocorrendo interações com os flavonoides, no qual um conjunto de métodos computacionais, que envolve *Docking* e Dinâmica Molecular, foram realizados em colaboração com o grupo do Professor Dr. Leandro Cristante de Oliveira e seu aluno Raphael Vinicius Rodrigues Dias. A ligação de pequenas moléculas em macromoléculas, é o alvo de vários processos biológicos, que quando entendidos, auxilia no desenvolvimento de novos fármacos, baseado em estrutura [116-118]. Esse trabalho visa identificar qual domínio da proteína Grb2 interage com essas moléculas, levando em consideração os dados experimentais obtidos por RMN [119]. Essas simulações foram feitas com a proteína inteira interagindo com os ligantes. Foram feitos *Docking* com os ligantes Morina e Rutina, onde indica interação dessas moléculas preferencialmente com o domínio SH2. A Figura 36 destaca Morina e Rutina interagindo como domínio SH2 de Grb2.

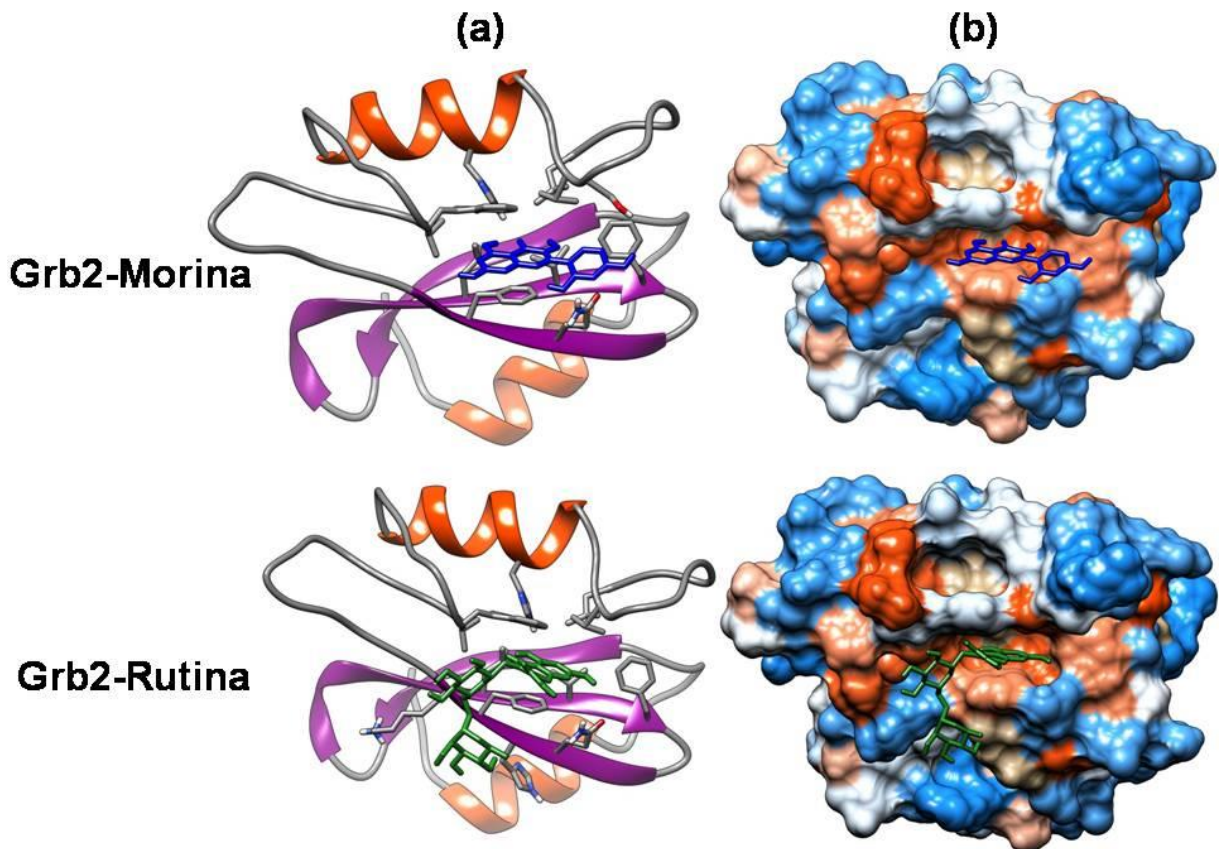


Figura 37: Docking Molecular entre Grb2 com Morina e Rutina. Estes resultados foram obtidos pelo aluno de Pós-Graduação, em Biofísica Molecular, Raphael Vinicius Rodrigues Dias, a partir de simulações computacionais, utilizando-se os programas Chimera e Dock6, entre a proteína Grb2 e as moléculas. Na figura, o domínio SH2, onde ocorre a interação, foi cortado para uma melhor visualização. (a) Representação em *Cartoon* da moléculas ligando-se ao domínio SH2 da proteína Grb2. Nessa representação, a Morina está destacada de azul e a Rutina em verde, para uma melhor identificação delas na proteína (b) Representação em *surface*, colorida por hidrofobicidade, das moléculas ligando-se ao domínio SH2 da proteína Grb2. Nessa representação, a cor laranja na proteína, indica regiões hidrofóbicas, que são predominantes onde as moléculas se ligam, a cor azul representa regiões hidrofílicas e em branco os dois tipos.

Esses resultados de *Docking Molecular* foram obtidos da interação da proteína com Morina e Rutina e nos guia para realizarmos experimentos de fluorescência e RMN, com esse domínio, na presença dessas moléculas e confirmar se é realmente nele que ocorre a interação. Esses resultados estão de acordo com o obtido na fluorescência de estado estacionário, que indicava uma interação hidrofóbica, entre os flavonoides com a Grb2, uma vez que essas moléculas se ligam em uma região predominantemente hidrofóbica da proteína. No complexo Grb2-Rutina, é notável que o dissacarídeo da Rutina, não consegue se encaixar no

bolso hidrofóbico da proteína, como consequência de impedimento estérico como suposto anteriormente, para explicar a não interação da região de açúcar com a Grb2 por RMN. Além disso, resultados de Dinâmica Molecular mostra haver mudanças conformacionais na proteína devido à interação desses flavonóides, o que está de acordo com os parâmetros termodinâmicos na fluorescência em estado estacionário.

Uma forma de detalhar os resíduos envolvidos na interação, é a partir do programa LigPlot. Este programa permite identificar quais resíduos da proteína interagem com a molécula e que tipo de interação está envolvida, entre elas, a partir de um arquivo de entrada do PDB, gerando esquemas bidimensionais dos complexos proteína-ligante [62,120]. A Figura 37 destaca os resíduos que interagem com Morina e Rutina e quais as interações envolvidas.

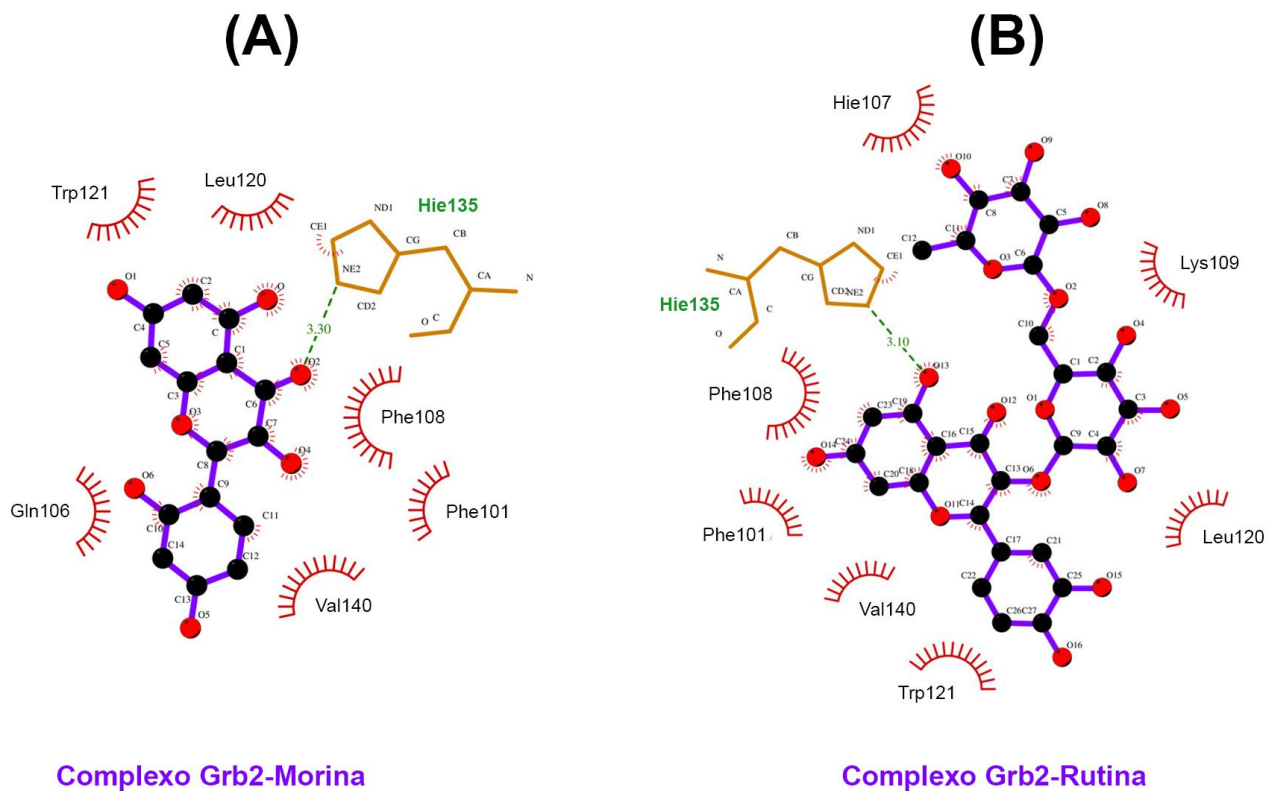


Figura 38: LigPlot dos complexos Grb2-Morina e Grb2-Rutina. Estes resultados foram obtidos pelo aluno de Pós-Graduação, em Biofísica Molecular, Raphael Vinicius Rodrigues Dias, a partir de simulações computacionais, utilizando-se o programa LigPlot. Os cílios em vermelho, representam os resíduos que fazem interação hidrofóbica com as moléculas; as linhas em verde, representam as ligações de hidrogênios dos resíduos que interagem com as moléculas em amarelo. (a) Para o complexo Grb2-Morina, ocorre interações hidrofóbicas entre a Morina e os resíduos Val140, Phe108, Phe101, Gln106, Val40, Leu120 e Trp121, já o resíduo His35, faz ligação de hidrogênio e também interação hidrofóbica com a Morina. (b) Para o complexo Grb2-Rutina, ocorre interações hidrofóbicas entre a Rutina e os resíduos His107, Lys109, Leu120, Trp121, Val140, Phe101 e Phe108, já o resíduo His35, faz ligação de hidrogênio e também interação hidrofóbica com a Rutina. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos experimentalmente por fluorescência e RMN.

Os cílios em vermelho representam os resíduos que fazem interação hidrofóbica com as moléculas; as linhas em verde representam as ligações de hidrogênios dos resíduos que interagem com as moléculas em amarelo, no caso a Histidina 135, que acarreta em uma maior estabilização desses complexos. Nota-se, ainda para a Rutina, que essa mesma Histidina serve para a molécula se ancorar na proteína e posteriormente encaixar-se em seu bolso hidrofóbico. Além disso, o resultado da Figura 38 está de acordo com os dados de epítomos de interação por STD, já o Trp121 é o fluoróforo do domínio SH2 que provavelmente sofre o mecanismo de supressão colisional devido a interação dos flavonoides, enquanto o Trp60 sofre o mecanismo estático, que fica mais evidente em maiores concentrações em temperatura de 299 K .

Finalmente, é apresentada a seguir, a Figura 38, a qual mostra a Morina e a Rutina se ligando no mesmo sítio da proteína Grb2. Nesta figura, a Morina se encontra mais próxima da Grb2 do que a Rutina, o que acarreta em uma maior afinidade da primeira do que a segunda pela proteína, sustentada pela energia livre obtida de cada complexo e a energia do próprio complexo, dada pela relação [120]:

$$\Delta G = E_{\text{complexo}} - (E_{\text{ligante}} + E_{\text{receptor}}) \quad (27)$$

o que corrobora os dados de fluorescência em estado estacionário e de RMN. Nesse caso, E_{complexo} é a energia do complexo (proteína+ligante), E_{ligante} é a energia individual de cada ligante e E_{receptor} é a energia do receptor, no caso a Grb2.

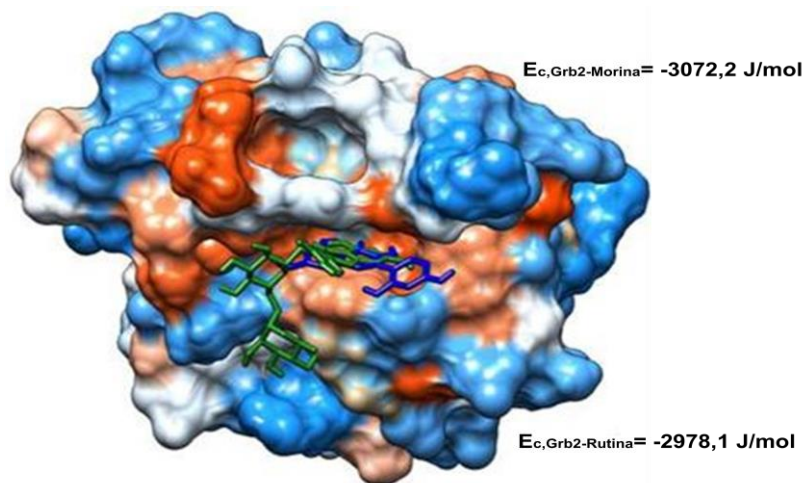


Figura 39: Representação da sobreposição de Morina e Rutina, em *surface*. Esses resultados foram obtidos pelo aluno de Pós-Graduação, em Biofísica Molecular, Raphael Vinicius Rodrigues Dias, a partir de simulações computacionais, utilizando-se os programas Chimera e Dock6, entre a proteína Grb2 e as moléculas. Na figura, o domínio SH2, onde ocorre a interação, foi cortado para uma melhor visualização. A proteína está representada em *surface*, onde a Morina em azul, encontra-se mais “encaixada” no bolso hidrofóbico dela, em relação a Rutina em verde, corroborando os resultados, acerca da maior afinidade de pela Morina, por RMN e fluorescência em estado estacionário.

5- Conclusões e Trabalhos Futuros

A proteína Grb2 até o ano de 2012, era considerada apenas uma adaptadora, e foi verificado nesse mesmo ano, que ela atua como uma reguladora de processos de sinalização celular da FGFR2. O fato dela apresentar uma certa diversidade de funções dentro da célula, interagindo com muitas outras moléculas dentro da célula, interagindo com pequenas moléculas, que possuem atividade antitumoral comprovada na faixa de micromolar (que é a mesma faixa de concentração da proteína HSA, que é sabidamente uma proteína transportadora) [121-122], levantam a hipótese de que a Grb2 poderia ser também uma proteína transportadora, levando moléculas anticarcinogênicas que bloqueiam o desenvolvimento do câncer devido a alguma mutação ou sinalização aberrante de FGFR2. Contudo, como não existem evidências disso, essa hipótese precisa ser comprovada experimentalmente. Nesse sentido, buscou-se caracterizar a interação da Grb2 com duas moléculas com tais características, Morina e Rutina, com técnicas espectroscópicas como fluorescência em estado estacionário e RMN.

Por fluorescência, nota-se para os dois sistemas que o tipo de supressão mais provável é do tipo dinâmico, com a K_{sv} sendo da ordem de 10^5 M^{-1} para o complexo Grb2-Morina e da ordem de 10^4 M^{-1} para Grb2-Rutina. Nossos estudos mostram, que Morina suprime com mais eficiência a intensidade de fluorescência de Grb2 do que a Rutina. A supressão da Grb2 não é total na presença das moléculas, o que indica que elas se ligam em um domínio, suprimindo os sinais de fluorescência dos triptofanos dessa região enquanto os outros ficam livres para fluorescerem normalmente.

Foram obtidos o número de sítios de ligação de ligante por proteína (n) e a constante de associação (K_a). Nos dois sistemas, temos o número de sítios de 1:1 (ligante/proteína). A constante de associação é da ordem de 10^5 para o complexo Grb2-Morina e de 10^4 M^{-1} para o sistema Grb2-Rutina o que vai de encontro ao valor da constante de Stern-Volmer. Com o aumento de temperatura a K_a aumenta, o que dá maior estabilidade para essas duas interações. A K_a é moderada [104], o que é extremamente vantajoso para a hipótese levantada no presente trabalho, já que interações fracas ou muito fortes retirariam o potencial desenvolvimento de fármacos mais eficazes a partir da interação de Grb2 com Morina e Rutina.

Os valores da energia livre de Gibbs nos dois sistemas são menores que zero ($\Delta G < 0$), indicando uma interação espontânea, podendo-se concluir que a formação do complexo Grb2-Morina é mais favorável termodinamicamente que o complexo Grb2-Rutina. As contribuições energéticas devido à variação de entalpia e à variação de entropia são maiores que zero ($\Delta H > 0$ e $T\Delta S > 0$), esses parâmetros indicam que nos dois complexos as interações são entropicamente dirigidas caracterizando interações predominantemente hidrofóbicas.

Com dados obtidos por STD, corroboram-se os dados de fluorescência em estado estacionário em que os flavonoides, de fato, interagem com a proteína Grb2, fato verificado por duas técnicas diferentes. De posse dessa informação, pode-se determinar os epítomos de interação e identificar qual Hidrogênio dessas moléculas sofre maior transferência de saturação da Grb2. Para a interação Grb2-Morina, identificou-se que o epítomo de 100% é o Hidrogênio 6, já para a interação Grb2-Rutina o epítomo de 100% é o Hidrogênio 1". Isso mostra qual é a região em que esses hidrogênios dos flavonoides estão mais orientados à proteína, o que nos permite entender como eles se ligam à Grb2, a nível molecular, auxiliando o *Docking*, verificando, assim, quais resíduos coordenam as interações e também possíveis mudanças conformacionais, que a proteína sofre para acomodar os flavonoides em sua estrutura.

Foi feita a competição dessas moléculas para analisar qual delas tem maior afinidade pela proteína. Corroborando com os dados de fluorescência, a Morina mostra uma maior afinidade pela Grb2 que a Rutina. Além disso, a Morina interfere mais na interação entre Grb2 e Rutina, em torno de três vezes mais, do que a Rutina interfere a interação de Grb2 com Morina.

Através de estudos de *Docking* Molecular, pode-se reafirmar a natureza predominantemente hidrofóbica de interação desses flavonoides com a Grb2 e a afinidade preferencial da proteína por Morina. Pode-se também verificar a preferência de ligação dessas moléculas com o domínio SH2 de Grb2.

Como perspectivas de trabalhos futuros pretendemos cristalizar a proteína Grb2 e domínios com essas moléculas, com intuito de confirmar em qual domínio da Grb2 ocorre a interação e se isso corrobora com dados obtidos previamente através de *Docking* Molecular. Pretendemos ainda realizar experimentos de fluorescência e RMN com o propósito de estudar possíveis mudanças conformacionais induzidas pela interação desta proteína/domínio com Morina e Rutina. Por fim, pretendemos

realizar estudos metabôlômicos via RMN, desses flavonoides em células cancerígenas e verificar em que vias de sinalização celular eles atuam.

6- Referências Bibliográficas

- 1- LEHNINGER, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, **Principles of biochemistry**. 2 nd ed. 1993.
- 2- STRYER, L., **Biochemistry**. 4th ed. 1999, New York: W.H. Freeman.
- 3- KRAUSS, Gerhard. *Biochemistry of signal transduction and regulation*. **John Wiley & Sons**, 2006.
- 4- GRIFFIN, James E.; OJEDA, Sergio R. **Textbook of endocrine physiology**. Oxford University Press, 1992.
- 5- BRIDGES, Alexander J. Chemical inhibitors of protein kinases. **Chemical reviews**, v. 101, n. 8, p. 2541-2572, 2001.
- 6- VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.
- 7- ENGH, Richard A.; BOSSEMEYER, Dirk. The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation-targets for therapeutic intervention. **Advances in enzyme regulation**, v. 41, n. 1, p. 121-149, 2001.
- 8- WÜNSCH, Filho V.; MONCAU, J. E. C. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Rev Assoc Med Bras**, v. 48, n. 3, p. 250-7, 2002.
- 9- NARAYANA, Narendra et al. Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. **Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2367-2376, 1999.
- 10- KOIDE, Kazunori et al. Molecular design and biological activity of potent and selective protein kinase inhibitors related to balanol. **Chemistry & biology**, v. 2, n. 9, p. 601-608, 1995.
- 11- EGAN, Sean E. et al. Association of SosRas exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. 1993.
- 12- GARTSIDE, Michael G. et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 41-54, 2009.
- 13- SCHÜLLER, Annika C. et al. Indirect recruitment of the signalling adaptor Shc to the fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2). **Biochemical Journal**, v. 416, n. 2, p. 189-199, 2008.

- 14- PLOTNIKOV, Alexander N. et al. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. **Cell**, v. 98, n. 5, p. 641-650, 1999.
- 15- AHMED, Zamal et al. Direct binding of Grb2 SH3 domain to FGFR2 regulates SHP2 function. **Cellular signalling**, v. 22, n. 1, p. 23-33, 2010.
- 16- TRÜB, Thomas et al. The role of a lymphoid-restricted, Grb2-like SH3-SH2-SH3 protein in T cell receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 894-902, 1997.
- 17- KOUHARA, H. et al. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 693-702, 1997.
- 18- ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 16, n. 2, p. 139-149, 2005.
- 19- KURIYAN, John; COWBURN, David. Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 26, n. 1, p. 259-288, 1997.
- 20- SCHUBBERT, Suzanne; SHANNON, Kevin; BOLLAG, Gideon. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 295-308, 2007.
- 21- BUDAY, László; DOWNWARD, Julian. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 611-620, 1993.
- 22- TRÜB, Thomas et al. The role of a lymphoid-restricted, Grb2-like SH3-SH2-SH3 protein in T cell receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 894-902, 1997.
- 23- AHMED, Zamal et al. Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 493-504, 2013.
- 24- SU, Jing; YANG, Liang-Tung; SAP, Jan. Association between Receptor Protein-tyrosine Phosphatase RPTP α and the Grb2 Adaptor DUAL Src HOMOLOGY (SH) 2/SH3 DOMAIN REQUIREMENT AND FUNCTIONAL CONSEQUENCES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 45, p. 28086-28096, 1996.

- 25- TARI, Ana Maria et al. Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in ErbB2, cells. **Oncogene**, v. 18, n. 6, p. 1325-1332, 1999.
- 26- POLLOCK, P. M. et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. **Oncogene**, v. 26, n. 50, p. 7158-7162, 2007.
- 27- LIN, Chi-Chuan et al. Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2. **Cell**, v. 149, n. 7, p. 1514-1524, 2012.
- 28- NIOCHE, Pierre et al. Crystal structures of the SH2 domain of Grb2: highlight on the binding of a new high-affinity inhibitor. **Journal of molecular biology**, v. 315, n. 5, p. 1167-1177, 2002.
- 29- GRAM, Hermann et al. Identification of phosphopeptide ligands for the Src-homology 2 (SH2) domain of Grb2 by phage display. **European Journal of Biochemistry**, v. 246, n. 3, p. 633-637, 1997.
- 30- Goudreau, N., et al. "NMR structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 and its complex with a proline-rich peptide from Sos." **Nature Structural & Molecular Biology**, v1, n12 (1994): 898-907.
- 31- MIGNAN, Sebastien et al. Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. **Science**, v. 268, n. 5208, p. 291, 1995.
- 32- MCPHERSON, Peter S. et al. Interaction of Grb2 via its Src homology 3 domains with synaptic proteins including synapsin I. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 14, p. 6486-6490, 1994.
- 33- CHARDIN, Pierre et al. The Grb2 adaptor. **FEBS letters**, v. 369, n. 1, p. 47-51, 1995.
- 34- LOWENSTEIN, E. J. et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 431-442, 1992.
- 35- CHARDIN, Pierre et al. The Grb2 adaptor. **FEBS letters**, v. 369, n. 1, p. 47-51, 1995.
- 36- COHEN, George B.; REN, Ruibao; BALTIMORE, David. Modular binding domains in signal transduction proteins. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 237-248, 1995.

- 37- CUSSAC, Didier; FRECH, Matthias; CHARDIN, Pierre. Binding of the Grb2 SH2 domain to phosphotyrosine motifs does not change the affinity of its SH3 domains for Sosproline-rich motifs. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 17, p. 4011, 1994.
- 38- PAWSON, Tony; SCOTT, John D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science**, v. 278, n. 5346, p. 2075-2080, 1997.
- 39- PAWSON, Tony; NASH, Piers. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. **Science**, v. 300, n. 5618, p. 445-452, 2003.
- 40- YAFFE, Michael B. Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 3, n. 3, p. 177-186, 2002.
- 41- PAWSON, T.; SCHLESSINGERT, J. SH2 and SH3 domains. **Current Biology**, v. 3, n. 7, p. 434-442, 1993.
- 42- ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**, 4th edn (New York: Garland Science). 2002.
- 43- DEN HERTOOG, Jeroen; HUNTER, Tony. Tight association of GRB2 with receptor protein-tyrosine phosphatase alpha is mediated by the SH2 and C-terminal SH3 domains. **The EMBO journal**, v. 15, n. 12, p. 3016, 1996.
- 44- FERREON, Josephine C. et al. Solution structure, dynamics, and thermodynamics of the native state ensemble of the Sem-5 C-terminal SH3 domain. **Biochemistry**, v. 42, n. 19, p. 5582-5591, 2003.
- 45- BRYANT, M. R. et al. Phosphorylation and lipid raft association of fibroblast growth factor receptor-2 in oligodendrocytes. **Glia**, v. 57, n. 9, p. 935-946, 2009.
- 46- PENDERGAST, Ann Marie et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. **Cell**, v. 75, n. 1, p. 175-185, 1993.
- 47- MATUOKA, Koozi et al. Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 19, p. 9015-9019, 1992.

- 48- PAWSON, Tony; GISH, Gerald D.; NASH, Piers. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. **Trends in cell biology**, v. 11, n. 12, p. 504-511, 2001.
- 49- BELOV, Artur A.; MOHAMMADI, Moosa. Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling. **Science signaling**, v. 5, n. 249, p. pe49, 2012.
- 50- KUNII, Kaiko et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and ErbB3 signaling for growth and survival. **Cancer research**, v. 68, n. 7, p. 2340-2348, 2008.
- 51- AHMED, Zamal et al. Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. **Nature communications**, v. 6, 2015.
- 52- ATTOUB, Samir et al. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. **European journal of pharmacology**, v. 651, n. 1, p. 18-25, 2011.
- 53- BLOEM, Ken A.; DUFFEY, Sean S. Interactive effect of protein and rutin on larval *Heliothis zea* and the endoparasitoid *Hyposoter exiguus*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 54, n. 2, p. 149-161, 1990.
- 54- CAZAROLLI, Luisa H. et al. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1429-1440, 2008.
- 55- AMADO, Nathália G. et al. Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life sciences**, v. 89, n. 15, p. 545-554, 2011.
- 56- HUNG, Jen-Yu et al. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**, v. 68, n. 3, p. 366-374, 2010.
- 57- PICK, Anne et al. Structure–activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 6, p. 2090-2102, 2011.
- 58- MIDDLETON, Elliott; KANDASWAMI, Chithan; THEOHARIDES, Theoharis C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.
- 59- GROTEWOLD, Erich. The genetics and biochemistry of floral pigments. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 761-780, 2006.

- 60- PATEL, Jay M. A review of potential health benefits of flavonoids. 2008.
- 61- KAMALAKKANNAN, Narasimhanaidu; PRINCE, PonnaianStanelyMainzen. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 98, n. 1, p. 97-103, 2006.
- 62- LASKOWSKI, Roman A.; SWINDELLS, Mark B. LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. 2011.
- 63- GALATI, Giuseppe; O'BRIEN, Peter J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.
- 64- LAMEIRA, O. A. et al. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2009.
- 65- LU, Qin-hua; BA, Chun-dan; CHEN, Dong-ying. Investigating noncovalent interactions of rutin–serum albumin by capillary electrophoresis–frontal analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, n. 4, p. 888-891, 2008.
- 66- LIU, Rutao et al. Resonance double light scattering method for the determination of proteins with morin–CTMAB. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 58, n. 14, p. 3077-3083, 2002.
- 67- CHAUDHURI, Sudip et al. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 1, p. 42-48, 2007.
- 68- PEREIRA, W. L. et al. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 4, supl. 1, p. 798-806, 2015.
- 69- MA, Yuan et al. Morin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2015.
- 70- MOHAMMADI, M. et al. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance

in receptor activation and signal transduction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 3, p. 977-989, 1996.

71- PEDRIALI, Carla Aparecida. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

72- TAMIRU, Wondmagegn; ENGIDAWORK, Ephrem; ASRES, Kaleab. Evaluation of the effects of 80% methanolic leaf extract of *Cayluseaabyssinica* (fresen.) fisch. & Mey. on glucose handling in normal, glucose loaded and diabetic rodents. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 151, 2012.

73- KAWABATA, Kunihiro et al. Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. **International journal of cancer**, v. 83, n. 3, p. 381-386, 1999.

74- KILANI-JAZIRI, Soumaya et al. Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis. **Drug and chemical toxicology**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2012.

75- JASH, Shyamal K.; BRAHMACHARI, Goutam. Recent progress in the research of naturally occurring flavonoids: A look through. **Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 65-168, 2013.

76- TIMSAH, Zahra et al. Expression pattern of FGFR2, Grb2 and Plcy1 acts as a novel prognostic marker of recurrence recurrence-free survival in lung adenocarcinoma. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 3135, 2015.

77- YAZICI, Zahide Mine et al. Reduction of cisplatin ototoxicity in rats by oral administration of pomegranate extract. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 269, n. 1, p. 45-52, 2012.

78- SAID, Rabih; TSIMBERIDOU, Apostolia Maria. Pharmacokinetic evaluation of vincristine for the treatment of lymphoid malignancies. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 10, n. 3, p. 483-494, 2014.

79- BONDAREV, Stanislav L.; KNYUKSHTO, Valeri N. Fluorescence and phosphorescence of rutin. **Journal of Luminescence**, v. 142, p. 236-240, 2013.

- 80- CHUA, Lee Suan. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805-817, 2013.
- 81- GUON, Tae Eun; CHUNG, Ha Sook. Hyperoside and rutin of *Nelumbonucifera* induce mitochondrial apoptosis through a caspase-dependent mechanism in HT-29 human colon cancer cells. **Oncology letters**, v. 11, n. 4, p. 2463-2470, 2016.
- 82- YILDIZOĞLU-ARI, Nuray et al. Pharmacological effects of rutin. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 1, p. 19-23, 1991.
- 83- KIM, Heejung et al. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. **Pharmaceutical research**, v. 22, n. 9, p. 1499-1509, 2005.
- 84- MENON, Lata G.; KUTTAN, Ramadasan; KUTTAN, Girija. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. **Cancer letters**, v. 95, n. 1-2, p. 221-225, 1995.
- 85- YEH, Chung-Hsin et al. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK–NF-κB pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 249-257, 2014.
- 86- ITO, Amando Siuiti, BERARDI, Marina, MOREIRA, Wallace: **Fluorescência e aplicações em Biofísica – (Série tópicos de física aplicada a medicina e biologia)** – São Paulo: Editora Livraria da Física, 2016.
- 87- LECKBAND, Deborah. Measuring the forces that control protein interactions. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 29, n. 1, p. 1-26, 2000.
- 88- CARUSO, Ícaro Putinhon. Estudo da interação entre flavonóides e a albumina do soro humano. 2012.
- 89- LAKOWICZ, Joseph R., ed. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Springer Science & Business Media, 2013.
- 90- CARUSO, IcaroPutinhon et al. Binding of antioxidant flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 98, p. 100-106, 2014.

- 91- MOREIRA, Mariete B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Quim. Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.
- 92- VAN DE WEERT, Marco; STELLA, Lorenzo. Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology. **Journal of Molecular Structure**, v. 998, n. 1, p. 144-150, 2011.
- 93- ZHONG, Dongping; DOUHAL, Abderrazzak; ZEWAİL, Ahmed H. Femtosecond studies of protein–ligand hydrophobic binding and dynamics: human serum albumin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14056-14061, 2000.
- 94- FADEL, Valmir. **ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CROTAMINA EXTRAÍDA DO VENENO DA CASCAVEL *Crotalus durissus terrificus* UTILIZANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR HOMONUCLEAR**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.
- 95- KEELER, James. **Understanding NMR spectroscopy**. John Wiley & Sons, 2011.
- 96- VIEGAS, Aldino et al. Saturation-transfer difference (STD) NMR: a simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. **Journal of chemical Education**, v. 88, n. 7, p. 990-994, 2011.
- 97- FIGUEIREDO, Isis Martins et al. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de ¹H utilizando detecção do ligante. **Química Nova**, 2007.
- 98- MEYER, Bernd; PETERS, Thomas. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 8, p. 864-890, 2003.
- 99- WANG, Yu-Sen; LIU, Dingjiang; WYSS, Daniel F. Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 485-489, 2004.
- 100- ANGULO, Jesus; NIETO, Pedro M. STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules—a quantitative approach. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 12, p. 1357-1369, 2011.

- 101- CALABRO, M. L. et al. The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 5, p. 1019-1027, 2005.
- 102- FIELDING, Lee. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 3, n. 1, p. 39-53, 2003.
- 103- YAN, Jiangli et al. The effect of relaxation on the epitope mapping by saturation transfer difference NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 163, n. 2, p. 270-276, 2003.
- 104- DING, Fei et al. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4083-4089, 2009.
- 105- AITKEN, Alastair; LEARMONTH, Michèle P. Protein determination by UV absorption. **The protein protocols handbook**, p. 3-6, 2002.
- 106- ULLAH, Anwar et al. Crystal structure of mature 2S albumin from *Moringaoleifera* seeds. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 468, n. 1, p. 365-371, 2015.
- 107- SANCHEZ-RUIZ, Jose M. et al. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1648-1652, 1988.
- 108- BENZATTI, F.P. et al, *Internacional Journal of science*, 5, 1-11, 2016.
- 109- RATH, Arianna et al. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 6, p. 1760-1765, 2009.
- 110- QUINN, Colette F.; DEMARSE, Neil A. Determining Thermal Stability of Antibodies with a Nano DSC. **TA Instruments-Application Note**, 2011.
- 111- TABOADA, Pablo et al. Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous–alcohol mixed solvents. **Chemical Physics**, v. 340, n. 1, p. 59-68, 2007.
- 112- CONNELLY, Patrick R. et al. Enthalpy of hydrogen bond formation in a protein-ligand binding reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 5, p. 1964-1968, 1994.
- 113- GHIASI, Mina; TAHERI, Salman; TAFAZZOLI, Mohsen. Dynamic stereochemistry of rutin (vitamin P) in solution: theoretical approaches and

experimental validation. **Carbohydrate research**, v. 345, n. 12, p. 1760-1766, 2010.

114- HAIYUN, Ding et al. Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β -cyclodextrin with rutin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 14, p. 3421-3429, 2003.

115- LIANDA, Regina Lucia Pelachim; CASTRO, Rosane Nora. Isolation and identification of morin in Brazilian honey from *Apis mellifera*. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1472-1475, 2008.

116- TAYLOR, Richard D.; JEWsbury, Philip J.; ESSEX, Jonathan W.. . A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 16, n. 3, p. 151-166, 2002.

117- LANG, P. Therese et al. DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes. **Rna**, v. 15, n. 6, p. 1219-1230, 2009.

118- STARK, Jaime L.; POWERS, Robert. Application of NMR and molecular docking in structure-based drug discovery. In: **NMR of proteins and small biomolecules**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 1-34.

119- PELLECCIA, Maurizio et al. NMR-based structural characterization of large protein-ligand interactions. **Journal of biomolecular NMR**, v. 22, n. 2, p. 165-173, 2002.

120- GRAVES, Alan P. et al. Rescoring docking hit lists for model cavity sites: predictions and experimental testing. **Journal of molecular biology**, v. 377, n. 3, p. 914-934, 2008.

121- GHUMAN, Jamie et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of molecular biology**, v. 353, n. 1, p. 38-52, 2005.

122- SUDLOW, G. D. J. B.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 1052-1061, 1976.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 20 / 04 / 2017

Paulo Henrique da Silva
Assinatura do autor