

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 28/01/2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Paula Ribeiro Povinelli

Abordagem físico-química da interação da piperlongumina com alvos farmacológicos

São José do Rio Preto

2022

Ana Paula Ribeiro Povinelli

Abordagem físico-química da interação da piperlongumina com alvos farmacológicos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

São José do Rio Preto

2022

P879a

Povinelli, Ana Paula Ribeiro

Abordagem físico-química da interação da piperlongumina com alvos farmacológicos / Ana Paula Ribeiro Povinelli. -- São José do Rio Preto, 2022

93 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Marinônio Lopes Cornélio

1. Piperlongumina. 2. RSA. 3. HSP70. 4. Espectroscopia de Fluorescência. 5. Dinâmica Molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Paula Ribeiro Povinelli

Abordagem físico-química da interação da piperlongumina com alvos farmacológicos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
Universidade Federal do ABC – Câmpus de Santo André

Prof.Dr. Antonio José da Costa Filho
USP – Câmpus de Ribeirão Preto

Prof.Dr. Jorge Chahine
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof.Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

28 de Janeiro de 2022

Agradecimentos

Agradeço ao prof. Marinônio pela orientação deste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos ao longo destes anos de convívio. Ao prof. Alan Jones por ter me recebido em seu laboratório e pela orientação durante o período de doutorado sanduíche.

A parte experimental deste trabalho foi possível graças à realização dos experimentos de fluorescência estacionária, dicróismo circular e fluorescência resolvida no tempo. Por isso, deixo meus agradecimentos aos professores Marcio Colombo, Marcelo de Freitas Lima, João Ruggiero Neto e Valdecir Farias Ximenes pelo uso dos equipamentos necessários para a realização dos experimentos. Ao prof. Valdecir eu agradeço também pelos ensinamentos e conversas que me ajudaram a organizar as ideias no que diz respeito ao fenômeno de fluorescência e ao sistema proteína-ligante.

As simulações computacionais deste trabalho foram possíveis graças aos recursos computacionais disponibilizados pelo Núcleo de Computação Científica (NCC/GridUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Agradeço ao corpo docente do departamento de Física do IBILCE por todos os ensinamentos transmitidos durante os 10 anos de convívio que tivemos. Também gostaria de deixar meus agradecimentos aos técnicos Bruno, Barbosa e Fábio que estiveram presente diariamente me ajudando no que fosse necessário para a condução deste trabalho.

Agradeço ao meu companheiro Gabriel Zazeri por ter estado ao meu lado durante todo este tempo, por não me deixar desanimar mesmo quando eu não tinha mais vontade de continuar. Agradeço por toda ajuda na realização deste trabalho, pelas discussões e pelas discordâncias que me ajudaram a evoluir.

À minha família, eu agradeço por todo o apoio que recebi desde os meus primeiros passos. Não posso deixar de citar minha mãe Solange, minha avó Ruth, meu avô Aderson, meus tios Sandra, Aderson e Josiara que me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui. Também agradeço a Márcia por todo apoio e incentivo durante esta trajetória.

E por fim agradeço ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Resumo

A busca por metabólitos com potencial farmacológico oriundos de plantas e de micro-organismos sempre foi uma área bastante explorada pela comunidade científica. Foi reportado que a piperlongumina (PPL), molécula extraída de espécies de pimenta, apresenta ação anti-inflamatória e por isso, o objetivo deste trabalho foi a descrição da interação da PPL com alguns alvos farmacológicos envolvidos no processo de transporte e de inflamação. A primeira etapa deste trabalho foi dedicada ao estudo da interação da PPL com a albumina de camundongo (RSA), pois entender a interação de pequenas moléculas com esta proteína contribui para compreensão da distribuição dos fármacos no organismo. Os resultados de supressão de fluorescência mostraram que a PPL se liga na RSA espontaneamente e que o processo é entropicamente dirigido. Também foi mostrado que a PPL acessa dois sítios cooperativos da RSA com constantes de ligação de $(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^5$ e $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Com as ferramentas de docagem e dinâmica molecular verificou-se os sítios de interação como sendo ricos em resíduos apolares. Além disso, com a análise dos dados de supressão de fluorescência do sistema RSA-PPL, nós mostramos a necessidade da correção do efeito de filtro interno antes de associar os desvios no máximo de intensidade de fluorescência à mudanças de polaridade no ambiente da sonda fluorescente. Também mostramos a possibilidade de utilizar as áreas do espectro de emissão do Trp, em vez de um único comprimento de onda. A segunda etapa deste trabalho foi dedicada ao estudo da interação da PPL com o domínio NBD da HSP70. A análise dos dados de supressão de fluorescência mostrou o equilíbrio das componentes entrópicas e entálpica na interação da PPL com o NBD. Além disso, foi mostrado que a PPL acessa dois sítios do NBD com constantes de ligação equivalentes a $(6.3 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, de modo cooperativo. Os ambientes de interação foram descritos com o uso do docagem molecular. Com a dinâmica molecular associada ao método de MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area), a energia livre de interação foi estimada como sendo (-58 ± 3) e $(-49 \pm 3) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ para os sítios 1 e 2. A terceira etapa deste trabalho foi dedicada à modificação de alguns grupos químicos da estrutura da PPL. As estruturas inspiradas na PPL foram submetidas aos cálculos de docagem molecular para a verificação na mudança de afinidade pela proteína NF- κ B.

Palavras-chave: Piperlongumina, RSA, HSP70, Espectroscopia de Fluorescência, Dicroísmo circular, Docking Molecular, Dinâmica Molecular, MMPBSA.

Abstract

The search for metabolites with pharmacological potential from plants and microorganisms has always been an area widely explored by the scientific community. It was reported that piperlongumine (PPL), a molecule extracted from pepper species, exhibits anti-inflammatory property and therefore the aim of this work, was the description of the interaction of PPL with some pharmacological targets involved in the transport and inflammation process. The first step of this work was dedicated to the study of the interaction of PPL with rat serum albumin (RSA), once understanding the interaction of small molecules with albumin contributes to the understanding of the distribution of the drug in the body. Fluorescence quenching results showed that PPL binds to RSA spontaneously and that the process is entropically driven. It was also shown that PPL accesses two cooperative sites in RSA structure with binding constants of $(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^5$ e $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. With the docking and dynamic analyses, the interaction sites were found to be rich in non-polar residues. Furthermore, by analyzing the fluorescence quenching data from the RSA-PPL system, we showed the importance of applying inner filter correction over the entire fluorescence spectrum prior to any conclusion regarding changes in the polarity of the fluorophore microenvironment. We also demonstrated the convergence of the results obtained from the treatment of fluorescence data using the area below the spectrum curve and the intensity in a single wavelength. The second stage of this work was dedicated to the study of the interaction of PPL with the NBD domain of HSP70. Analysis of the fluorescence quenching data showed the balance of entropic and enthalpic components in the interaction of PPL with NBD. Furthermore, it was shown that PPL has a cooperatively mode of binding, accessing two NBD sites with a binding constant of $(6.3 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. The interaction environments were described using molecular docking. With molecular dynamics associated with the MMPBSA method (molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area), the free energies of interaction were estimated to be (-58 ± 3) e $(-49 \pm 3) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ for sites 1 and 2. The third step of this work was dedicated to the modification of some chemical groups of the PPL structure. PPL inspired molecules were submitted to molecular docking calculations in order to verify the changes in affinity for NF-kB protein.

Keywords: Piperlongumine, RSA, HSP70, Fluorescence Spectroscopy, Circular Dichroism, Molecular Docking, Molecular Dynamics, MMPBSA.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Estrutura química da PPL	13
Figura 2: Caminho pelo qual a HSP70 ativa a proteína NF- κ B.	15
Figura 3: Diagrama de Jablonski.....	19
Figura 4: Gráfico de BDF da proteína SSB em duas concentrações diferentes com oligonucleotídeos ligados.	27
Figura 5: Gráficos de Scatchard para sistemas (A) com cooperatividade negativa (B) com cooperatividade positiva.....	28
Figura 6: Modelo de cálculo para a energia livre de ligação ΔG	32
Figura 7: Forma geral dos campos de força utilizados na dinâmica molecular.	34
Figura 8: (a) Espectro de emissão de fluorescência antes da correção de filtro interno da RSA com incrementos de 2 μ M de PPL ($a^* \rightarrow q^*$: de 0 a 32 μ M), [RSA] = 4 μ M, T = 298 K e λ_{exc} = 295 nm. A linha tracejada marca a intensidade em 340 nm e a linha sólida marca os deslocamentos nos máximos da intensidade de cada espectro. O inset da figura mostra a estrutura da PPL. (b) Espectro de fluorescência sincronizada antes da correção de filtro interno da RSA com incrementos de 2 μ M de PPL ($a^* \rightarrow q^*$: de 0 a 32 μ M), [RSA] = 4 μ M, T = 298 K, λ_{exc} = 240 – 350 nm e $\Delta\lambda$ = 60 nm. A linha tracejada marca a intensidade da emissão em λ_{exc} = 283 nm e a linha sólida marca o deslocamento no máximo de intensidade de cada espectro. (c) Espectro de emissão de fluorescência da RSA após a correção de filtro interno, onde a linha sólida marca o máximo das intensidades em 340 nm. (d) Espectro de fluorescência sincronizada após a correção de filtro interno, onde a linha sólida marca o máximo das intensidades de fluorescência em λ_{exc} = 283 nm.	41
Figura 9: Espectro de emissão de fluorescência da RSA (linha sólida) e espectro de absorção da PPL (linha tracejada). Ambos os espectros foram normalizados.....	42
Figura 10: Gráficos de Stern-Volmer nas temperaturas de 288, 298 e 308 K. (a) Razão das intensidades de fluorescência em 340 nm. (b) Razão das áreas abaixo dos espectros de fluorescência (de 305 a 400 nm). Na ordenada direita dos gráficos foi plotada a razão dos tempos de vida do Trp214.	43
Figura 11: Decaimento de fluorescência resolvida no tempo de (a) RSA e PPL nas estequiometrias de 1:0, 1:1, 1:3 e 1:8 (a $\rightarrow$ d), com [RSA] = 4 μ M, T = 298 K e λ_{exc} = 295 nm. IRF indica a função resposta do instrumento e a linha sólida vermelha é ao ajuste biexponencial para cada decaimento. ..	44
Figura 12: Gráficos de duplo-logaritmo utilizando (a) As intensidades em 340 nm e (b) As áreas abaixo dos espectros (de 305 a 400 nm).....	45
Figura 13: Gráficos de Van't Hoff obtidos a partir das intensidades de fluorescência em 340 nm (círculos pretos) e a partir das áreas abaixo dos espectros (de 305 a 400 nm) (quadrados vermelhos). As linhas sólidas são os ajustes lineares.....	46
Figura 14: Porcentagem de supressão de fluorescência em função do logaritmo da concentração de PPL titulada nas amostras de RSA a 2, 4 e 8 μ M. A linha horizontal indica a mesma porcentagem de supressão para diferentes concentrações de RSA. O inset exemplifica as retas referentes à equação de conservação de massa obtidas para três porcentagens de supressão fluorescência.	48

Figura 15: (a) Gráfico de Scatchard da interação RSA – PPL e (b) Gráfico de Hill da interação RSA – PPL.....	48
Figura 16: Dicroísmo circular da RSA representado com linha sólida e da RSA com PPL na estequiometria de 1: 8 representado com linha tracejada.....	49
Figura 17: (a) Resultado da docagem molecular com o resíduo de Trp214 destacado em laranja, a PPL no sítio 1 em lilás e no Sítio 2 em verde. Resíduos de aminoácidos que compõe o microambiente de interação da PPL no (b) Sítio 1 e (c) Sítio 2. Principais interações encontradas pelo LigPlot entre a PPL e os resíduos de aminoácido no (d) Sítio 1 e (e) Sítio 2.	51
Figura 18: (a) Estrutura da PPL otimizada por cálculos de primeiros princípios e o mapa de potencial eletrostático (MEP). (b) Espectro experimental de absorção da PPL em água. (c) Transições eletrônicas da PPL calculadas por TD-DFT	52
Figura 19: RMSD calculado para o “backbone” da RSA livre (em preto), da RSA com a PPL inserida no sítio 1 (em vermelho) e da RSA com a PPL inserida no sítio 2 (em verde).....	53
Figura 20: Estrutura secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 1 durante os 50 ns de dinâmica molecular da (a) RSA livre de ligante e (b) RSA com a PPL inserida no sítio 1. Estrutura secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 2 durante os 50 ns de dinâmica molecular da (c) RSA livre de ligante e (d) RSA com a PPL inserida no sítio 2.....	54
Figura 21: Distância entre os centros de geometria (COG) da RSA e PPL no sítio 1 (em preto) e no sítio 2 (em vermelho) ao longo dos 50 ns de dinâmica molecular. O inset mostra a porcentagem de tempo no qual a RSA e PPL fazem ligação de hidrogênio no sítio 1 (em preto) e no sítio 2 (em vermelho).	55
Figura 22: Espectro de emissão de fluorescência da NBD após a correção de filtro interno obtido a partir de experimentos de titulação de PPL com incremento de 1 μM ($a \rightarrow y = 0 \rightarrow 24 \mu\text{M}$). $[\text{NBD}] = 4 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 7.4$, $T = 283 \text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$. O inset mostra a estrutura química da PPL.	59
Figura 23: A ordenada esquerda mostra os gráficos de Stern-Volmer nas temperaturas de 283, 293 e 303 K. $[\text{NBD}] = 4 \mu\text{M}$, $[\text{PPL}] = 0 - 24 \mu\text{M}$. A ordenada direita mostra a razão dos tempos de vida do Trp90 ao variar a concentração de PPL.....	60
Figura 24: Decaimento de fluorescência resolvida no tempo do NBD (4 μM) e PPL nas estequiometrias de 1:0, 1:2, 1:4 e 1:6, $T = 298 \text{ K}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$	60
Figura 25: Gráficos de duplo-logaritmo dos dados de supressão de fluorescência da NBD (4 μM) coletados em 283, 293 e 303 K.	62
Figura 26: Gráfico de Van't Hoff obtido a partir dos dados de K_a calculados pelo modelo de equilíbrio de ligação e o ajuste linear dos pontos.	62
Figura 27: : Porcentagem de supressão de fluorescência em função do logaritmo da concentração de PPL titulada nas amostras de NBD a 6 e 8 μM	63
Figura 28: (a) Gráfico de Scatchard da interação NBD – PPL e (b) Gráfico de Hill da interação NBD – PPL.....	64
Figura 29: (a) Curva de desnaturação da NBD monitorada em 222 nm. (b) Fração de proteína enovelada calculada a partir da Equação 51.....	65

Figura 30: Espectro de dicroísmo circular do NBD livre de ligante (linha sólida) e do NBD na presença de PPL na estequiometria de 1:12 (linha tracejada). Os experimentos foram feitos a 293 K. 65

Figura 31: Clusters encontrados pelo docking molecular e suas funções de energia. 66

Figura 32: Representação dos clusters a – h calculados pela docking molecular. A molécula de ADP está representada em preto, os clusters a, b, c, d, e, f, g, e h estão representados em vermelho, amarelo, cinza, marrom, azul, laranja e cor-de-rosa. 67

Figura 33: Sítios de interação do NBD acessados pela PPL: (a) Estrutura da NBD com a PPL no sítio 1 (vermelho) e no sítio 2 (verde), nesta figura a molécula de ADP está representada em preto. (b) Composição de aminoácidos do Sítio 1 e as interações entre o NBD e a PPL, a ligação de hidrogênio entre o resíduo Gly339 e PPL está representada pela linha azul tracejada. (c) Composição aminoácidos do Sítio 2 e as interações entre o NBD e a PPL, a ligação de hidrogênio entre o resíduo Gln93 e PPL está representada pela linha azul tracejada. 68

Figura 34: Parâmetros obtidos a partir da simulação de dinâmica molecular do NBD com a PPL no sítio 1 (vermelho) e no sítio 2 (verde). O gráfico à esquerda mostra: (a) O RMSD calculado para os átomos do “backbone”do NBD e (b) o RMSD da molécula de PPL. O gráfico à direita mostra a distância entre o COG do NBD e o COG da PPL quando inserida no sítio 1 e no sítio 2. 69

Figura 35: O gráfico à esquerda mostra o RMSF dos resíduos do NBD quando a proteína foi simulada (a) livre de ligante, (b) quando a proteína foi simulada com o PPL ocupando o sítio 1 e (c) quando a proteína foi simulada com a PPL ocupando o sítio 2. O gráfico à direita mostra a porcentagem de tempo em que foi calculado os números de ligação de hidrogênio feitos entre o NBD e a PPL no: (a) sítio 1 e (b) sítio 2. 70

Figura 36: Análise das estruturas secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 1. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação com a PPL inserida no sítio1. 71

Figura 37: Análise das estruturas secundária dos aminoácidos que compõe o sítio 2. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação com a PPL inserida no sítio2. 71

Figura 38: Análise global da estrutura do NBD. (a) Simulação do NBD na ausência de PPL. (b) Simulação do NBD com a molécula PPL inserida no sítio 1. (c) Simulação do NBD com a molécula PPL inserida no sítio 2. 72

Figura 39: Decomposição das energias obtidas por MMPBSA para a interação da PPL com o NBD nos sítios 1 e 2. Contribuição de Van der Waals (VDW), eletrostática, solvatação polar, área acessível ao solvente (SASA) para o calculo de energia de ligação. 73

Figura 40: Cascata de ativação do heterodímero p50/p65 em células estimuladas com LPS. (Fonte: Sun e colaboradores, 2015⁶⁴). 75

Figura 41: Estrutura da proteína p65 com a molécula de DNA no sítio de interação (PDB 2O61). As estruturas em CPK são as posições encontras pelo cálculo de docking cega. A molécula de piperlongumina está representada em azul, as moléculas análogas 9a, 9b e 10 estão representadas em rosa, cinza e verde, respectivamente. 77

Figura 42: Composição de aminoácidos do microambiente de interação da PPL e das moléculas análogas 9a , 9b e 10. Ligações de hidrogênio são representadas pelas linhas tracejadas. 78

Lista de Tabelas

Tabela 1: Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante bimolecular (k_q), constante de ligação (K_a) e número de sítios calculados por meio da intensidade de fluorescência em 340 nm e por meio da área abaixo dos espectros de fluorescência no intervalo de 300 a 400 nm.	43
Tabela 2: Tempos de vida obtidos a partir ajuste bi-exponencial dos dados de fluorescência resolvida no tempo e os tempos de vida médios obtidos a partir da equação 49.	44
Tabela 3: Parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) da interação RSA – PPL e a comparação dos resultados obtidos utilizando a intensidade em um ponto e a área abaixo do espectro.	46
Tabela 4: Porcentagens de estruturas secundárias obtidas experimentalmente por dicróismo circular (CD) da RSA pura e com a PPL na estequiometria 1:8. A tabela também mostra as porcentagens de estruturas secundárias obtidas computacionalmente depois de executar 50 ns de dinâmica molecular (MD) da RSA pura e a RSA com PPL no sítio 1 (MD 1) e sítio 2 (MD 2)	50
Tabela 5: Tempos de vida obtidos a partir ajuste bi-exponencial dos dados de fluorescência resolvida no tempo e os tempos de vida médios obtidos a partir da equação 49.	61
Tabela 6: Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante bimolecular (K_q) e constante de ligação (K_a) do sistema NBD – PPL em 283, 293 e 303 K.	61
Tabela 7: Parâmetros termodinâmicos do complexo NBD – PPL nas temperaturas de 283, 293 e 303 K	63
Tabela 8: Características dos aminoácidos que compõe os microambientes dos sítios 1 e 2 do NDB.	69
Tabela 9: Ranqueamento de energia dos cálculo de docagem da estrutura da PPL e das análogas 9a, 9b e 10.	77

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Piperlongumina	13
1.2	Alvos Moleculares	14
1.2.1	Albumina de soro de Camundongo (RSA)	14
1.2.2	Heat Shock Protein 70 (HSP70)	14
1.3	Interação Proteína-Ligante	15
2	TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	17
2.1	UV-VIS	17
2.2	Espectroscopia de fluorescência do estado estacionário	18
2.2.1	Supressão estática	19
2.2.2	Supressão colisional ou dinâmica	21
2.2.3	Combinação de supressão colisional e estática	22
2.3	Fluorescência Sincronizada	23
2.4	Efeito de filtragem interna	24
2.5	Termodinâmica de interação	24
2.6	Função densidade de ligação e modelo de Scatchard	25
2.7	Fluorescência resolvida no tempo	29
2.8	Dicroísmo Circular	30
3	TÉCNICAS COMPUTACIONAIS	31
3.1	Docagem Molecular	31
3.2	Dinâmica Molecular	33
4	INTERAÇÃO RSA – PIPERLONGUMINA	36
4.1	Materiais	36
4.2	Métodos	36
4.2.1	Preparação da amostra	36
4.2.2	Espectroscopia de Fluorescência	37
4.2.3	Dicroísmo Circular	38
4.2.4	Docagem Molecular	38
4.2.5	Parametrização da PPL	39
4.2.6	Dinâmica Molecular	39
4.3	Resultados	40
4.4	Conclusão	55

5	INTERAÇÃO NBD – PIPERLONGUMINA	56
5.1	Materiais	56
5.2	Métodos	56
5.2.1	Preparação da amostra	56
5.2.2	Espectroscopia de Fluorescência	56
5.2.3	Dicroísmo Circular	57
5.2.4	Docagem Molecular	58
5.2.5	Dinâmica Molecular	58
5.3	Resultados	59
5.4	Conclusão.....	73
6	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA PPL	74
6.1	Docagem Molecular.....	76
6.2	Perspectivas futuras	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A – Publicação dos resultados obtidos para a interação RSA – PPL	84
	APÊNDICE B – Publicação dos resultados obtidos para a interação NBD – PPL	85
	APÊNDICE C – Programa para corrigir o efeito de filtragem interna em todos os comprimentos de onda.....	86
	APÊNDICE D – Programa para tratar os dados do modelo de densidade de ligação	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Piperlongumina

A natureza sempre foi uma fonte profundamente explorada para obtenção de fármacos. Nos últimos 20 anos, um terço dos fármacos aprovados pelo FDA (do inglês Food and Drug Administration) foram baseados em produtos naturais ou em seus derivados.¹ Atualmente a busca por metabólitos com potencial farmacológico oriundos de plantas e de micro-organismos continua sendo uma área de pesquisa bastante explorada pela comunidade científica.

Um exemplo de produto natural que vem sendo estudado recentemente é a piperlongumina, também conhecida como piplartina (PPL). Esta molécula tem apresentado resultados promissores como ansiolítico, anti-tumoral, anti-inflamatório e antiangiogênico.² Entre os alvos moleculares da PPL encontram-se proteínas kinases como MAPK, JNK e p38, receptores como IL-8R e MDR1, fatores de transcrição como AP-1 e NF-κB, entre outros revisados por Prasad e Tyagi.³

A piperlongumina é um alcalóide amida isolada da casca do caule e de raízes de diferentes espécies de pimenta, mas esta molécula destaca-se como sendo o principal componente presente na pimenta-longa (*Piper longum L*).⁴ A pimenta-longa tem um longo histórico de uso na medicina tradicional indiana, conhecida como Ayurveda, sendo utilizada no tratamento tumores, malária, asma, infecções respiratórias, entre outras doenças revisadas por Bezerra e colaboradores.⁴

A PPL tem massa molecular igual a 317.3 g/mol e é uma molécula lipofílica com coeficiente de partição (logP) igual a 1.63. Este metabólito foi isolado pela primeira vez em 1961 por químicos indianos que estudavam a pimenta-longa e sua estrutura química (Figura 1) foi caracterizada em 1968⁴.

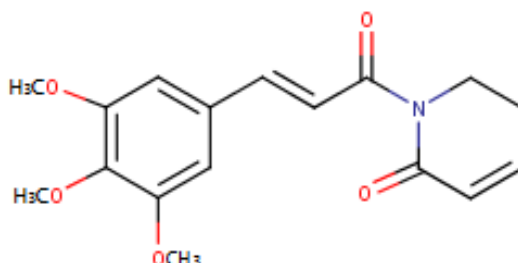


Figura 1: Estrutura química da PPL

REFERÊNCIAS

1. Thomford, N. E. *et al.* Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1578 (2018).
2. Tripathi, S. K. & Biswal, B. K. Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent. *Pharmacol. Res.* **156**, 104772 (2020).
3. Prasad, S. & K Tyagi, A. Historical spice as a future drug: therapeutic potential of piperlongumine. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 4151–4159 (2016).
4. Bezerra, D. P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). *Eur. J. Pharm. Sci.* **48**, 453–463 (2013).
5. Ghuman, J. *et al.* Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. *J. Mol. Biol.* **353**, 38–52 (2005).
6. He, X. M. & Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209 (1992).
7. Meyer, T. N. & Da Silva, A. L. Resposta celular ao estresse. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **45**, 181–188 (1999).
8. Lindquist, S. & Craig, E. A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631–677 (1988).
9. Karp, G. Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos. 1ª edição. *Barueri, SP* 53–54 (2005).
10. Radons, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* **21**, 379–404 (2016).
11. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.* **18**, 571–573 (1962).
12. Somensi, N. *et al.* Extracellular HSP70 activates ERK1/2, NF- κ B and pro-inflammatory gene transcription through binding with RAGE in A549 human lung cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **42**, 2507–2522 (2017).
13. Hulina, A. *et al.* Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell Stress Chaperones* **23**, 373–384 (2018).
14. Picard, C., Casanova, J.-L. & Puel, A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 490–497 (2011).

15. Cournia, Z., Allen, B. & Sherman, W. Relative binding free energy calculations in drug discovery: recent advances and practical considerations. *J. Chem. Inf. Model.* **57**, 2911–2937 (2017).
16. Gohlke, H. & Klebe, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chemie Int. Ed.* **41**, 2644–2676 (2002).
17. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces*. (Academic press, 2011).
18. Kuhn, B., Mohr, P. & Stahl, M. Intramolecular hydrogen bonding in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **53**, 2601–2611 (2010).
19. Neel, A. J., Hilton, M. J., Sigman, M. S. & Toste, F. D. Exploiting non-covalent π interactions for catalyst design. *Nature* **543**, 637–646 (2017).
20. Dougherty, D. A. Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science (80-.)*. **271**, 163–168 (1996).
21. Du, X. *et al.* Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 144 (2016).
22. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G. & Cavalli, A. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **59**, 4035–4061 (2016).
23. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, (1999). (2004).
24. Griffiths, D. J. *Introduction to quantum mechanics*. (Cambridge University Press, 2016).
25. Albani, J. R. *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. (John Wiley & Sons, 2008).
26. Bi, S. *et al.* Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J. Mol. Struct.* **703**, 37–45 (2004).
27. Pacheco, M. E. & Bruzzone, L. Synchronous fluorescence spectrometry: Conformational investigation or inner filter effect? *J. Lumin.* **137**, 138–142 (2013).
28. Van Holde, K. E., Johnson, W. C. & Ho, P. S. Principles of physical biochemistry. (2006).
29. Ross, P. D. & Subramanian, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* **20**, 3096–3102 (1981).
30. Lohman, T. M. & Bujalowski, W. Thermodynamic methods for model-independent determination of equilibrium binding isotherms for protein-DNA interactions: spectroscopic approaches to monitor binding. *Methods Enzymol.* **208**, 258–290 (1991).

31. Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 (1949).
32. Bordbar, A. K., Saboury, A. A. & Moosavi-Movahedi, A. A. The shapes of Scatchard plots for systems with two sets of binding sites. *Biochem. Educ.* **24**, 172–175 (1996).
33. Callis, P. R. Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation. *J. Mol. Struct.* **1077**, 22–29 (2014).
34. Kumaran, R. *et al.* Fluorescence and quantum mechanical approach on the interaction of amides and their role on the stability and coexistence of the rotamer conformations of L-tryptophan in aqueous solution. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **243**, 118791 (2020).
35. Andrews, S. S. & Tretton, J. Physical Principles of Circular Dichroism. *J. Chem. Educ.* **97**, 4370–4376 (2020).
36. Corrêa, D. H. A. & Ramos, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African J. Biochem. Res.* **3**, 164–173 (2009).
37. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
38. Durrant, J. D. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* **9**, 1–9 (2011).
39. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701–1718 (2005).
40. Kumari, R., Kumar, R., Consortium, O. S. D. D. & Lynn, A. g_mmpbsa□ A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1951–1962 (2014).
41. Gasteiger, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *proteomics Protoc. Handb.* 571–607 (2005).
42. Sreerama, N. & Woody, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**, 252–260 (2000).
43. Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng. Des. Sel.* **8**, 127–134 (1995).
44. Schmidt, M. W. *et al.* General atomic and molecular electronic structure system. *J.*

- Comput. Chem.* **14**, 1347–1363 (1993).
45. Gordon, M. S. & Schmidt, M. W. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. in *Theory and applications of computational chemistry* 1167–1189 (Elsevier, 2005).
 46. Slater, J. C. A simplification of the Hartree-Fock method. *Phys. Rev.* **81**, 385 (1951).
 47. Parr, R. G. Density functional theory of atoms and molecules. in *Horizons of Quantum Chemistry* 5–15 (Springer, 1980).
 48. Hertwig, R. H. & Koch, W. On the parameterization of the local correlation functional. What is Becke-3-LYP? *Chem. Phys. Lett.* **268**, 345–351 (1997).
 49. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3094 (2005).
 50. Spackman, M. A. Potential derived charges using a geodesic point selection scheme. *J. Comput. Chem.* **17**, 1–18 (1996).
 51. Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E. & Van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **25**, 1656–1676 (2004).
 52. Wu, Y., Tepper, H. L. & Voth, G. A. Flexible simple point-charge water model with improved liquid-state properties. *J. Chem. Phys.* **124**, 24503 (2006).
 53. Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 14101 (2007).
 54. Parrinello, M. & Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190 (1981).
 55. Batcho, P. F., Case, D. A. & Schlick, T. Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **115**, 4003–4018 (2001).
 56. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**, 1463–1472 (1997).
 57. Vivian, J. T. & Callis, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80**, 2093–2109 (2001).
 58. de Alcântara-Contessoto, N. S., Caruso, Í. P., Bezerra, D. P., Barbosa Filho, J. M. & Cornélio, M. L. An investigation into the interaction between pipartine (piperlongumine) and human serum albumin. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* (2019).

59. Malde, A. K. *et al.* An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 4026–4037 (2011).
60. Schmid, N. *et al.* Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **40**, 843–856 (2011).
61. Zazeri, G., Povinelli, A. P. R., Lima, M. de F. & Cornélio, M. L. Detailed Characterization of the Cooperative Binding of Piperine with Heat Shock Protein 70 by Molecular Biophysical Approaches. *Biomedicines* **8**, 629 (2020).
62. Montgomery, D., Jordan, R., McMacken, R. & Freire, E. Thermodynamic and structural analysis of the folding/unfolding transitions of the Escherichia coli molecular chaperone DnaK. *J. Mol. Biol.* **232**, 680–692 (1993).
63. Palleros, D. R., Reid, K. L., McCarty, J. S., Walker, G. C. & Fink, A. L. DnaK, hsp73, and their molten globules. Two different ways heat shock proteins respond to heat. *J. Biol. Chem.* **267**, 5279–5285 (1992).
64. Zazeri, G. *et al.* Synthesis and Spectroscopic Analysis of Piperine- And Piperlongumine-Inspired Natural Product Scaffolds and Their Molecular Docking with IL-1 β and NF- κ B Proteins. *Molecules* **25**, 1–17 (2020).
65. Sun, L.-D. *et al.* Development and mechanism investigation of a new piperlongumine derivative as a potent anti-inflammatory agent. *Biochem. Pharmacol.* **95**, 156–169 (2015).
66. Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M. & Aggarwal, B. B. Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* **82**, 434–448 (2004).
67. Epinat, J.-C. & Gilmore, T. D. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene* **18**, 6896–6909 (1999).