



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Karin dos Santos

Biologia Estrutural da FABP4 humana e FABP2 de ostra: um estudo in silico das interações com ácidos graxos, xenobióticos e membrana

Florianópolis

2021

Karin dos Santos

Biologia Estrutural da FABP4 humana e FABP2 de ostra: um estudo in silico das interações com ácidos graxos, xenobióticos e membrana

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Guilherme Razzera, Dr.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

dos Santos, Karin

Biologia Estrutural da FABP4 humana e FABP2 de ostra : um estudo in silico das interações com ácidos graxos, xenobióticos e membrana / Karin dos Santos ; orientador, Guilherme Razzera Maciel , 2021.

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. FABP. 3. Ácidos graxos. 4. Dinâmica molecular. 5. Coarse Grained. I. Razzera Maciel , Guilherme . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Karin dos Santos

Biologia Estrutural da FABP4 humana e FABP2 de ostra: um estudo in silico das interações com ácidos graxos, xenobióticos e membrana

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Maria Risoleta Freire Marques, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Rozangela Curi Pedrosa, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Prof. Guilherme Razzera, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Antônio, Dionísia e Maria por todo apoio, amor, carinho e cuidado. Em especial mamãe Maria e vó Rosinha que sempre fazem questão de ajudar nos mínimos detalhes para que eu tenha mais tempo para trabalhar.

Meu namorado e companheiro de vida Lucas, que sempre está ao meu lado me dando força e coragem para seguir em frente, seu companheirismo e carinho foram muito importantes nessa caminhada, obrigada pelos onze anos de parceria.

Ao meu querido orientador Guilherme Razzera pela supervisão, pelo tempo que tem dedicado na minha preparação deste a iniciação científica e principalmente, por ser sempre tão presente na minha formação acadêmica.

Um obrigado especial à minha pupila Tâmela, pelas parcerias de trabalho e pela compreensão em ceder tempo no Jobim para que eu pudesse rodar minhas dinâmicas, e aos demais colegas de laboratório, Luiz, Vanessa, Theo e Glorister, pela amizade e discussões sempre ricas nos seminários.

Também aos meus colegas da salinha de bioinformática, Renato, Guilherme, Erik, Tati, Vilmar, Jaime, Carol e Day, por serem sempre tão maravilhosos e unidos, não imagino como teria sido triste passar esse mestrado sem vocês, que logo possamos estar todos juntos e vacinados tomando nosso santo Chopp de sexta.

Ao Nestor pela amizade, conselhos, colaboração nos projetos malucos que o Guilherme inventa e por toda ajuda em python, com absoluta certeza esse trabalho andaria em marcha lenta sem você.

A UFSC pela estrutura, resistência e persistência em manter uma educação pública de qualidade e de alto nível. Também a CAPES por pagar meu salário de pesquisadora e me manter na profissão que amo.

RESUMO

Os lipídios são moléculas essenciais para os organismos e a família das proteínas de ligação com ácidos graxos (FABP) é uma das principais transportadoras dessas moléculas nas células. Nosso grupo mostrou uma diversidade aumentada de FABP em invertebrados, usando ostras como organismos modelo. Aumento na expressão gênica de FABP2 da ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* foram observados após testes com estressores ambientais, sugerindo um potencial uso dessa proteína como biomarcador de contaminação aquática. O mecanismo molecular pelo qual os lipídios atingem os bolsões de ligação nas FABP ainda não está totalmente claro. Além disso, detalhes acerca da interação entre a proteína e as membranas na função de transporte precisam ser elucidados, até mesmo para os vertebrados. Devido à complexidade envolvida na interação FABP-membrana, FABP-ligante e FABP-proteínas citosólicas, faz-se necessário o uso de ferramentas modernas de biologia estrutural para compreender o processo em nível atômico. Para isso, nesse estudo foram empregadas técnicas de modelagem 3D, *docking* e dinâmica molecular em FABP2 de *C. gigas*. Foram encontradas preferências de ligação da proteína com ácido palmítico e com o xenobiótico diclofenaco. O resíduo R112 parece ser chave para a interação. Além disso, foram utilizadas técnicas de dinâmica molecular acelerada em um estudo aprofundado sobre a interação de FABP4 humana com a membrana, cujo modelo está em consonância com resultados experimentais reportados. Nossos resultados mostraram que o resíduo de F28 na hélice II parece ter papel fundamental para o mecanismo de interação com membranas e as mutações nessa posição podem ter efeitos expressivos na dinâmica de ligação. Esses dados podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de interação da família das FABPs e para a área da toxicologia em geral, impulsionando o campo com novas abordagens metodológicas.

Palavras-chave: FABP. Ácidos graxos. Dinâmica molecular. Coarse-Grained. Bioinformática

ABSTRACT

Lipids are essential molecules for living organisms. Fatty acid-binding protein family (FABP) is responsible for one of the main transporters in cells. Our group has shown an enhanced FABP diversity in invertebrates, using oysters as model organisms. The FABP2 gene in Pacific Oyster was up-regulated when environmental stressors were tested, suggesting this protein may be a biomarker candidate. The molecular mechanism of how lipids achieve the binding pockets in FABP remains unclear. Additionally, how the protein interacts with the membranes to lipid transport needs to be clarified even for vertebrates. Due to the complexity involved in FABP-membrane, FABP-ligand, and FABP-cytosolic proteins interactions, the use of modern tools in structural bioinformatics is necessary to elucidate the process at atomic level. In the present study we employed techniques such as molecular modelling, docking and dynamics in a FABP2 from a sentinel organism, mapping preferences for binding with palmitic acid and diclofenac. The R112 was a key residue for these interactions. Furthermore, the accelerated molecular dynamics approach was also used in an in-depth study on human FABP4 ligand and membrane binding. All presented models were in line with reported experimental data. Our data showed that the F28 residue at helix II seems to play a fundamental role in the interaction mechanism with membranes and the mutations at this position may have expressive effects on the dynamic binding. These data may contribute to the understand of FABP family interaction mechanisms, and to the toxicological area in general, boosting the field with new methodological approaches.

Keywords: FABP. Fatty acids. Molecular dynamics. Coarse grained. Bioinformatics

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Estrutura de FABP: duas folhas β -pregueadas, cada uma contendo cinco fitas antiparalelas que formam um barril- β mais um motivo hélice-volta-hélice que fecha o barril- β . Dentro da cavidade uma encontra-se molécula de Palmitato. 18
- Figura 2- Gráfico Ramachandran do modelo de CgFABP2 mostrando que os resíduos foram colocados nas seguintes regiões: mais favorecidas (90,6%), adicionais permitidas (7,7%), generosamente permitidas (1,7%) e não permitidas (0%). 22
- Figura 3- Pontuação Z-score indicando alta qualidade do modelo quando comparada a estruturas determinadas experimentalmente, de sequência do mesmo tamanho. 23
- Figura 4- Características de ligação de CgFABP2 com os ácidos graxos, palmitato (A), ácido araquidônico (B) e ácido oleico (C). Os contatos polares estão representados em amarelo tracejado. Os valores numéricos estimados de energia livre ΔG em kcal/mol de cada ligante estão indicados abaixo da representação estrutural. 24
- Figura 5- Características de ligação de CgFABP2 com diferentes fármacos (A) diclofenaco, (B) ibuprofeno e (C) paracetamol. Os contatos polares estão representados em amarelo tracejado. 25
- Figura 6- Alinhamento da sequência de CgFABP2 com os diferentes ligantes evidenciando os resíduos envolvidos no mecanismo de ligação. Em preto, os resíduos doadores de hidrogênio e em cinza os resíduos de interações hidrofóbicas. Os resíduos de V55, R57, N65 e R112 interagem com todos os ligantes. 26
- Figura 7- Gráfico de flutuação quadrática média (RMSF). O RMSF está relacionado à flexibilidade e é calculado para cada um dos aminoácidos de CgFABP2 para as diferentes condições de simulação ao longo de 100ns. 27
- Figura 8- Comparação entre a estrutura apo depois de 100ns (A) e após 1,5us (B) evidenciando as regiões de maior flexibilidade. Os valores são ilustrados por cores e espessura, variando de baixa mobilidade (azul e mais fino) a alta variabilidade (vermelho e mais grosso). Com um tempo maior de simulação há um aumento de flexibilidade nos loops βBC , βCD , βEF , βGH e levemente nas hélices. 28
- Figura 9- Diferenças na flexibilidade das regiões de CgFABP2 na presença e ausência de ligantes, depois de 100ns de trajetória calculada. (A) Estrutura apo, (B) ácido oleico, (C) ácido palmítico e (D) ácido araquidônico. 29

Figura 10- Desvio médio quadrático (RMSD) com valores baixos para todos os ácidos graxos testados. Quanto menor o desvio maior a estabilidade do ligante durante a interação. 30

Figura 11- Variação do conteúdo de estrutura secundária medido por CD em região de α -hélice a 195nm em função da concentração do ligante. (A) Os valores da metade do máximo $EC50_1$ para os ácidos graxos são mostrados abaixo das curvas e em (B) dois valores da metade do máximo foram identificados para os fármacos e são mostrados sob as curvas como $EC50_1$ e $EC50_2$ 31

Figura 12- Modelo para transporte dFABP regulado por ligante proposto por Cheng et al (2019). (1) A forma apo do FABP se liga à bicamada lipídica. (2) Apo-FABP desliza sob a membrana e as regiões do portal para acomodar LCFAs. (3). A forma holo-FABP, se dissocia da bicamada lipídica. (4) Importina- α reconhece o arranjo espacial do NLS na forma holo de FABPs. (5) Holo-FABP transfere o ligante para PPARs. (6) PPARs desencadeiam a transcrição de genes que produzem proteínas para o metabolismo lipídico (β -oxidação) na mitocôndria ou através de outras vias de sinalização. 39

Figura 13- Flutuações da raiz quadrática média (RMSF) dos átomos de $C\alpha$ de FABP4 em sistema apo (livre de ligante) e holo (com ligante). Em azul a estrutura livre e em laranja complexada à ácido palmítico. 45

Figura 14- Conformação geral da estrutura de FABP4 ao longo de 500ns de simulação. Em (A) sequências de *snapshots* da forma apo mostrando o distanciamento das fitas BE/F e abertura do barril. (B) Na presença do ligante onde abertura do barril é um pouco menor (em média 25% menor quando comparado a abertura máxima na forma apo). 46

Figura 15- Comparação do desvio médio quadrático do *backbone* de FABP4 livre e complexado com ácido palmítico. Para forma apo (em azul) é possível identificar três momentos de movimentos grandes da estrutura, relacionados a abertura, fechamento do barril. Enquanto em laranja, a forma holo se mantém na mesma média de desvio após 100ns de simulação. 47

Figura 16- Movimento de captação do ácido graxo dentro da cavidade por uma abertura nas fitas β CD e β DE, que formam uma via de acesso. A entrada é favorecida por interações da cauda apolar do ác.palmítico com os resíduos da cavidade interna e por interações da cabeça polar com resíduos das fitas β C/D (E61, S63 e F70). 48

Figura 17- Mesmas interações fundamentais de R126 e Y128 (doadores de hidrogênio de cadeia lateral) com o grupo carboxila de ácido palmítico. Em (A) estrutura cristalográfica de FABP4 (2HNX), e em (B) a estrutura 3D simulada.....49

Figura 18- Gráfico de mapeamento das interações de FABP4 selvagem e F28I com a membrana, a partir dos dados de frequência de contato por resíduo. Para o tipo selvagem, em azul, a região das hélices I e II representam o local de preferência de ligação com a bicamada lipídica, enquanto para o mutante F28I essas interações são menores. O erro das medidas está representado por barras e o valor médio representado por esferas no gráfico. 51

Figura 19- Frequências de contato em representação 3D . Para o tipo selvagem (A) a frequência de interação com a membrana é maior em todas as regiões de estrutura secundária, principalmente na posição F28, cuja a mutação para Ile (em B) provoca fortes mudanças no contato entre as duas biomoléculas. Na representação quanto maior o contato mais cores quentes são observadas e mais largas são as linhas da cadeia principal da proteína. 52

Figura 20- (A) Número de eventos de ligação de FABP (selvagem e mutante) com a membrana, com redução significativa na quantidade de ligação da variante (F28I). Barras de erro indicam intervalos de confiança de 95%. ** $p < 0,005$ pelo teste U de Mann-Whitney-Wilcoxon. (B) Diferença relativa entre o tempo de interação durante a ligação, sendo a residência do mutante F28I relativamente menor quando comparada ao tipo selvagem. 52

Figura 21-(A) Comparação das frequências com que cada resíduo de FABP2, FABP4 selvagem e FABP4 mutante interagem com a membrana. (A) Os valores de FABP2 são significativamente menores em relação a FABP4, enquanto, são em escala, muito mais próximos da variante F28I (B). 53

Figura 22- Alinhamento das isoformas de FABPs em humanos com destaque para a posição 28 da sequência de FABP4. Das nove isoformas conhecidas, quatro apresentam Phe na mesma posição e duas Ile. 56

Figura 23- Estrutura de FABP4 com detalhe para o sítio de ligação de com a membrana. Os resíduos em representação de *sticks* foram o que tiveram a maior frequência de contato com a bicamada lipídica. 70

Figura 24- Evento de *binding* com da FABP4 com membrana. Os resíduos de maior frequência de contato (K22, F28, A29, K32, F58 e K121) estão coloridos em vermelho. 70

Figura 25- Gráfico de distribuição das contagens de eventos de ligação com membrana, mostrando que os eventos de *binding* não seguem uma distribuição normal..... 71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Família de proteínas de ligação com ácidos graxos em humanos.....	35
Quadro 2- Análise 2D das interações da melhor pose de <i>docking molecular</i> por ligante. Em verde estão representadas as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio em linhas tracejadas.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Energias de interação estimada das melhores poses de *Docking* molecular de CgFABP2 com possíveis ligantes endógenos do tipo ácidos graxos, e fármacos xenobióticos.

.....26

Tabela 2-Tabela de variantes possíveis de serem testadas após o cruzamento de dados com os valores das frequências de contato dos resíduos de FABP selvagem com a membrana.

.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG	Estimativa de energia livre
A-FABP/aP2	FABP4
Apo	Apoproteína
CAT	Catalase
CG	Dinâmica molecular <i>Coarse-Grained</i>
CgiLBP4	Fabp2 de <i>Cassostrea gigas</i>
COX	Ciclooxigenase
CRABP	Proteína de ligação com ácido retinóico
CRBP	Proteína de ligação com retinol
CYP	Citocromo P450
d-FABP	FABP-brain-type
F28I	Variante de FABP4 em humano
FABP	Proteína de ligação com ácido graxo
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GR	Glutathiona redutase
GST	Glutathiona S-transferase
Holo	Holoproteína
HSL	Hormônio lipase sensível
IBU	Ibuprofeno
IKK	Inibidor da kappa quinase
iLBPs	Proteínas de ligação com lipídeos intracelulares
JNK	c-Jun N da quinase terminal
LCFA	Ácidos graxos de cadeia longa
LXR	Receptor nuclear de fígado X
MD	Dinâmica molecular
NES	Sinal de exportação nuclear
NLS	Um sinal de localização nuclear típico
PCN	Ácido palmítico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
POPC	Fosfaditilcolina
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio médio quadrático
RMSF	Desvio médio quadrático por resíduo
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

Considerações gerais sobre a dissertação	15
CAPÍTULO I: Caracterização <i>in silico</i> de ligações de FABP2 em <i>Crassostrea gigas</i> e implicações ecotoxicológicas	15
1 Introdução	15
1.1 Biomarcadores de contaminação aquática.....	15
1.2 Proteínas de ligação com ácidos graxos	17
1.3 Considerações sobre o capítulo I	19
2 Objetivo Geral.....	20
2.1.1 Objetivos específicos	20
3 Metodologia	20
3.1 Modelagem comparativa	20
3.2 Docking molecular.....	21
3.3 Dinâmica molecular atomística	21
4 Resultados.....	22
4.1 Modelo 3D da FABP2 de ostra.....	22
4.2 <i>Docking</i> molecular com ligantes de interesse.....	23
4.3 Dinâmica molecular da FABP2 com Ácidos graxos	27
5 Discussão.....	30
6 Conclusões	34
Capítulo II: Construindo um modelo de captação e transporte de ácidos graxos de FABP4 em mamíferos	35
1 Introdução	35
1.1 FABPs em humanos	35
1.2 FABP4	36
1.3 Captação e transporte de ácidos graxos	38
1.4 Considerações sobre o capítulo II.....	39
2 Objetivo geral.....	41

2.1	Objetivos Específicos	41
3	Metodologia	41
3.1	Dinâmica molecular.....	41
3.1.1	Atomística.....	41
<i>3.1.1.1</i>	<i>Análises de simulação.....</i>	<i>42</i>
3.1.2	Coarse-Grained (CG)	42
<i>3.1.2.1</i>	<i>Modelos de proteínas CG</i>	<i>42</i>
<i>3.1.2.2</i>	<i>Modelo de membrana biológica</i>	<i>43</i>
<i>3.1.2.3</i>	<i>Parâmetros de simulação</i>	<i>43</i>
<i>3.1.2.4</i>	<i>Análises de simulação e estatística</i>	<i>43</i>
3.2	Busca por variantes da FABP4.....	44
4	Resultados.....	45
4.1	Estrutura global e flexibilidade da FABP4.....	45
4.2	Modelo de captação de ácido graxo da FABP4.....	48
4.3	Variantes da FABP4	49
4.4	Modelo de interação da FABP4 com a membrana e O efeito sobre a variante F28I 50	
5	Discussão.....	54
6	Conclusões e perspectivas	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A – Docking Molecular	68
	APÊNDICE B – Topologia Martini3.0 para palmitoyl-CoA.....	69
	APÊNDICE C – Sítio de ligação com a membrana	70
	APÊNDICE D – Distribuição dos dados.....	71
	ANEXO A – Characterization of a fatty acid-binding protein from the Pacific oyster (Crassostrea gigas): pharmaceutical and toxicological implications...	72

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A DISSERTAÇÃO

A dissertação está organizada em dois capítulos que contemplam estudos computacionais das interações das FABPs (*Fatty acid binding proteins*) em organismo invertebrado e vertebrado. No capítulo 1 apresentaremos um estudo com a proteína transportadora de ácidos graxos FABP2 da ostra do pacífico. Parte dos dados apresentados aqui foram recentemente publicados na revista *Environmental Science and Pollution Research* (Anexo A). Esse foi uns primeiros trabalhos feitos de forma computacional (*in silico*) com a família das FABPs de ostra e motivou o desenvolvimento de estudos com proteínas humanas, organizados no capítulo 2 da dissertação. Uma vez que ainda são poucas as informações estruturais dessa família proteica em vertebrados, nesse capítulo foi feito um aprofundamento das interações da FABP com membranas, apresentando dados de dinâmica molecular de longa duração. Até onde temos conhecimento esses são os primeiros dados simulados computacionalmente para uma FABP em membrana utilizando os parâmetros do modelo Martini (versão 3.0). Esse trabalho, portanto, passa a ser pioneiro no Brasil por apresentar pontos chave para o mecanismo de interação e transporte de ácidos graxos em membranas biológicas, e também por empregar essa abordagem metodológica.

CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO *IN SÍLICO* DE LIGAÇÕES DE FABP2 EM *CRASSOSTREA GIGAS* E IMPLICAÇÕES ECOTOXICOLÓGICAS¹

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

Os moluscos bivalves são considerados excelentes organismos sentinelas e dentre essas espécies, a ostra do Pacífico (*Crassostrea. gigas*) pode ser considerada uma importante espécie para o biomonitoramento de xenobióticos (DAVIES; VETHAAK, 2012; WESSEL et al., 2007). Características como a anatomia e o ciclo de vida; a capacidade de bioacumulação de substâncias químicas; a facilidade de cultivo e de manipulação em laboratório; fazem desse

¹Os dados deste capítulo estão no artigo Tisca et al. (2021), publicado na revista *Environmental Science and Pollution Research*

organismo uma importante ferramenta ecotoxicológica (COLLIN et al., 2010; ERNANDE et al., 2003; MIOSSEC; LE DEUFF; GOULLETQUER, 2009). Além disso, os cultivos de *C. gigas* são considerados um dos mais representativos pela aquicultura, tornando ainda mais necessário o monitoramento e elucidação bioquímica e molecular nesses organismos. Nesse sentido, grande parte dos estudos genômicos e moleculares com bivalves têm focado no gênero *Crassostrea*. Tendo *C. gigas*, inclusive, o genoma completamente sequenciado e demonstrando uma incrível complexidade genômica quanto à adaptação aos estresses ambientais (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006; ZHANG et al., 2012).

Os biomarcadores são amplamente utilizados no monitoramento ambiental, de forma a verificar a exposição ou efeito de xenobióticos nos organismos e são definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou ainda, mudanças fisiológicas nas células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos (LAM; GRAY, 2003). O uso de biomarcadores se faz importante no sentido de obter previamente, sinais de danos nos níveis de organização celular complexa e o potencial de antecipar tais mudanças os tornam importantes no alerta precoce, permitindo assim, o início de estratégias de biorremediação antes da ocorrência de danos ambientais irreversíveis (CAJARAVILLE et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Nesse sentido, biomarcadores representam ferramentas cada vez mais reconhecidas mundialmente para avaliação de impactos causados pela poluição no ambiente marinho, incorporados inclusive em vários programas de monitoramento ambiental (CAJARAVILLE et al., 2000; VIARENGO et al., 2007).

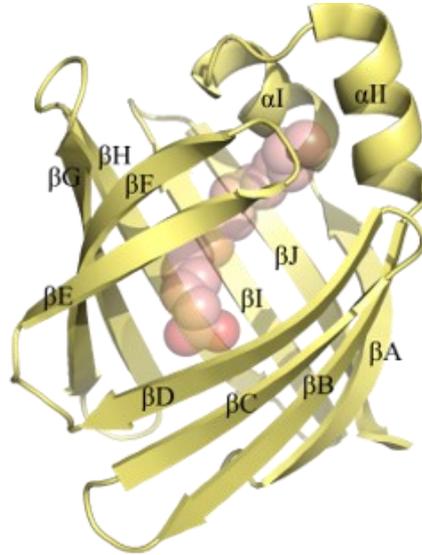
Na busca por biomarcadores para o gênero *Crassostrea*, o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) vem realizando há anos, diversos estudos de exposição desses organismos sentinela à diferentes compostos xenobióticos. *C. gigas* exposta a alquibenzeno e esgoto sanitário, por exemplo, mostraram um aumento nos níveis de transcritos de proteínas de ligação com ácido graxo (FABP-like) e glutaciona S-transferase (GST- ω -like) sugerindo uma possível resposta rápida nos tecidos para proteção e manutenção da homeostase destes organismos (FLORES-NUNES et al., 2015). Também foi encontrado regulação positiva significativa nos níveis de transcritos do citocromo P450 (CYP2AU1, CYP356A1, CYP3071A1), GST- ω -like, GST- π -like, ciclooxigenase (COX-like), e FABP-like quando expostas à ibuprofeno (IBU) (SERRANO et al., 2015). E em *C. brasiliiana* coletadas de fazendas próximas a área urbana foram identificados níveis mais elevados de transcritos de GST- Ω -like, CYP2AU1 e FABP-like, bem como atividade

aumentada de glutatona redutase (GR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em ostras das fazendas mais próximas a área urbana, concomitantemente a uma diminuição na atividade de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), sugerindo maiores níveis de peroxidação lipídica como efeito de adaptação desses organismos a exposição aos poluentes (ZACCHI et al., 2018).

1.2 PROTÉINAS DE LIGAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS

As proteínas de ligação com lipídeos intracelulares (iLBPs) são proteínas de baixa massa molecular (~15 kDa), conhecidas por seu papel crítico no transporte de ligantes hidrofóbicos, como ácidos graxos de cadeia longa e retinóides (SCHAAP; VAN DER VUSSE; GLATZ, 2002). Podem ser divididas em três subfamílias: as proteínas de ligação com ácido retinóico e retinol, CRABP e CRBP respectivamente, e as que se ligam a ácidos graxos de cadeia longa são chamadas de proteínas de ligação com ácidos graxos (FABPs) (SCHAAP; VAN DER VUSSE; GLATZ, 2002). Em relação a essa última, tem sua classificação baseada nos padrões de distribuição dos tecidos e são classificadas quanto às preferências por ligantes (HAUNERLAND; SPENER, 2004). Em vertebrados, receberam especial atenção como potenciais alvos terapêuticos para várias doenças como obesidade, diabetes e aterosclerose, devido ao seu papel nas vias de sinalização, ligação com outras proteínas citosólicas, além da captação e transporte de ácidos graxos (ARMSTRONG et al., 2014; STORCH; THUMSER, 2010). No espaço intracelular, FABPs estão envolvidas na difusão desses lipídeos, a partir da membrana plasmática para outros compartimentos celulares, como a membrana externa das mitocôndrias, por exemplo (VAN DER VUSSE et al., 2002). As FABPs são encontradas em várias espécies, desde *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* até ratos e humanos, demonstrando uma forte conservação evolutiva (SMATHERS; PETERSEN, 2011). Em geral têm uma gama extremamente ampla de diversidade de sequências, que variam de 15% a 70% de identidade de sequência entre os diferentes membros, contudo, a estrutura terciária permanece altamente conservada, Figura 1. Composta por duas folhas β -pregueadas, cada uma contendo cinco fitas antiparalelas que formam uma estrutura de barril- β , dentro da qual, delimita-se uma cavidade solvatada onde encontra-se o bolsão de ligação com o ligante. Na região N-terminal, tem-se um motivo hélice-volta-hélice que, fecha o barril- β e atua como um portal para o acesso e saída de ligantes (CHMURZYŃSKA, 2006).

Figura 1- Estrutura de FABP: duas folhas β -pregueadas, cada uma contendo cinco fitas antiparalelas que formam um barril- β mais um motivo hélice-volta-hélice que fecha o barril- β . Dentro da cavidade uma encontra-se molécula de Palmitato.



Fonte: Própria autora.

Evidências experimentais demonstram que diferentes moléculas lipofílicas, como compostos perfluorados, bezafibrato, nitrazepam e ibuprofeno, podem se ligar a FABPs (GONZÁLEZ; FISHER, 2015; MARTIN et al., 2013; VELKOV et al., 2005; ZHANG; REN; GUO, 2013). Além disso, as FABPs têm sido sugeridas como um potencial biomarcador molecular de exposição à contaminação aquática em peixes (BILBAO et al., 2010; LIU et al., 2008; OLIVARES-RUBIO; VEGA-LÓPEZ, 2016) e ostras (FLORES-NUNES et al., 2015; MEDEIROS et al., 2008; SERRANO et al., 2015; ZACCHI et al., 2018).

1.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CAPÍTULO I

Entre os invertebrados, a ostra do Pacífico (*C.gigas*), cujo genoma foi sequenciado em 2012, destaca-se como um novo modelo de referência para estudos moleculares em moluscos (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006; ZHANG et al., 2012). Além de sua relevância econômica, *C. gigas* também é um organismo sentinela, capaz de tolerar e bioacumular estressores químicos sendo amplamente utilizado para avaliar os efeitos dessas substâncias no ambiente aquático (BAYEN; LEE; OBBARD, 2007, 2007; BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; ZHANG et al., 2016). Um estudo recente do grupo de pesquisa LABCAI sobre organização gênica, estrutura proteica e filogenia da família iLBPs de *C. gigas* (TOLEDO-SILVA et al., 2017), revelou que o genoma da ostra do Pacífico contém 14 genes iLBP, dez variantes de *splicing* e dois pseudogenes, um repertório mais extenso quando comparado a outros invertebrados (ZENG et al., 2013). Em comparação com os iLBPs dos vertebrados, a análise sugere trajetórias evolutivas distintas, embora elas também apontem para um possível homólogo de vertebrados. Curiosamente, o chamado CgiLBP4 de *C. gigas* possui quatro variantes de *splicing*, agrupadas em conjunto com o FABP2 (I-FABP), compartilhando um padrão de resíduos (E / R / K) na região hélice-volta-hélice. A análise *in silico* mostrou que o modo de ligação com palmitato parece ser muito semelhante com a FABP2 de vertebrados (TOLEDO-SILVA et al., 2017).

Apesar de praticamente não existir informação sobre ligantes e funções hidrofóbicas específicas de FABP em moluscos, um estudo revelou uma regulação positiva no níveis de transcritos de uma isoforma semelhante a FABP2 (denominada *CgiLBP4* por Toledo-Silva et al., 2017) em *C.gigas* expostas a esgoto urbano (MEDEIROS et al., 2008). Nesse contexto, foi detectado um incremento nos níveis de transcrição de *CgiLBP4* não apenas nas ostras expostas ao esgoto (FLORES-NUNES et al., 2015), mas também em ostras expostas a ibuprofeno (SERRANO et al., 2015). Esses dados sugerem que as FABPs podem estar relacionados às respostas de ostras ao estresse químico e que os xenobióticos podem interagir com essa família de proteínas e interferir em suas funções fisiológicas, como acontece nos vertebrados (GONZÁLEZ; FISHER, 2015; MARTIN et al., 2013).

2 OBJETIVO GERAL

Neste capítulo objetiva-se caracterizar a proteína FABP2 de um organismo sentinela, *Crassostrea gigas*, mapeando as interações moleculares com potenciais ligantes endógenos e xenobióticos através de técnicas de bioinformática estrutural.

2.1.1 Objetivos específicos

- I. Caracterizar *in silico* a estrutura tridimensional de FABP2 em *C.gigas*;
- II. Avaliar a interação de FABP2 de *C.gigas* com fármacos de interesse ecotoxicológico e possíveis ligantes endógenos.

3 METODOLOGIA

3.1 MODELAGEM COMPARATIVA

A sequência de aminoácidos da isoforma de FABP2 de *C.gigas* (GenBank: ABU41520.1) foi submetida ao servidor NCBI: BLAST (Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local) por meio do bancos de dados PDB (*Protein Data Bank*) e sequências de proteínas não redundantes (nr), usando o algoritmo BLASTp (CAMACHO et al., 2009). O programa SwissModel (ARNOLD et al., 2006) foi utilizado para gerar o modelo tridimensional, usando como critérios de seleção, sequências de identidade maiores do que 35%, modelos complexados com ligantes naturais (ácido palmítico, oleico ou araquidônico) e gerados por técnica de cristalografia de raios-x. A qualidade do modelo construído foi estimada através dos *scores* de QMEAN4 (máximo -3,5), GMQE (valores próximos a 1), cobertura superior a 95% e valores de C β , solvatação e torção (mais positivos ou próximos de zero) (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011). Os programas PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) e Verify3D (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991) foram utilizados para verificar a confiabilidade dos modelos 3D. A avaliação do ProSA também foi utilizada para calcular o *Z-score* e verificar a qualidade do modelo (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Além disso, o potencial de gerar uma estrutura de confiabilidade também foi avaliada por meio de análises de TM-score (XU; ZHANG, 2010; ZHANG; SKOLNICK, 2004) e gráfico de Ramachandran (LOVELL et al., 2003).

3.2 DOCKING MOLECULAR

Foram realizados testes de *docking* molecular no programa SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHELIN, 2011), com parâmetro de cadeia lateral flexível de 3 Å em torno do ligante e modo acurado. Os ligantes hidrofóbicos foram obtidos no banco de dados Zinc 15 (<http://zinc.docking.org/>). As estruturas selecionadas foram as dos possíveis ligantes endógenos: palmitato (ZINC6072466), ácido oleico (ZINC6845860) e ácido araquidônico (ZINC4474696) e os fármacos: ibuprofeno (ZINC2647), diclofenaco de sódio (ZINC1281) e acetaminofeno (ZINC135508). A posição de encaixe mais estável para cada ligante foi selecionada no software Chimera (versão 1.10.2) com base em sua posição na bolsa de ligação, e nos scores de energia mais baixa *full fitness* e ΔG .

3.3 DINÂMICA MOLECULAR ATOMÍSTICA

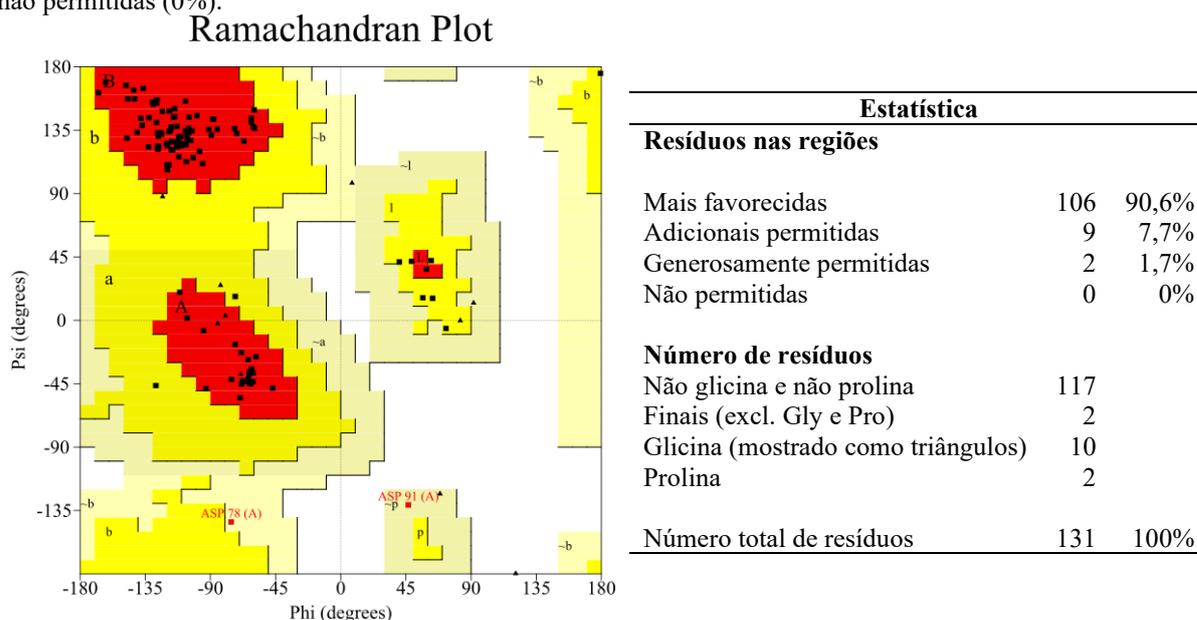
A partir dos complexos mais promissores gerados nas etapas anteriores, dinâmicas moleculares de 100ns foram realizadas através do GROMACS 2019.2 (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995; LINDAHL et al., 2019a, 2019b). O campo de força CHARMM36 (VANOMMESLAEGHE et al., 2010) foi utilizado e a topologia dos ligantes preparada pelo CGenFF (VANOMMESLAEGHE; RAMAN; MACKERELL, 2012). O tempo de integração para todas as simulações foi de 2fs. E o complexo solvatado em um dodecaedro com moléculas de água, modelo TIP3P. Foram adicionados ao sistema 150 mM de NaCl, além de contra íons para atingir a neutralidade de carga. Depois da minimização de energia, duas equilibrações de 500 ps foram realizadas com restrição de posição para o esqueleto de proteínas. As dinâmicas foram realizadas com um padrão de temperatura e pressão de 300K e 1bar respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 MODELO 3D DA FABP2 DE OSTRAS

A modelagem 3D para CgFABP2 foi construída usando o melhor *hit* de PDB como modelo, FABP2 intestinal de *Rattus norvegicus*, PDB: 2IFB, com 39% de identidade de sequência. O modelo 3D CgFABP2 foi submetido à avaliação da qualidade estrutural e validado para posições de torção psi e phi usando o gráfico de Ramachandran (Figura 2). A análise revelou que 90,6%, 7,7% e 0% dos resíduos no modelo construído CgFABP2 foram colocados nas regiões mais favorecidas, permitidas e não permitidas, respectivamente. Lembrando que um modelo de boa qualidade deve ter mais de 90% das torções nas regiões mais favorecidas.

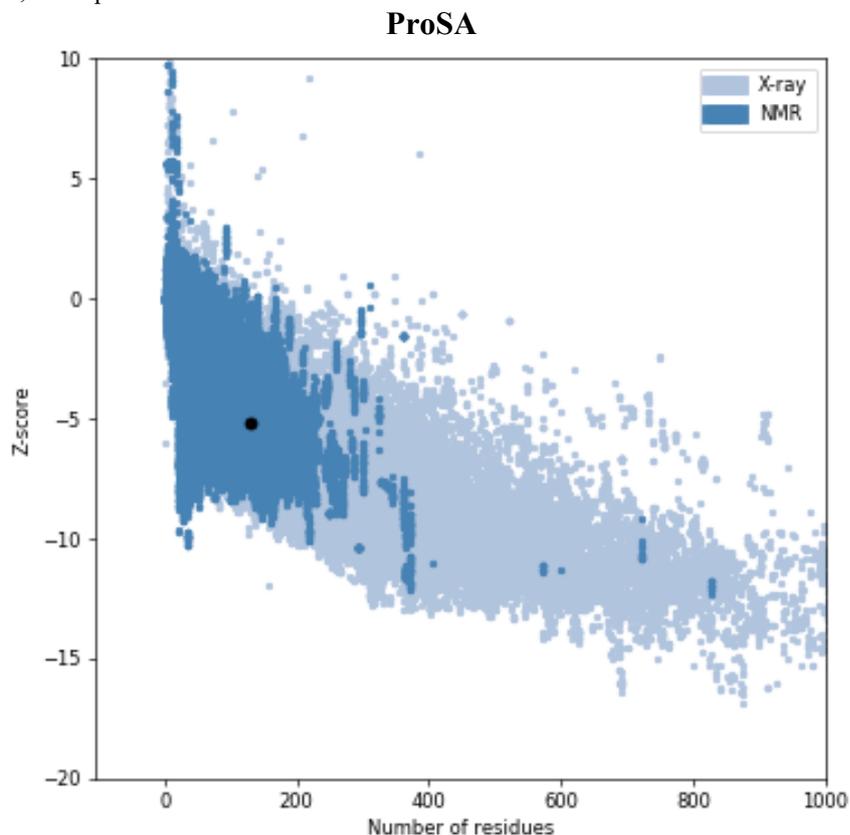
Figura 2- Gráfico Ramachandran do modelo de CgFABP2 mostrando que os resíduos foram colocados nas seguintes regiões: mais favorecidas (90,6%), adicionais permitidas (7,7%), generosamente permitidas (1,7%) e não permitidas (0%).



Fonte: Própria autora pelo PROCHECK disponível em <https://saves.mbi.ucla.edu/>

Já a avaliação do ProSA, usada para verificar se a pontuação z da estrutura de entrada está dentro da faixa de pontuações normalmente encontrada para proteínas nativas de tamanho semelhante, mostrou um score Z de $-5,21$, indicando uma estrutura prevista de alta qualidade (Figura 3). Os resultados de avaliação de qualidade mostraram que o modelo tridimensional construído de CgFABP2 era confiável para as etapas *in silico* subsequentes.

Figura 3- Pontuação Z-score indicando alta qualidade do modelo quando comparada a estruturas determinadas experimentalmente, de sequência do mesmo tamanho.

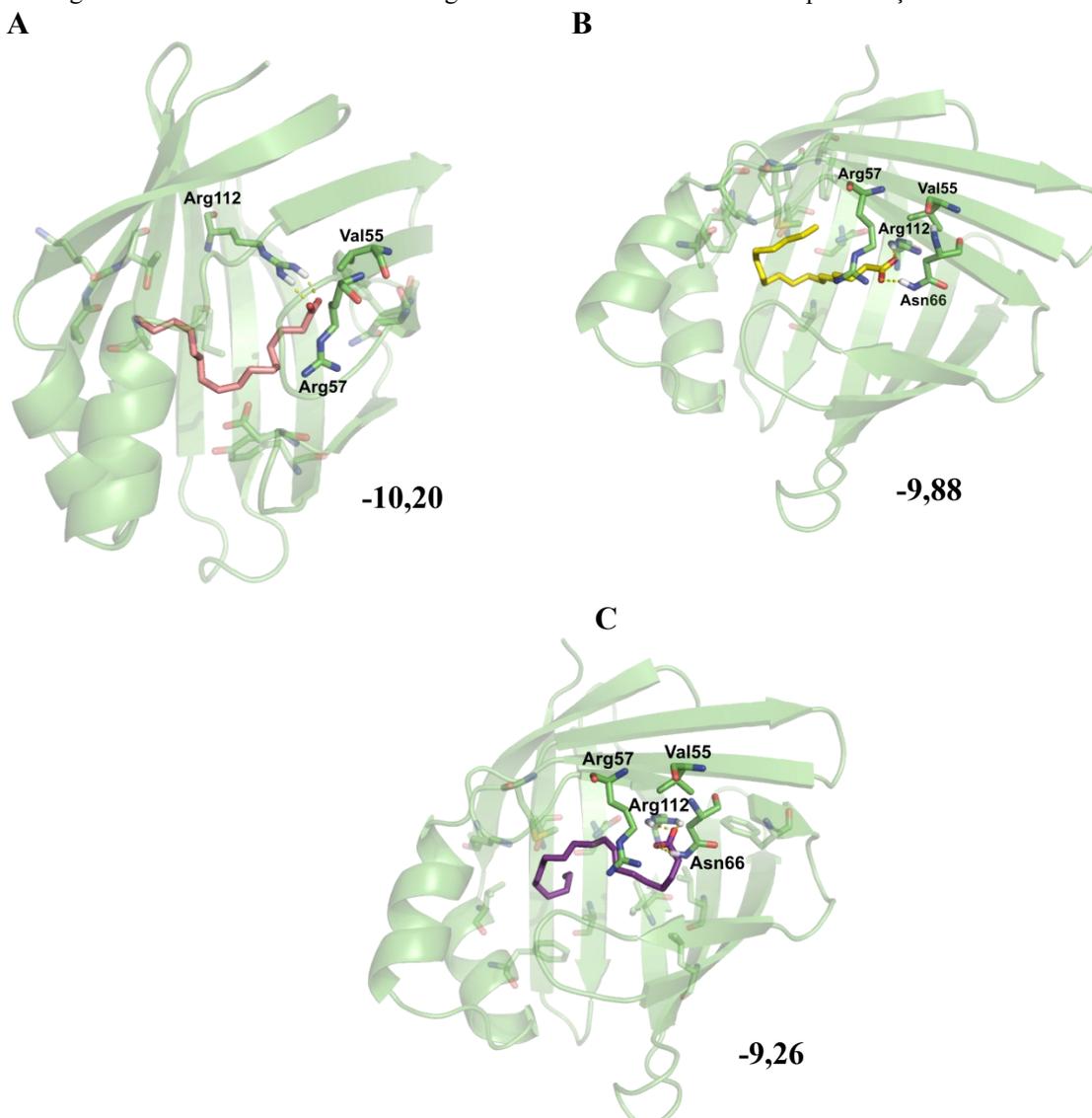


Fonte: Própria autora pelo ProSA-web disponível em <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>

4.2 DOCKING MOLECULAR COM LIGANTES DE INTERESSE

O modelo construído e de boa qualidade foi então usado para a prever a ligação de diferentes ligantes por meio de testes de *docking* molecular. As interações de CgFABP2 com ácidos graxos (palmitato, ácido oleico e araquidônico) e anti-inflamatórios não esteroidais (ibuprofeno, diclofenaco de sódio e paracetamol), foram avaliadas por meio da estimativa de energia livre (ΔG), Tabela 1. Em relação aos ácidos graxos, os valores de *docking* mostraram uma maior afinidade para o ácido palmítico ($-10,20$ kcal/mol), Figura 4A, em comparação com o ácido araquidônico ($-9,88$ kcal/mol) Figura 4B e ácido oleico ($-9,26$ kcal/mol) Figura 4C.

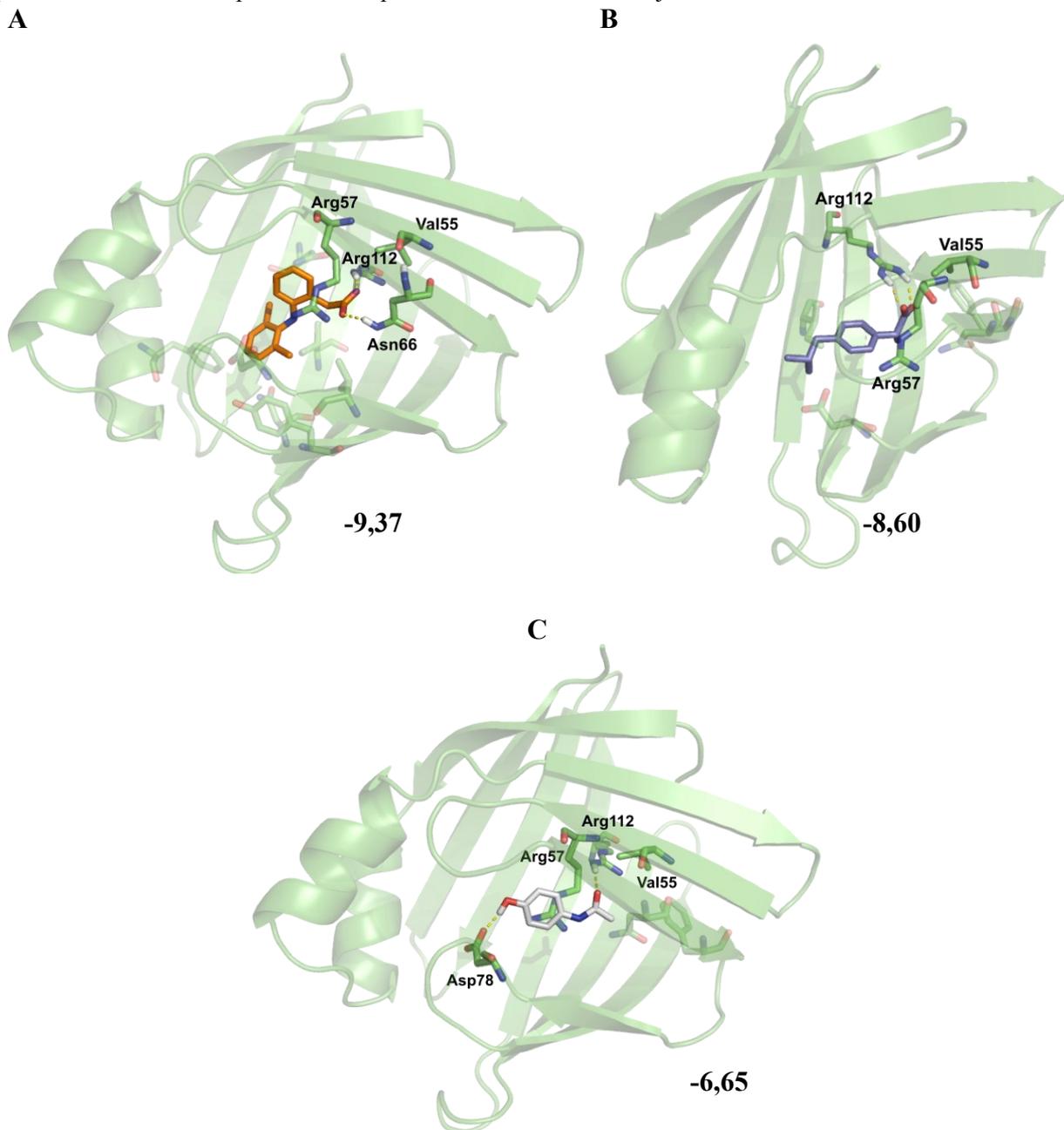
Figura 4- Características de ligação de CgFABP2 com os ácidos graxos, palmitato (A), ácido araquidônico (B) e ácido oleico (C). Os contatos polares estão representados em amarelo tracejado. Os valores numéricos estimados de energia livre ΔG em kcal/mol de cada ligante estão indicados abaixo da representação estrutural.



Fonte: Os resultados foram obtidos pelo software SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011) e as imagens construídas pelo PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

Em relação aos fármacos que foram testados, o diclofenaco Figura 5A apresentou a menor energia (-9,37 kcal/mol), seguido por ibuprofeno Figura 5B (-8,60 kcal/mol) e paracetamol Figura 5C (-6,6 kcal/mol). Com exceção do paracetamol, todos os outros fármacos apresentaram valores próximos aos dos ácidos araquidônico e oleico.

Figura 5- Características de ligação de CgFABP2 com diferentes fármacos (A) diclofenaco, (B) ibuprofeno e (C) paracetamol. Os contatos polares estão representados em amarelo tracejado.



Fonte: Os resultados foram obtidos pelo software SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHELIN, 2011) e as imagens construídas pelo PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

Para fins de comparação entre o mecanismo de ligação, na tabela a seguir, são apresentadas uma avaliação do número de contatos polares e hidrofóbicos, valores de ΔG e *full fitness* para todos os ligantes testados.

Tabela 1- Energias de interação estimada das melhores poses de *Docking* molecular de CgFABP2 com possíveis ligantes endógenos do tipo ácidos graxos, e fármacos xenobióticos.

Ligantes	ΔG estimado (kcal/mol)	<i>Full fitness</i> (kcal/mol)	Contatos	
			Polares	Hidrofóbicos
Palmitato	-10,20	-1074,6	2	11
Ácido Araquidônico	-9,88	-1040,18	2	13
Ácido Oleico	-9,26	-1063,25	1	11
Diclofenaco	-9,37	-982,12	2	9
Ibuprofeno	-8,60	-1019,12	2	6
Paracetamol	-6,65	-1021,39	2	5

Fonte: Própria autora a partir dos resultados obtidos pelo programa SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011)

Os ácidos graxos, palmitato e ácido araquidônico apresentaram os menores valores de energia livre de ligação estimadas, ambos apresentaram duas ligações de hidrogênio, e em relação aos demais ligantes, obtiveram o maior número de interação não polares. Entre os fármacos, a análise de contatos mostrou que o diclofenaco apresentou o maior número de interações não polares, nove no total, atingindo valor de ΔG semelhante aos dos ácidos graxos (-9,37 kcal/mol). O ibuprofeno, com seis contatos apolares, apresentou o segundo menor ΔG entre os fármacos (-8,6 kcal/mol) enquanto o paracetamol com um contato apolar a menos apresentou valor de ΔG igual a -6,6 kcal/mol.

As interações de CgFABP2 com os ligantes mostraram que a R112, Figura 6, é um resíduo fundamental no mecanismo de ligação, atuando como doador de hidrogênio (doador de cadeia lateral) para a cabeça polar dos diferentes ligantes. Também os resíduos V55 e R57 estão envolvidos em interações hidrofóbicas com todos os ligantes. Já o resíduo de N65 é um doador de hidrogênio (doador de cadeia lateral) para os grupos de ácido oleico, araquidônico e cabeça polar de diclofenaco e realiza interação hidrofóbica com os demais ligantes.

Figura 6- Alinhamento da sequência de CgFABP2 com os diferentes ligantes evidenciando os resíduos envolvidos no mecanismo de ligação. Em preto, os resíduos doadores de hidrogênio e em cinza os resíduos de interações hidrofóbicas. Os resíduos de V55, R57, N65 e R112 interagem com todos os ligantes.

```

CgFABP2_Palmitic_acid/1-137 1 MEEIKSKFEGNWECKKENVEGFLEALGINVIRKRAAAQFNPKLLISVGGGCVKVRKMPIKEITNEFKLDDEIDVNDHDKKAKLT 88
CgFABP2_Aracindonic_acid/1-137 1 MEEIKSKFEGNWECKKENVEGFLEALGINVIRKRAAAQFNPKLLISVGGGCVKVRKMPIKEITNEFKLDDEIDVNDHDKKAKLT 88
CgFABP2_Oleic_acid/1-137 1 MEEIKSKFEGNWECKKENVEGFLEALGINVIRKRAAAQFNPKLLISVGGGCVKVRKMPIKEITNEFKLDDEIDVNDHDKKAKLT 88
CgFABP2_Ibuprofen/1-137 1 MEEIKSKFEGNWECKKENVEGFLEALGINVIRKRAAAQFNPKLLISVGGGCVKVRKMPIKEITNEFKLDDEIDVNDHDKKAKLT 88
CgFABP2_Diclofenac/1-137 1 MEEIKSKFEGNWECKKENVEGFLEALGINVIRKRAAAQFNPKLLISVGGGCVKVRKMPIKEITNEFKLDDEIDVNDHDKKAKLT 88
CgFABP2_Acetaminophen/1-137 1 MEEIKSKFEGNWECKKENVEGFLEALGINVIRKRAAAQFNPKLLISVGGGCVKVRKMPIKEITNEFKLDDEIDVNDHDKKAKLT 88

```

```

CgFABP2_Palmitic_acid/1-137 89 YSDGKMTLCLRAVDGKSKDNTIVREIEGDNLVQTATCNGVTAKTTFKKC 137
CgFABP2_Aracindonic_acid/1-137 89 YSDGKMTLCLRAVDGKSKDNTIVREIEGDNLVQTATCNGVTAKTTFKKC 137
CgFABP2_Oleic_acid/1-137 89 YSDGKMTLCLRAVDGKSKDNTIVREIEGDNLVQTATCNGVTAKTTFKKC 137
CgFABP2_Ibuprofen/1-137 89 YSDGKMTLCLRAVDGKSKDNTIVREIEGDNLVQTATCNGVTAKTTFKKC 137
CgFABP2_Diclofenac/1-137 89 YSDGKMTLCLRAVDGKSKDNTIVREIEGDNLVQTATCNGVTAKTTFKKC 137
CgFABP2_Acetaminophen/1-137 89 YSDGKMTLCLRAVDGKSKDNTIVREIEGDNLVQTATCNGVTAKTTFKKC 137

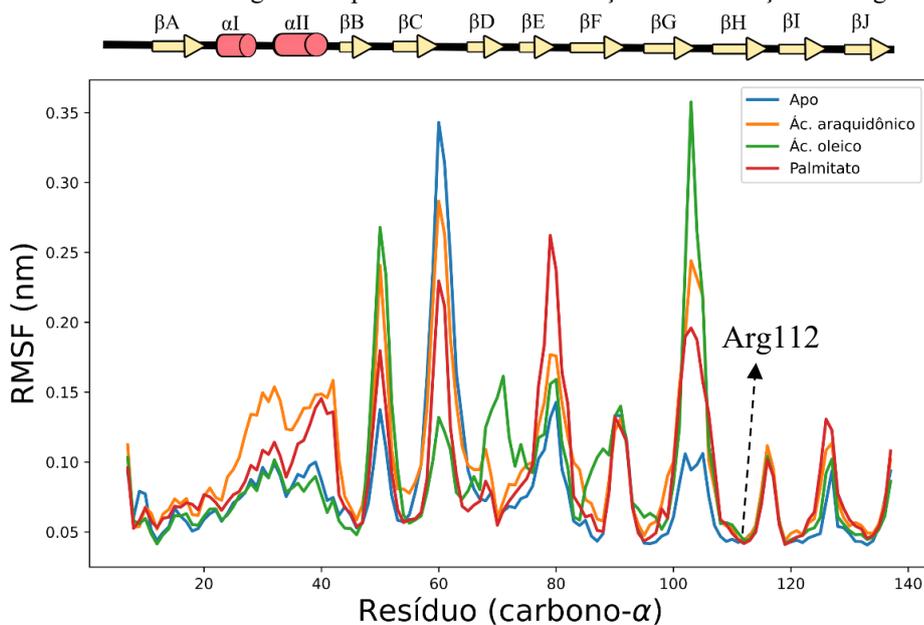
```

Fonte: Própria autora utilizando o programa Jalview (WATERHOUSE et al., 2009).

4.3 DINÂMICA MOLECULAR DA FABP2 COM ÁCIDOS GRAXOS

A partir das melhores posições de *docking* molecular, dinâmicas de 100ns foram avaliadas para o complexo de ligação CgFABP2 e ácidos graxos. A estabilidade conformacional de CgFABP2 foi avaliada pelo cálculo dos desvios médios quadráticos por resíduo (RMSF) em relação a estrutura de *docking* que deu início a dinâmica molecular (MD). Também uma dinâmica com a estrutura sem a presença de ligante (Apo) foi simulada com o objetivo de comparar todas as condições dinâmicas da proteína. No gráfico de RMSF (Figura 7) observa-se que a forma Apo (linha azul) apresentou pouca movimentação na região do portal α -hélice I e II, enquanto a região de loop β CD mostrou-se altamente flexível.

Figura 7- Gráfico de flutuação quadrática média (RMSF). O RMSF está relacionado à flexibilidade e é calculado para cada um dos aminoácidos de CgFABP2 para as diferentes condições de simulação ao longo de 100ns.

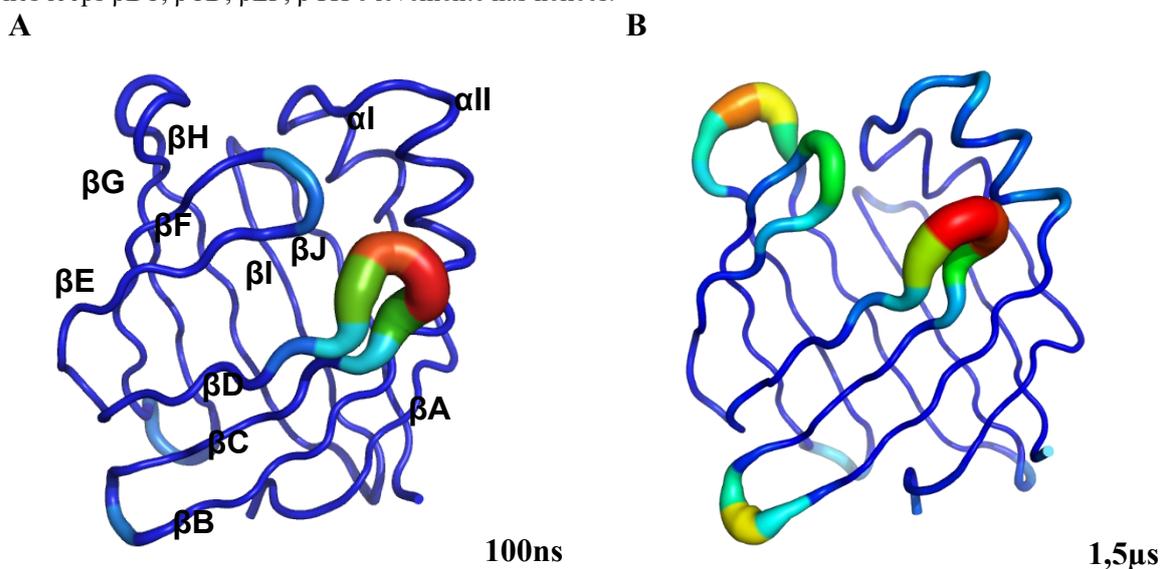


Fonte: Própria autora.

Devido ao curto tempo de simulação, a Apo foi estendida até 1,5 μ s, a fim de identificar se mudanças conformacionais maiores eram possíveis de serem observadas. A trajetória de tempo estendido mostrou que as regiões de loop β CD mantiveram-se altamente variáveis assim como as α -hélices I e II foram pouco flexíveis (Figura 8). Em contrapartida, os loops β BC, β CD e β EF e β GH apresentaram maiores mudanças conformacionais do que as mesmas regiões na

simulação de 100ns. É possível que mudanças conformacionais maiores precisem de mais tempo de simulação para ocorrer.

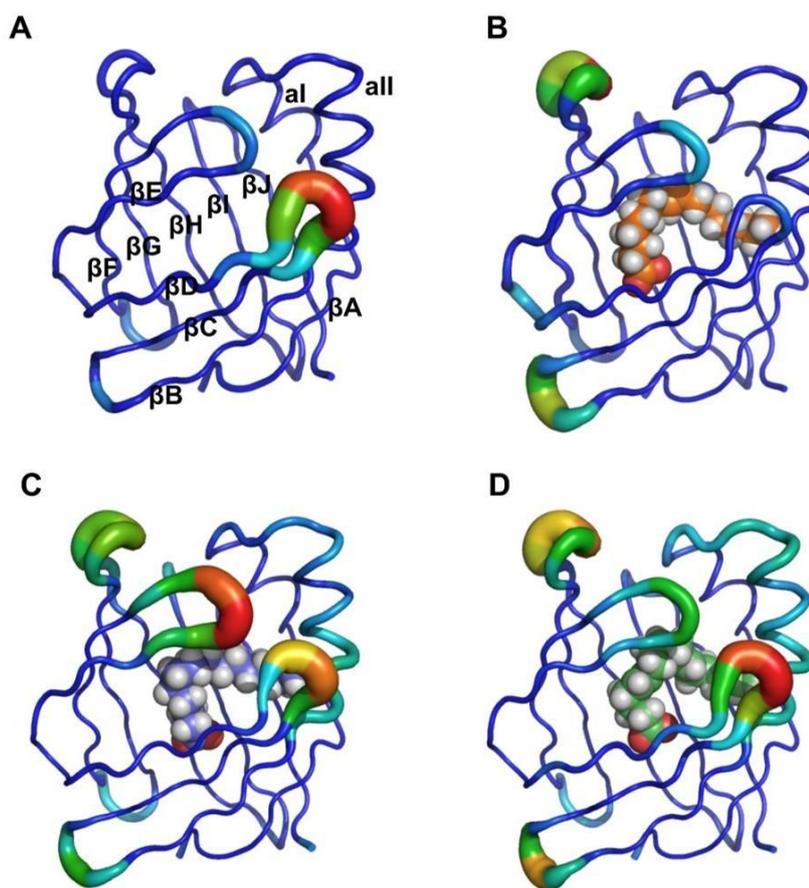
Figura 8- Comparação entre a estrutura apo depois de 100ns (A) e após 1,5 μ s (B) evidenciando as regiões de maior flexibilidade. Os valores são ilustrados por cores e espessura, variando de baixa mobilidade (azul e mais fino) a alta variabilidade (vermelho e mais grosso). Com um tempo maior de simulação há um aumento de flexibilidade nos loops β BC, β CD, β EF, β GH e levemente nas hélices.



Fonte: Própria autora utilizando o programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

As simulações com os diferentes ácidos graxos, mostraram que mesmo em 100ns de simulação, a presença de um ligante no bolsão de ligação é capaz de induzir mudanças conformacionais importantes na estrutura, particularmente, nos loops β BC, β CD, β EF e β GH (Figura 9). Para os complexos CgFABP2-ácido palmítico (Figura 9C) e CgFABP2-ácido araquidônico (Figura 9D) também se observa uma pequena movimentação da hélice II. A ligação com ácido oleico (Figura 9B), apesar de apresentar maior variação nos loops β BC e β GH, mostrou movimentação restrita nas demais regiões, principalmente no portal das α -hélices.

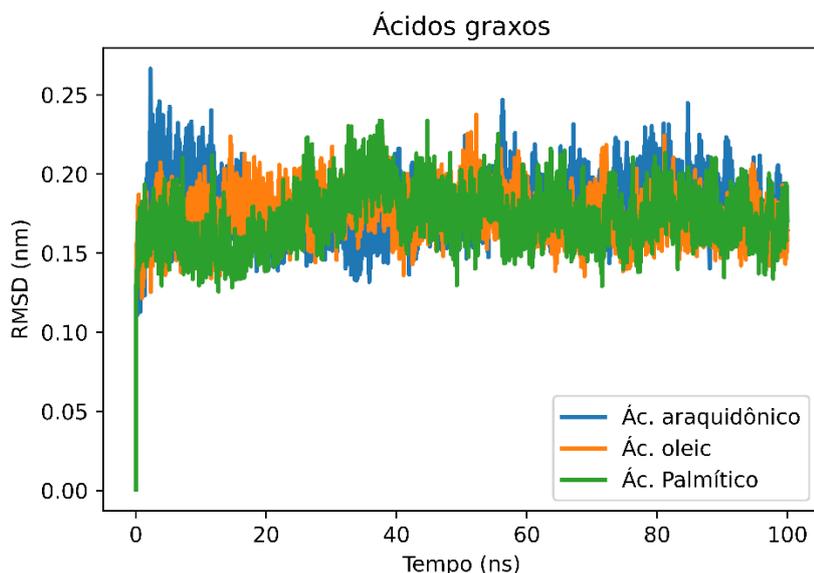
Figura 9- Diferenças na flexibilidade das regiões de CgFABP2 na presença e ausência de ligantes, depois de 100ns de trajetória calculada. (A) Estrutura apo, (B) ácido oleico, (C) ácido palmítico e (D) ácido araquidônico.



Fonte: Própria autora utilizando o programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

Do ponto de vista do ligante, foi observado no cálculo de RMSD, que a partir de 40ns de simulação todos os ligantes têm pouca movimentação dentro da cavidade, apresentando de forma muito semelhante estabilidade de ligação (Figura 10). Levando em consideração a baixa flexibilidade da R112 (Figura 7), em torno de 0.5nm, esse resíduo parece ser principal o principal doador de hidrogênio para a cabeça polar dos diferentes ácidos graxos ao longo da dinâmica, mantendo essas ligações estáveis.

Figura 10- Desvio médio quadrático (RMSD) com valores baixos para todos os ácidos graxos testados. Quanto menor o desvio maior a estabilidade do ligante durante a interação.



Fonte: Própria autora.

5 DISCUSSÃO

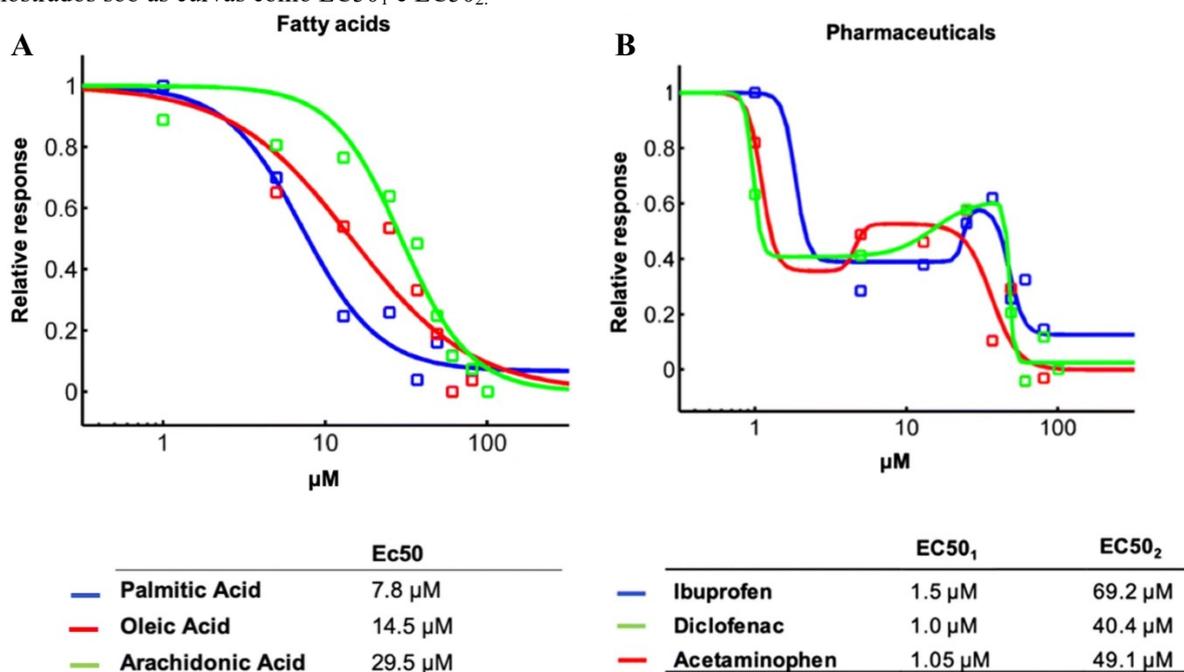
As FABPs podem se ligar reversivelmente a uma ampla gama de ligantes hidrofóbicos (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008), como ácidos graxos e produtos farmacêuticos (VELKOV et al., 2005). No entanto, suas funções biológicas ainda não estão bem compreendidas, particularmente em invertebrados (SMATHERS; PETERSEN, 2011). Variações nos níveis de transcrição de diferentes FABPs foram observadas em *C. gigas* sob condições de estresse fisiológico (DAVID et al., 2005; HUVET et al., 2004; LANG et al., 2009), fitotoxinas (MELLO et al., 2012) e exposição a esgoto sanitário (FLORES-NUNES et al., 2015; MEDEIROS et al., 2008). Um aumento significativo (43,6 vezes) na transcrição do gene *FABP2-like* foi observado em hepatócitos de ostra após 48 h de exposição a esgoto sanitário não tratado (MEDEIROS et al., 2008). Além disso, a regulação positiva do gene *FABP2-like* foi encontrada nas brânquias de *C. gigas* depois de 1 (2,6 vezes) e 7 (2,2 vezes) dias de exposição a $1\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ibuprofeno (SERRANO et al., 2015). Toledo-Silva et al. (2017) caracterizaram a família de genes iLBP de *C. gigas*, que inclui um grupo de FABPs e 26 transcritos diferentes de iLBP. Entre estes, os genes CgFABP2 foram identificados e classificados como CgiLBP4. Esses genes foram anteriormente reportados como *FABP2-like* por Serrano et al. (2015), e *FABP2* tipo intestinal por Medeiros et al. (2008). Sendo assim, a caracterização da ligação da proteína CgFABP2 de *C. gigas* foi realizada com base nos

resultados da análise dos níveis de transcrição dessa proteína sob exposição a diferentes xenobióticos.

O modelo tridimensional construído de CgFABP2 mostrou uma configuração de proteína iLBP típica com dez fitas beta e duas α -hélices (LALONDE; BERNLOHR; BANASZAK, 1994). O modelo 3D obtido, a partir da cristalografia de raios-x, de FABP2 de camundongo foi usado para análise de *docking* molecular para avaliar as preferências de ligação do ligante (FISER, 2010; ROCHE; KIYAMA; BROOKS, 2001).

A análise de ligação *in silico* com ácidos graxos sugeriu preferências por palmitato, ácido araquidônico e ácido oleico, com um ΔG estimado de $-10,2$, $-9,8$ e $-9,2$ kcal/mol, respectivamente. Os dados computacionais podem ser corroborados com experimentos *in vitro* realizados pelo nosso grupo. De acordo com dados de dicroísmo circular (CD), recentemente publicados (TISCA et al., 2021), CgFABP2 mostrou grandes perturbações estruturais na titulação de ácido palmítico, Figura 11A, com estimativa de EC_{50} de $7,8\mu M$. Constantes maiores foram observadas para os ligantes ácido oleico e ácido araquidônico, com $14,5$ e $29,5$ μM , respectivamente. Ou seja, maior afinidade por ácido palmítico em comparação aos demais ligantes testados, como mostra a figura a seguir.

Figura 11- Variação do conteúdo de estrutura secundária medido por CD em região de α -hélice a $195nm$ em função da concentração do ligante. (A) Os valores da metade do máximo EC_{50_1} para os ácidos graxos são mostrados abaixo das curvas e em (B) dois valores da metade do máximo foram identificados para os fármacos e são mostrados sob as curvas como EC_{50_1} e EC_{50_2} .



Fonte:(TISCA et al., 2021)

Essas mudanças estruturais são devidas a afinidades de ligação altas e específicas. O pico positivo nesta região espectral é tipicamente encontrado em proteínas com conteúdo α -helicoidal (MILES; WALLACE, 2006), e o local de ligação do ligante em FABPs contém um motivo α -hélice. É possível que a α -hélice desempenhe um papel semelhante à de um portal ou tampa, que abre e fecha, controlando a entrada e saída de ligantes no bolsão de ligação. Esse fenômeno é conhecido como a “hipótese do portal” (HODSDON; CISTOLA, 1997; HUNTER; BAKULA; BRUCE, 2018; SACCHETTINI; GORDON; BANASZAK, 1989). Hodsdon e Cistola (1997) colaboraram para essa hipótese por meio de medições de ressonância magnética nuclear (NMR) da FABP intestinal de ratos na forma holo e apo (I-FABP), sugerindo que a região do portal é mais flexível. Muito embora, os resultados de dinâmica molecular tenham apontado para as regiões dos loops β CD, β EF e β GH, adjacentes as hélices, como as regiões mais flexíveis (Figura 7). Quando a ligação de ácido graxo foi analisada em FABP2 de camundongo, as taxas de associação de proteínas sem hélice foram semelhantes às do tipo selvagem, mas as taxas de dissociação foram menores para a proteína de tipo selvagem. Os dados indicam que as hélices de FABP2 não são necessárias para manter a integridade da cavidade de ligação, mas podem servir para regular a afinidade de ligação de ácidos graxos (CISTOLA et al., 1996). Além disso, as variações da estrutura FABP observadas na titulação do ligante, incluindo a ligação com xenobióticos, foram diretamente relacionadas aos ligantes de alta afinidade (ZHANG; REN; GUO, 2013).

Uma vez que as alterações estruturais do CgFABP2 apresentam uma perturbação da metade do máximo inferior para o ácido palmítico, os dados experimentais *in vitro* de Tisca et al. (2021), aliado aos resultados de estabilidade do ligante na cavidade de ligação durante a MD desenvolvidos neste trabalho, sugerem fortemente que FABP2 de *C. gigas* é uma proteína de ligação a ácidos graxos saturado e desempenha um papel muito semelhante ao dos vertebrados (VELKOV et al., 2005). Provavelmente atua para manter a homeostase energética, funcionando como um sensor de lipídios. Além disso, o genoma de *C. gigas* contém quatro variantes do gene para FABP2 com características estruturais semelhantes (TOLEDO-SILVA et al., 2017).

Os dados *in silico* apresentados também mostram que o diclofenaco e o ibuprofeno apresentam ΔG e mecanismo de ligação semelhante aos dos ácidos graxos, envolvendo principalmente o resíduo R112, indicando então uma interação favorável entre os fármacos e CgFABP2. A FABP2 intestinal e a FABP4 de adipócito, ambos de vertebrado, se ligam ao

ibuprofeno com constantes de dissociação da faixa μM e nM , respectivamente (GONZÁLEZ; FISHER, 2015; VELKOV et al., 2005). A estrutura tridimensional de FABP4 humana ligada ao ibuprofeno mostra a importância de uma interação aromática entre o ligante e um resíduo de fenilalanina na posição 16 da cadeia. Esse resíduo forma uma interação aromática *edge-to-face* entre a cadeia lateral da fenilalanina (aceptor de elétrons) e o grupo fenil ligante (doador de elétrons), e também uma interação cátion π com R126, que está envolvida em interações polares com o ligante (GONZÁLEZ; FISHER, 2015). CgFABP2 não apresentou interação de resíduo aromático com os ligantes testados, sugerindo uma menor afinidade para ibuprofeno em comparação com FABP4 humano, que apresentou constantes de dissociação de 133 e 95nM para R e S-ibuprofeno, respectivamente.

Os dados de CD de Tisca et al. (2021) das interações farmacêuticas também mostraram perturbações estruturais mais baixas do que os ácidos graxos (Figura 11). O EC50 estimado para os compostos farmacêuticos sugere dois estados de ligação (cerca de $1\mu\text{M}$ e $> 40\mu\text{M}$). Velkov et al. (2005) demonstrou interações entre FABP intestinal e fármacos lipofílicos, como o ibuprofeno, com um estado e um Kd de $95\mu\text{M}$. Chuang et al. (2008) mostraram que a FABP de fígado, tem uma cavidade maior do que a isoforma intestinal, e a maioria dos fármacos, incluindo o ibuprofeno, se liga em dois locais, sugerindo que o local de baixa afinidade de ligação estava nas região das hélices e o local de alta afinidade estava na região do barril- β . Nenhuma estrutura 3D está disponível para CgFABP2, e a hipótese de dois sítios de ligação para esses fármacos não pode ser descartada, particularmente com uma molécula pequena como o ibuprofeno. Do ponto de vista da perturbação do conteúdo das hélices, os fármacos testados parecem apresentar uma afinidade de ligação mais baixa para CgFABP2 em comparação com os ácidos graxos. A perturbação estrutural em concentrações mais baixas pode refletir um segundo sítio de ligação com alta afinidade, e mais estudos bioquímicos, mutação pontual ou análise estrutural 3D são necessários para esclarecer essas questões. As técnicas empregadas nesse trabalho limitaram-se em avaliar apenas o complexo de ligação, e portanto, não refletem todas as mudanças conformacionais possíveis para CgFABP2, uma vez que, não foi avaliado o processo de captação dos ligantes nem a interação com outras biomoléculas como membrana, por exemplo.

As consequências a nível de organismo devem levar em consideração a concentração ambiental desses compostos e uma série de fatores fisiológicos e abióticos, mas mesmo com afinidade de ligação dos xenobióticos mais baixa, efeitos biologicamente relevantes podem

ocorrer. A concentração de FABP no fígado e nos enterócitos humanos é muito maior do que a concentração de ácidos graxos livres, e as interações com outros ligantes hidrofóbicos foram investigadas (VELKOV et al., 2005). Como o CgFABP2 possui quatro variantes gênicas no genoma (TOLEDO-SILVA et al., 2017) é possível que os níveis dessas proteínas teciduais possam estar relacionados a um papel de transporte de xenobióticos.

Este estudo recomenda o uso de CgFABP2 como um biomarcador potencial de exposição a xenobióticos, como fármacos não esteroidais. As respostas de CgFABP2 podem ser avaliadas junto com outros biomarcadores, como proteínas e genes relacionados à defesa antioxidante, apoptose, modulação do metabolismo lipídico, biotransformação, sistema imunológico, mudanças na renovação celular e outros biomarcadores de efeitos, como os de DNA e estresse oxidativo (dano lipídico), que são conhecidos por serem responsivos ao ibuprofeno e diclofenaco em outros moluscos bivalves, como *Mytilus galloprovincialis* (MEZZELANI et al., 2018) e *Ruditapes philippinarum* (TROMBINI; HAMPEL; BLASCO, 2019).

6 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que CgFABP2 interage com ácidos graxos e fármacos não esteroidais, com preferência por ácido palmítico e diclofenaco, respectivamente. A R112 no sítio de ligação é um resíduo chave, fundamental na ligação de hidrogênio durante a interação com ácido palmítico e o xenobiótico. Para compreender com maior clareza todo processo dinâmico que permeia as interações de FABPs, são necessários mais estudos que levem em consideração não só o processo de captação de ligantes, hipótese do portal, como também a interação com outras biomoléculas, como complexos de membrana, por exemplo.

CAPÍTULO II: CONSTRUINDO UM MODELO DE CAPTAÇÃO E TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS DE FABP4 EM MAMÍFEROS

1 INTRODUÇÃO

1.1 FABPS EM HUMANOS

Apesar de estarem presentes em todos os tecidos do corpo humano, a função das FABPs é altamente específica por tecido, assim como também, estão altamente expressas em tecidos que são bastante ativos no metabolismo de ácidos graxos (HAUNERLAND; SPENER, 2004; SMATHERS; PETERSEN, 2011). Nos hepatócitos, adipócitos e cardiomiócitos, onde os ácidos graxos são substratos proeminentes para biossíntese lipídica, armazenamento ou β -oxidação, as FABPs representam de 1 a 5% de todas as proteínas citosólicas solúveis. Estes níveis podem ser ainda maiores após exposição crônica e elevada a lipídios extracelulares, assim como também, em células musculares esqueléticas para pacientes com diabetes (HAUNERLAND; SPENER, 2004; VEERKAMP; VAN MOERKERK, 1993; ZANOTTI, 1999). Apesar da nomenclatura ter sido inicialmente baseada no tecido em que foram isoladas ou identificadas pela primeira vez, tal classificação pode ser um tanto quanto equivocada, uma vez que, não é incomum que diferentes isoformas sejam encontradas no mesmo tecido, como é possível verificar no quadro a seguir.

Quadro 1 - Família de proteínas de ligação com ácidos graxos em humanos.

Tipo	Gene	Expressão em humanos	Ligação
L-FABP	Fabp1	Intestino, fígado, rim, duodeno, cólon	LCFA e ácidos biliares
I-FABP	Fabp2	Intestino delgado, duodeno, cólon	LCFA
H-FABP	Fabp3	Rim, coração, cérebro e mama (em pacientes com câncer de mama)	LCFA
A-FABP/ aP2	Fabp4	Tecido adiposo e macrófagos	LCFA
E-FABP	Fabp5	Apêndice, medula óssea, cólon, duodeno, endométrio, esôfago, tecido adiposo, vesícula biliar, coração, pulmão, linfonodos, próstata, pele, intestino, baço, testículos, bexiga urinária	LCFA
ILBP3	Fabp6	Intestino delgado	LCFA e ácidos biliares
B-FABP	Fabp7	Cérebro, pele e células tumorais (melanoma, câncer de mama, glioblastoma)	LCFA
M-FABP	Fabp8	Cérebro	Pode ligar-se às camadas da membrana das bainhas de mielina e a lipídios
T-FABP	Fabp9	Tecido adiposo e testículo (em pacientes com câncer de próstata).	LCFA
NA(*)	Fabp12	Células de retinoblastoma	NA

Fonte: Informações obtidas pelo NCBI (NCBI RESOURCE COORDINATORS et al., 2018) e OMIM®.
LCFA= Ácidos graxos de cadeia longa (C₁₂₋₂₀)
NA*= Não se aplica

Além de ácidos graxos de cadeia longa, FABPs transportam uma grande variedade de outros compostos hidrofóbicos, desde moléculas endógenas como o grupo heme, ácidos biliares e eicosanóides, até fármacos e poluentes ambientais, como já foi visto em estudos com invertebrados e vertebrados (ESTEVEZ; EHRLICH, 2006; STORCH; THUMSER, 2000) e no capítulo I deste trabalho. Em humanos, tais proteínas também são necessárias para o transporte de ácido graxos de cadeia longa para fatores de transcrição como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs). Os membros desta família de receptores nucleares são amplamente conhecidos por regularem a transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico, e modulação do crescimento e proliferação celular (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008; VELKOV, 2013).

1.2 FABP4

Dentre as FABPs, a isoforma quatro, conhecida como FABP de adipócito (A-FABP) ou adipócito P2 (aP2), assim chamada devido a sua similaridade de sequência com a chamada proteína P2 da mielina, é altamente expressa e representa cerca de 1% de todas as proteínas do tecido adiposo (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008). Entretanto, a expressão em níveis elevados não se dá apenas nas células adiposas brancas e marrons, mas também em monócitos e macrófagos, tendo sua expressão dramaticamente aumenta durante a diferenciação de adipócitos e durante a conversão de monócitos em macrófagos ativados (PELTON et al., 1999). Além dos efeitos na regulação da transcrição e nas vias de transdução de sinal, o mecanismo pelo qual a FABP4 pode afetar o metabolismo lipídico intracelular pode envolver o transporte direto de seu substrato, ácido graxo, para diferentes locais subcelulares (STORCH; THUMSER, 2000). Apesar da sequência primária de FABP4 não apresentar um sinal de localização nuclear típico (NLS) ou sinal de exportação nuclear (NES), esses domínios podem ser encontrados na estrutura tridimensional de FABP4 (AYERS et al., 2007), fundamental para o reconhecimento da importina- α e posterior movimentação para o núcleo.

Esta isoforma, em camundongos, parece interagir com o hormônio lipase sensível (HSL), potencialmente modulando a sua atividade catalítica e integrando várias redes de sinalização que controlam as respostas inflamatórias, potencialmente através de c-Jun N da

quinase terminal (JNK), inibidor da kappa quinase (IKK) e ação da insulina no adipócito. Além de regular o influxo de ácidos graxos, o FABP4 também é importante no controle da produção de hormônio lipídico de adipócitos para regular alvos distantes (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008; SMITH et al., 2007). Em macrófagos, FABP4 também medeia o aumento das respostas inflamatórias através do inibidor IKK e JNK e aumenta o acúmulo de colesterol através da inibição de PPAR γ e do receptor de fígado X α (LXR α) (HUI et al., 2010; MAKOWSKI et al., 2005). Existe uma correlação entre o nível de FABP4 e adiposidade, nesse sentido os níveis de FABP4 em mulheres é significativamente maior do que em homens, possivelmente, devido a maior quantidade de gordura corporal das mulheres (ISHIMURA et al., 2013).

Hotamisligil et al. (1996) estudaram camundongos deficientes em aP2, gene que codifica para FABP4, e com uma dieta rica em gordura desenvolveram obesidade alimentar, entretanto, ao contrário dos camundongos controle, não desenvolveram resistência à insulina ou diabetes. Também os animais obesos aP2^{-/-} não expressaram no tecido adiposo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), uma molécula envolvida na resistência à insulina relacionada à obesidade, indicando que aP2 é central para a via que conecta a obesidade à resistência à insulina, possivelmente ligando o metabolismo dos ácidos graxos à expressão de TNF- α . Também Furuhashi et al. (2007), mostraram que em ratos, o tratamento com um inibidor de FABP4 melhora a resistência à insulina, diabetes mellitus, doença hepática gordurosa e aterosclerose, indicando que a inibição química dessa isoforma pode ser uma estratégia terapêutica contra vários aspectos da síndrome metabólica. Estudos também demonstraram que a neutralização de FABP4 secretada, através de anticorpo, poderia ser uma abordagem viável para o tratamento da resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (BURAK et al., 2015; CAO et al., 2013).

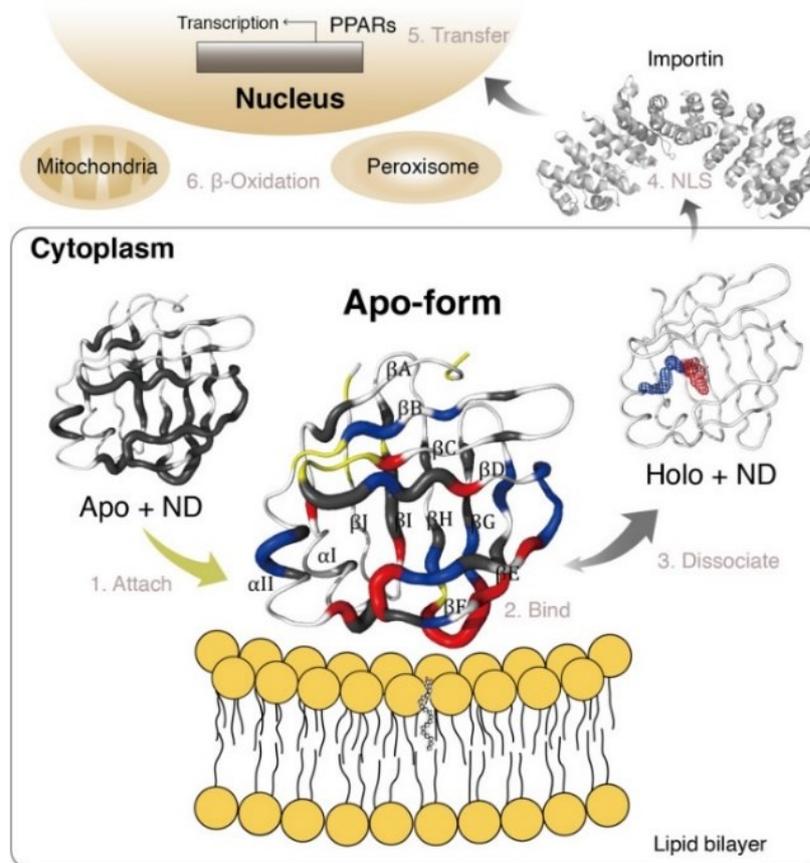
Recentemente, FABP4 foi identificada como um regulador crítico das resposta lipídicas em células de câncer de ovário em camundongos, e o uso de um inibidor promoveu uma redução significativa da carga tumoral assim como também aumentou a sensibilidade das células a carboplatina (antineoplásico) *in vitro* e *in vivo* (MUKHERJEE et al., 2020). Também o aumento dos níveis séricos de FABP4 tem sido associado ao risco de câncer colorretal (ZHANG et al., 2019) e de mama (ZENG; SAUTER; LI, 2020), apontado como um biomarcador promissor para a doença. Devido a importância biológica dessa proteína, diversos

estudos têm sido realizados na busca por inibidores de FABP4 (FLORESTA et al., 2019; WANG et al., 2014; ZHOU et al., 2016).

1.3 CAPTAÇÃO E TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS

Foi proposto um mecanismo de ligação com o ligante, denominado "hipótese do portal", no qual a molécula de ácido graxo entra na proteína através de uma estrutura dinâmica formada pela região helicoidal antes de se prender dentro da cavidade (HODSDON; CISTOLA, 1997; HUNTER; BAKULA; BRUCE, 2018; SACCHETTINI; GORDON; BANASZAK, 1989). No interior desta cavidade, encontram-se resíduos de aminoácidos tanto hidrofóbicos quanto polares, bem como moléculas de água, todos envolvidos na interação da proteína com seu ligante (BAKOWIES; VAN GUNSTEREN, 2002), com exceção de FABP1 que pode se ligar a dois ácidos graxos ao mesmo tempo. Da mesma forma que os resíduos no interior da cavidade são fundamentais para a especificidade da ligação com os ácidos graxos, os resíduos da região do portal parecem estar relacionados à interação com a membrana e outras proteínas (ARMSTRONG et al., 2014; CORSICO et al., 1998). Corsico et al. (1998) observaram que I-FABP mutante, sem o motivo hélice-volta-hélice, era 80% menos eficiente na competição com Citocromo C pela ligação com a membrana, em relação a I-FABP selvagem, sugerindo que essa região helicoidal desempenha um papel crítico no mecanismo de transferência de ácidos graxos de I-FABP para membranas fosfolipídicas. Nesse sentido, percebe-se que a captação e o transporte de ácidos graxos mediados por FABPs é um processo altamente dinâmico. Recentemente, Cheng e colaboradores (2019), propuseram um modelo de transferência de ligantes, Figura 12, baseado em dados de ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia de raios-X de FABP-brain-type de *Drosophila* (d-FABP) com nano discos lipídicos, sugerindo que a cauda hidrofóbica do ácido graxo de cadeia longa, quando ligada, impede a interação entre d-FABP e os grupos principais da membrana, e a proteína é então, propensa a se dissociar da membrana após a ligação com o ligante. Tal proposta traz luz a ideia de que os ligantes lipofílicos participam diretamente no controle da associação com membrana funcionalmente necessária e na dissociação de FABPs.

Figura 12- Modelo para transporte dFABP regulado por ligante proposto por Cheng et al (2019). (1) A forma apo do FABP se liga à bicamada lipídica. (2) Apo-FABP desliza sob a membrana e as regiões do portal para acomodar LCFAs. (3) A forma holo-FABP, se dissocia da bicamada lipídica. (4) Importina- α reconhece o arranjo espacial do NLS na forma holo de FABPs. (5) Holo-FABP transfere o ligante para PPARs. (6) PPARs desencadeiam a transcrição de genes que produzem proteínas para o metabolismo lipídico (β -oxidação) na mitocôndria ou através de outras vias de sinalização.



Fonte: (CHENG et al., 2019)

1.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CAPÍTULO II

O tráfego de ácidos graxos nas células é um processo complexo e dinâmico que afeta muitos aspectos da função celular. Os ácidos graxos funcionam como fonte de energia e como sinais de regulação metabólica, atuando através de redes enzimáticas e transcricionais modulando a expressão gênica, as vias de proliferação e sobrevivência além de respostas inflamatórias e (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008; STORCH; THUMSER, 2000). As FABPs são proteínas que se ligam reversivelmente a ligantes hidrofóbicos, como ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa, eicosanóides e outros lipídios, com alta afinidade (SCHAAP; VAN DER VUSSE; GLATZ, 2002). Em humanos são reguladas por fatores de transcrição e participam da regulação de vários genes através da interação com alguns fatores de transcrição (ARMSTRONG et al., 2014; VELKOV, 2013). Coordenam as respostas lipídicas

nas células e estão fortemente ligadas às vias do metabolismo energético de lipídios, bem como a captação, transporte e armazenamento, escoltando lipídios intracelulares e ditando suas funções biológicas (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008; HAUNERLAND; SPENER, 2004; SMATHERS; PETERSEN, 2011). Também são potenciais alvos terapêuticos para várias doenças, com destaque para FABP4, relacionada na literatura com enfermidades como, obesidade, diabetes e aterosclerose, devido ao seu papel nas vias de sinalização, ligação com outras proteínas citosólicas e transporte de ácidos graxos (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008).

Apesar dos esforços para determinar os principais fatores estruturais que contribuem para a ligação lipofílica, como os ácidos graxos de cadeia longa são transportados em uma direção definida pelas FABPs, de um doador (membrana) para um receptor (membrana ou proteína), esses fatores permanecem em grande parte desconhecidos (CHENG et al., 2019; CORSICO et al., 1998). Devido à complexidade do processo dinâmico, interação FABP-membrana, FABP-ligante e FABP-proteínas citosólicas, se faz necessário o uso de ferramentas modernas de biologia estrutural, nas quais seja possível racionalizar o processo em níveis de resíduos ou em níveis atômicos da forma mais realística o possível. Sendo assim, devido ao papel central no metabolismo energético dos adipócitos, a isoforma FABP4 humana foi eleita como modelo deste estudo. Um modelo de investigação do processo dinâmico de captação e transporte de ácidos graxos mediados por FABP4 foi construído, através de técnicas de bioinformática estrutural, bem como de uma variante desta isoforma em particular. Este trabalho, uma vez que se apresenta em consonância com dados experimentais da literatura, poderá ser um modelo bastante útil para elucidar mecanismos dinâmicos de FABPs em geral com aplicações em estudos de biologia comparada.

2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o processo dinâmico de captação e transporte de ácidos graxos de cadeia longa, por FABP4, em um sistema biológico complexo de membrana.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Reproduzir *in silico* um modelo de captação e transporte de ácidos graxos de cadeia longa como o ácido palmítico em membrana;
- II. Avaliar como mutações pontuais na sequência de FABP4 implicam em mudanças na estrutura tridimensional e no processo dinâmico dessa proteína.

3 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado em duas etapas de estudo de dinâmica molecular (MD). A primeira delas envolvendo técnicas de MD atomística para avaliar os movimentos da estrutura em meio livre de ligante, com ligante disponível no solvente e por fim, com ligante complexado a proteína de interesse. Posteriormente, com as informações obtidas nessa primeira etapa foram reproduzidos modelos em *Coarse-Grained* (CG) para avaliar os choques de FABP4 selvagem e uma variante (F28I) com a membrana plasmática.

3.1 DINÂMICA MOLECULAR

3.1.1 Atomística

A partir da estrutura cristalográfica da FABP4 humana (PDB: 2HNX com resolução de 1,9Å) (MARR et al., 2006), foram realizadas duas simulações de 500ns cada, através do GROMACS 2019.3 (*Groningen machine for chemical simulations*) (ABRAHAM et al., 2015; BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995; LINDAHL et al., 2019a, 2019b). O campo de força CHARMM36 (VANOMMESLAEGHE et al., 2010) foi o utilizado. O tempo de integração das simulações foi de 2fs. O complexo solvatado em um dodecaedro com moléculas de água, modelo TIP3P. Foram adicionados ao sistema 150 mM de NaCl, além de contra íons para atingir a neutralidade da carga. Posteriormente uma minimização de energia e duas equilibrações de 500 ps foram realizadas com restrição de posição para o esqueleto

proteico. As dinâmicas foram realizadas com padrão de temperatura e pressão de 300 K e 1 Bar respectivamente.

Para a primeira simulação o ligante, ácido palmítico, complexado ao sítio de ligação foi retirado e a estrutura testada em condições semelhantes a forma apo, sem a presença de ligantes no sistema. Já para a segunda simulação, o ligante foi retirado do sítio de ligação e colocado de forma aleatória na caixa, a fim de avaliar o processo de captação do ácido palmítico pela FABP. A topologia do palmitato para simulação foi preparada pelo CGenFF (VANOMMESLAEGHE; MACKERELL, 2012).

3.1.1.1 Análises de simulação

Valores do desvio quadrático médio (RMSD) dos carbonos-alfa ($C\alpha$) foram calculados para avaliar as mudanças conformacionais de FABP4 para cada sistema simulado. Também os valores de flutuação quadrática média (RMSF) foram usados para descrever a flexibilidade dos resíduos nas diferentes trajetórias.

3.1.2 Coarse-Grained (CG)

3.1.2.1 Modelos de proteínas CG

Uma etapa de correção da estrutura cristalográfica de 2HNX, para retirada de resíduos extras na porção N-terminal, foi realizada através de modelagem por homologia no programa SwissModel (ARNOLD et al., 2006), tendo como estrutura de referência a própria estrutura cristalográfica de 2HNX. Após etapa de correção o modelo tridimensional foi submetido ao *script martinize2* (repositório <https://www.github.com/marrink-lab/vermouth-martinize>) (WASSENAAR et al., 2013, 2015b) para conversão em estrutura CG Martini 3.0 (<http://cgmartini.nl>) (SOUZA et al., 2021) e para determinar as estruturas secundárias foram utilizados os parâmetros DSSP (KABSCH; SANDER, 1983). Para obter os modelos das variantes de FABP4, mutações foram realizadas na estrutura corrigida, através de uma opção adicional para mutações no *script martinize2*.

3.1.2.2 Modelo de membrana biológica

Foi construída uma composição de membrana de fosfatidilcolina (POPC) e palmitato (PCN) através do *script insane.py* (WASSENAAR et al., 2015a). Uma topologia de PCN nos parâmetros de martini3.0 foi gerada (APÊNDICE A), baseada no modelo deste ácido graxo em martini2.0 (http://cgmartini.nl/images/parameters/lipids/FA/PCA/martini_v2.0_PCN_01.itp).

3.1.2.3 Parâmetros de simulação

As simulações foram rodadas com o software GROMACS 2019.3 (ABRAHAM et al., 2015; BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995; LINDAHL et al., 2019a, 2019b), usando os parâmetros de integração e de interação intermolecular tipicamente utilizados para o modelo Martini (DE JONG et al., 2012; MARRINK et al., 2007; PERIOLE et al., 2009). O campo de força CG martini3.0 (SOUZA et al., 2021) foi utilizado para modelar o sistema, com restrição de estrutura secundária do tipo rede elástica EIneDyn (PERIOLE et al., 2009). Foram adicionados ao sistema 150 mM de NaCl, além de contra-íons Na^+ , após a solvatação, para atingir a neutralidade da carga. O sistema foi submetido a um processo de minimização de energia, seguido de equilibrações, primeiro a condições de um conjunto isotérmico-isovolumétrico (NvT), e posteriormente isotérmico-isobárico (NpT), a 300 K e 1 bar. As corridas de simulação partiram destas estruturas equilibradas e tiveram tempo mínimo de 5 μs . Foram realizadas 5 replicadas, totalizando 25 μs de simulação por sistema.

3.1.2.4 Análises de simulação e estatística

Algoritmos de análise baseado em Python, foram adaptados dos scripts desenvolvidos por Manuel N. Melo e disponíveis em (<http://www.itqb.unl.pt/labs/multiscale-modeling/>), usando os pacotes MDanalysis (MICHAUD-AGRAWAL et al., 2011) (<https://www.mdanalysis.org>), NumPy (VAN DER WALT; COLBERT; VAROQUAUX, 2011) e MDreader (<https://github.com/mnmelo/MDreader>). Os scripts foram adaptados para obter o mapeamento e frequência dos contatos entre FABP e membrana, dentro de um limite de corte de 0.7Å para qualquer resíduo da proteína com as cabeças polares de PCN ou POPC (*beads* Q1, PO4 e NC3). Também foram analisados os tempos de residência entre os eventos de ligação, considerando um evento de ligação como, contato entre uma partícula do grupo principal (Q1 em PCN ou PO4 e NC3 em POPC) dentro de 7Å com pelo menos dois grupos de

resíduos, definidos na região das α -hélices I e II (K22, F28, A29, R32), loop β C/D (F58) e β I/J (K121).

Dois tipos de análises estatísticas foram empregados tanto na distribuição dos tempos de residência do contato quanto nas frequências, os dados são apresentados como valores médios ponderados no tempo, com intervalos de confiança de 95% estimados por *bootstrapping* de reamostragem de dez mil da média ponderada no tempo e o nível de significância para a diferença entre as durações de ligação foi obtida por Teste U de Mann-Whitney-Wilcoxon. Os softwares Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) e Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015) foram usados para criar figuras e filmes.

3.2 BUSCA POR VARIANTES DA FABP4

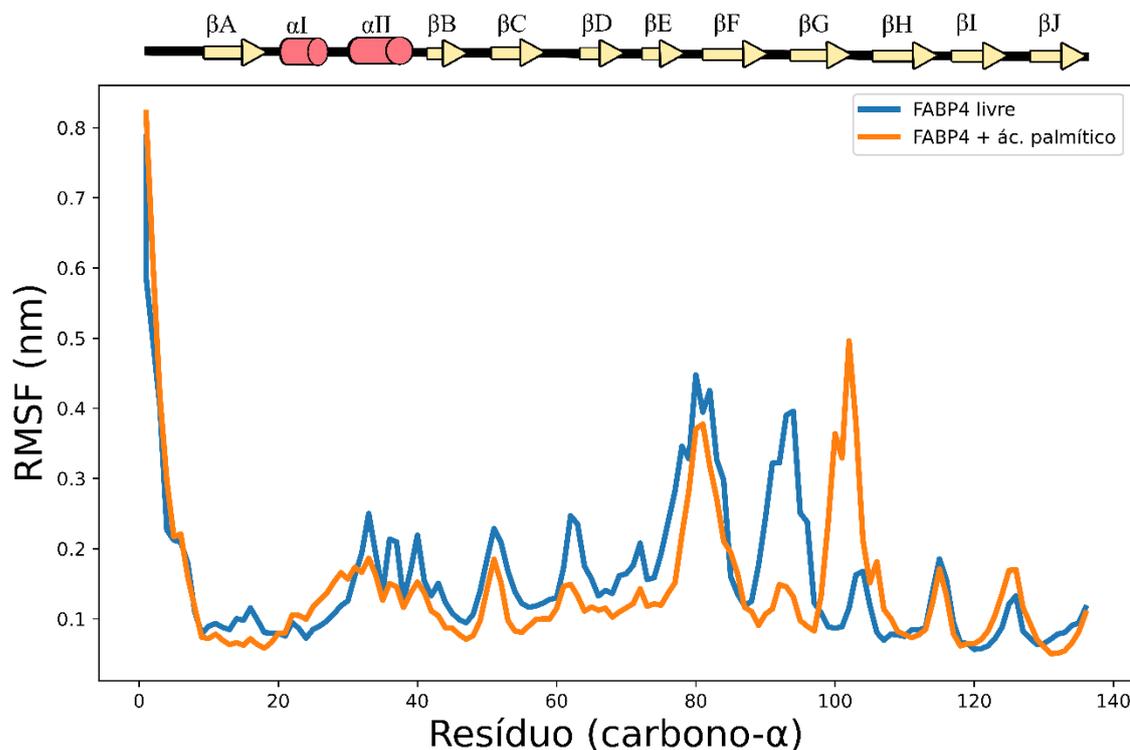
A partir do *Genome data base Ensembl* (HUNT et al., 2018) foram buscadas as sequências dos genes de FABP para a espécie humana. Tabelas em formato CSV foram baixadas do banco de dados, com as informações sobre todas as variantes disponíveis. Esses dados foram então submetidos a filtros em Python, utilizando os pacotes Numpy (VAN DER WALT; COLBERT; VAROQUAUX, 2011) e Pandas (REBACK et al., 2021), que foram desenvolvidos para retornar apenas as variantes do tipo *missense*, na qual mutações pontuais resultam em uma única alteração de nucleotídeo que, por sua vez, resulta em um códon que codifica para um aminoácido diferente na estrutura final. Os dados filtrados foram cruzados com os resultados da etapa de mapeamento de resíduos e frequências de contato, descritas na subseção 4.4 e a variante selecionada para teste CG.

4 RESULTADOS

4.1 ESTRUTURA GLOBAL E FLEXIBILIDADE DA FABP4

A estrutura de FABP4, com e sem ligante, foi submetida a 500ns de simulação da dinâmica molecular e os valores de flutuação média do carbono- α por resíduo (RMSF) estão representados na Figura 13. Quanto maiores os valores de RMSF maior a flexibilidade da região. Para a simulação na forma apo (livre de ligante), os locais de maior mobilidade foram as regiões N-terminal, loops β EF e β FG. Apesar de menor, também foi observada flexibilidade nas regiões das α -hélices, loops β BC e β CD.

Figura 13- Flutuações da raiz quadrática média (RMSF) dos átomos de $C\alpha$ de FABP4 em sistema apo (livre de ligante) e holo (com ligante). Em azul a estrutura livre e em laranja complexada à ácido palmítico.



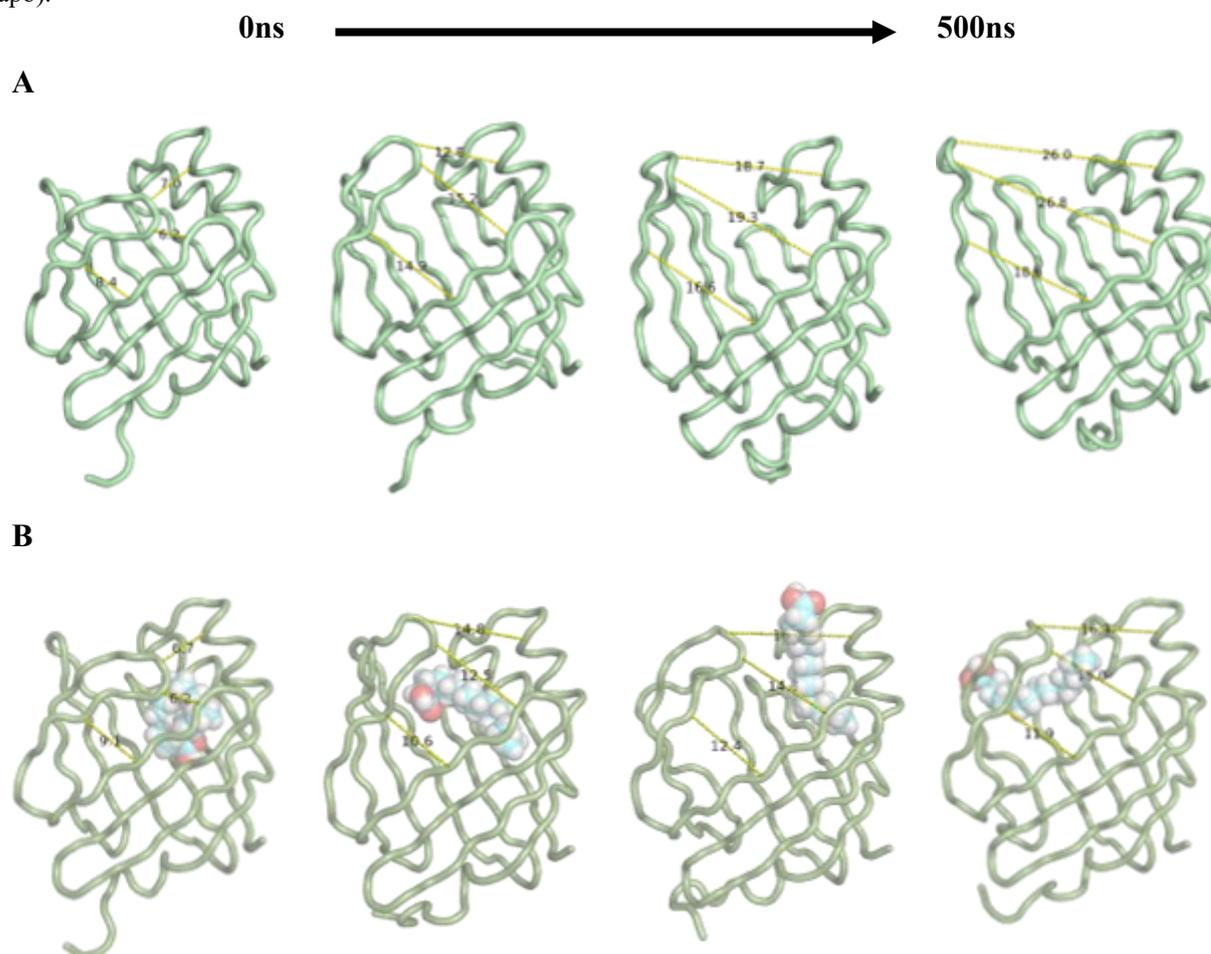
Fonte: Própria autora.

Ao comparar na Figura 13, os valores de RMSF da estrutura complexada ao ácido palmítico (linha laranja) no sítio de ligação, apesar de em menor escala, seguiu o mesmo padrão de flexibilidade da estrutura apo, indicando uma tendência natural de movimento na maioria das regiões observadas, com exceção da região que compreende as fitas β F/G/H. De maneira geral os valores de flutuação mostraram que, quando comparadas as duas simulações, FABP4

livre e FABP4-ác.palmítico, observou-se maior estabilidade geral da estrutura quando na presença do ligante no sistema.

As trajetórias de simulação da dinâmica molecular mostraram que a flexibilidade das fitas β EF influenciaram diretamente na abertura de uma região específica que poderia dar acesso ao bolsão de ligação em FABP4 apo, Figura 14A. A mesma flexibilidade ocorreu no sistema holo (FABP4+ác. palmítico), contudo, as restrições espaciais provocadas pelo ligante nas demais regiões pareceram não permitir uma abertura de mesma magnitude (Figura 14B), como a observada na forma apo, dentro do tempo simulado.

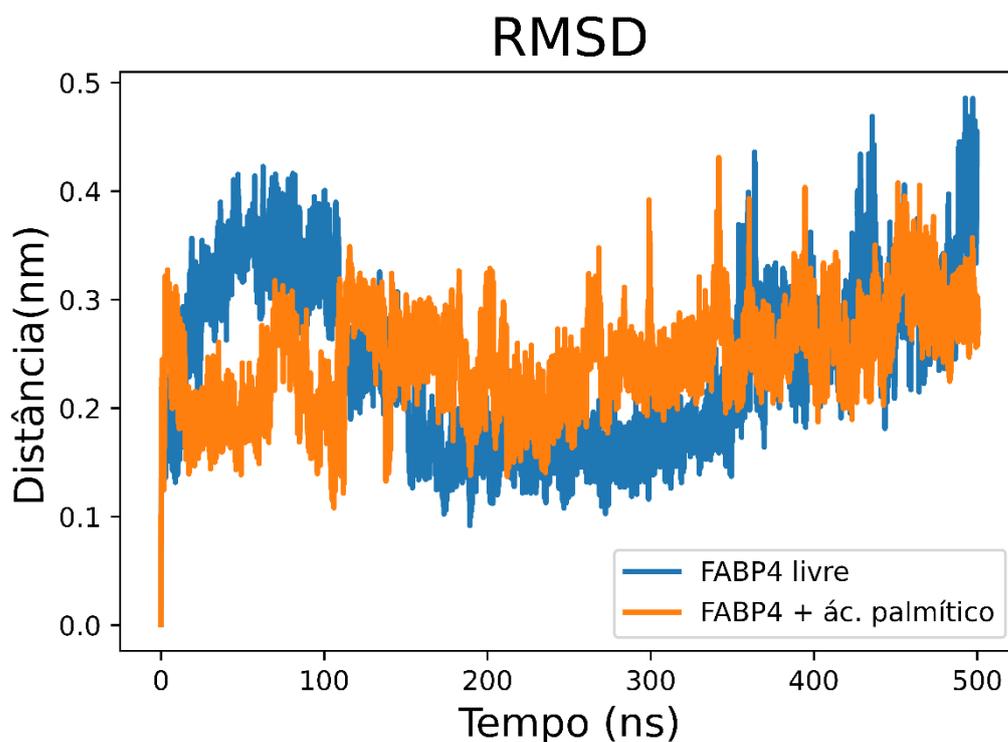
Figura 14- Conformação geral da estrutura de FABP4 ao longo de 500ns de simulação. Em (A) sequências de *snapshots* da forma apo mostrando o distanciamento das fitas BE/F e abertura do barril. (B) Na presença do ligante onde abertura do barril é um pouco menor (em média 25% menor quando comparado a abertura máxima na forma apo).



Fonte: Própria autora utilizando o programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

O movimento de abertura da proteína, observado pelo distanciamento da região $\beta E/\beta F$ juntamente com os valores de RMSD (Figura 15), mostraram uma dinâmica variável da estrutura apo, com seguidos movimentos de abertura e fechamento ao longo do tempo. A primeira abertura de FABP4 livre foi observada durante os 100ns iniciais da trajetória e posteriormente, uma segunda vez em 380ns, se estendendo até o fim da simulação, com a maior distância de abertura obtida em 500ns. Em contrapartida, não se observaram movimentos repetidos de abertura e fechamento no sistema holo, e em geral o esqueleto se manteve estável em torno de 2,5Å depois de 100ns de simulação. A estabilização obtida na simulação holo tem relação com as interações do ácido palmítico dentro da cavidade interna de FABP4. É possível observar na Figura 14 que a cauda apolar do ligante se manteve estabilizada principalmente na região das hélices, enquanto a cabeça polar explorou tanto ligações com $\beta E/\beta F$ quanto o ambiente de solvente. Ao longo de 500ns, o ácido palmítico se manteve nessa região próxima as hélices, indicando uma estabilidade muito grande dessa interação e uma preferência de ligação.

Figura 15- Comparação do desvio médio quadrático do *backbone* de FABP4 livre e complexado com ácido palmítico. Para forma apo (em azul) é possível identificar três momentos de movimentos grandes da estrutura, relacionados a abertura, fechamento do barril. Enquanto em laranja, a forma holo se mantém na mesma média de desvio após 100ns de simulação.

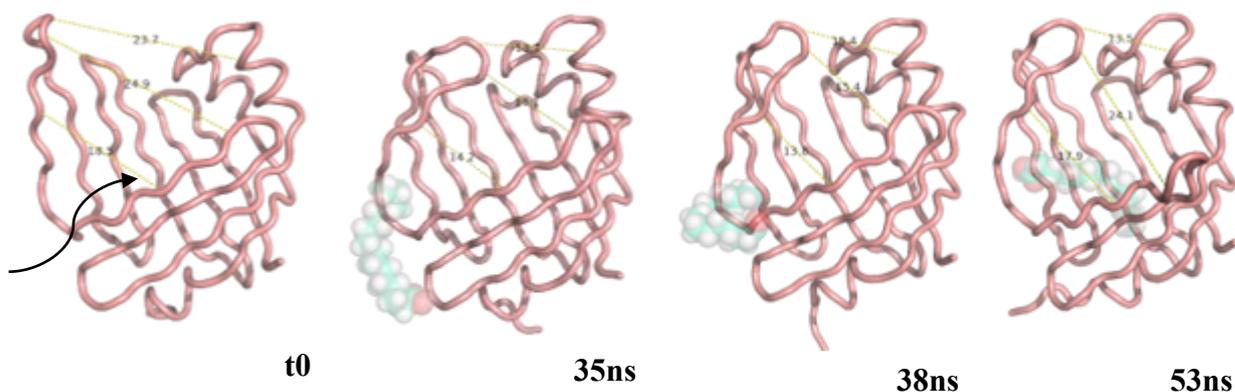


Fonte: Própria autora.

4.2 MODELO DE CAPTAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO DA FABP4

A entrada e saída dos ácidos graxos nas FABPs são fenômenos importantes para a compreensão do processo biológico. Responder as perguntas sobre quais vias de acesso os ligantes possuem pode trazer luz aos mecanismos bioquímicos envolvidos, apontando aminoácidos chave para essas funções. Com objetivo de avaliar a captação de ácidos graxos na membrana, a estrutura da FABP4 na forma apo obtida após 500ns de simulação foi utilizada como estrutura inicial em uma nova simulação. Uma molécula de ácido palmítico foi adicionada de forma aleatória no sistema em caixa de água. Após 35ns de trajetória o ácido graxo se aproximou da base das fitas β D/ β E, ancorando a cabeça polar nos resíduos de E61 e S63 da fita β D, até que as fitas atingissem uma distância mínima de 17,9 Å (Figura 16). Essa abertura foi suficiente para a entrada do ácido graxo no bolsão através da interação da cauda apolar com os resíduos internos da cavidade e da cabeça polar com resíduo F70. O tempo entre a aproximação e a entrada do ligante no bolsão de ligação foi relativamente curto e ocorreu em um intervalo de 18ns. A trajetória completa pode ser observada na Figura 16.

Figura 16- Movimento de captação do ácido graxo dentro da cavidade por uma abertura nas fitas β CD e β DE, que formam uma via de acesso. A entrada é favorecida por interações da cauda apolar do ác.palmítico com os resíduos da cavidade interna e por interações da cabeça polar com resíduos das fitas β C/D (E61, S63 e F70)

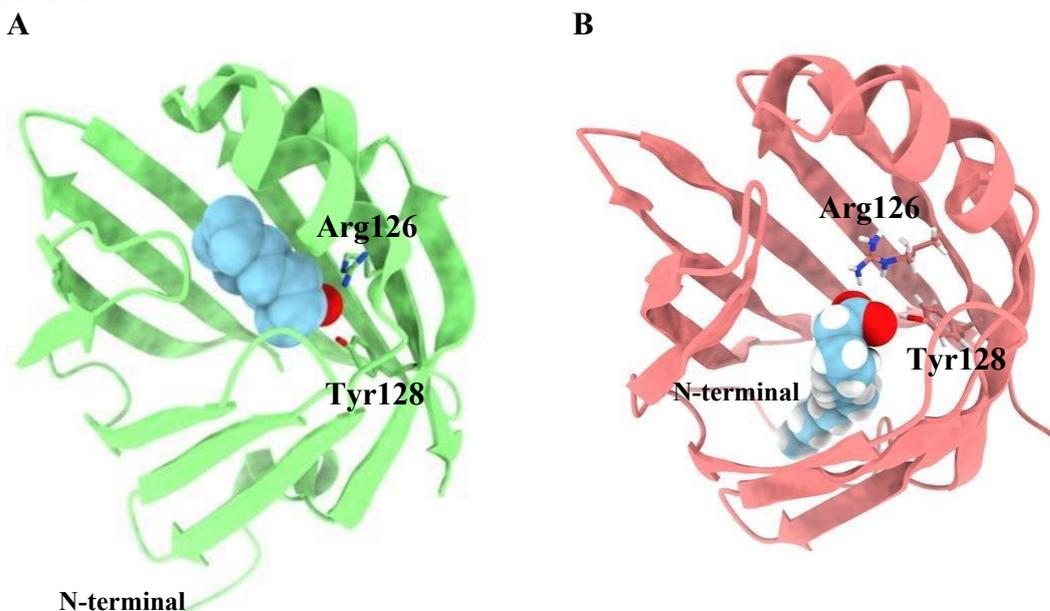


Fonte: Própria autora utilizando o programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

Depois da internalização do ligante, o ácido palmítico permaneceu o restante da simulação na cavidade interna da FABP4. Quando comparadas as posições de ligação do complexo formado com a posição da estrutura de cristalográfica 2HNX, foram encontradas as mesmas interações do grupo carboxila do ácido palmítico com os resíduos R126 e Y128 (Figura 17). Contudo a cauda apolar da simulação difere da referência, uma vez que, permanece sempre

voltada para região N-terminal, enquanto em 2HNX está voltado para as α -hélices. Isto sugere que a simulação foi bem-sucedida ao identificar a entrada e os aminoácidos chave para a interação, porém a conformação do ligante não ocupou o mesmo local na cavidade interna.

Figura 17- Mesmas interações fundamentais de R126 e Y128 (doadores de hidrogênio de cadeia lateral) com o grupo carboxila de ác.palmítico. Em (A) estrutura cristalográfica de FABP4 (2HNX), e em (B) a estrutura 3D simulada.



Fonte: Própria autora utilizando o programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

4.3 VARIANTES DA FABP4

Uma das vantagens ao utilizar um sistema de simulação dinâmica Coarse-grained é a maior velocidade de cálculo (quando comparado ao modo atomístico tradicional) e a possibilidade de trabalhar com sistemas complexos, como o caso das membranas (MARRINK et al., 2007; SOUZA et al., 2021). Sendo assim, nesta etapa do trabalho foram investigadas variantes da FABP4 para testar a capacidade de um possível *screening* de variantes no genoma. Desta forma seria possível, com o pipeline desenvolvido neste trabalho, por exemplo, avaliar preferências genômicas de determinadas variantes de FABP por membranas.

No banco de dados *Genome data base Ensembl* (HUNT et al., 2018) estão depositadas 1.355 variantes para o gene de FABP4. Esse valor alto inclui todos os tipos de mutações existentes, que vão desde variantes intrônicas, 5' e 3'UTR, variantes de *splicing*, mutações sinônimas e não sinônimas, entre outras. Desse total foram filtradas 114 variações do tipo não sinônimas.

Valores de frequência para os contatos dos resíduos de FABP4 com a membrana foram calculados e serão apresentados com detalhes na próxima seção (4.4). Os valores mais altos de frequência de contato foram ranqueados resultando em seis resíduos. Estes aminoácidos foram então cruzados com a lista de variantes não sinonímias e derivaram em três variantes em potencial: F28I, A29P e F58L. A de maior contato com a membrana e primeira na posição do ranking (F28I) foi a escolhida para ser testada em MD *coarse-grained* e comparada com o tipo selvagem.

Tabela 2-Tabela de variantes possíveis de serem testadas após o cruzamento de dados com os valores das frequências de contato dos resíduos de FABP selvagem com a membrana.

Posição	Frequência de contato (nm)	Erro mínimo (Emin)	Erro máximo (Emax)	Ponto de corte ²	Mutação	Consequência
22	0.0190	0.0066	0.0084	0.0124		
28	0.0376	0.0129	0.0162	0.0247	F/I	não sinonímia
29	0.0261	0.0101	0.0117	0.0160	A/P	não sinonímia
32	0.0243	0.0097	0.0112	0.0146		
58	0.0243	0.0095	0.0094	0.0148	F/L	não sinonímia
121	0.0211	0.0068	0.0125	0.0143		

Fonte: Valores obtidos a partir do cruzamento de dados das variantes do Ensembl (HUNT et al., 2018) com os resultados das simulações do tipo selvagem de FABP4.

4.4 MODELO DE INTERAÇÃO DA FABP4 COM A MEMBRANA E O EFEITO SOBRE A VARIANTE F28I

Para obter maior confiabilidade nos dados, uma das vantagens do sistema *Coarse-grained* (CG) é trabalhar os fenômenos biológicos através de réplicas de forma mais acelerada quando comparado a metodologia atomística. No total foram realizadas cinco réplicas, totalizando 25 μ s de trajetória, de CG por sistema avaliado (FABP4 e F28I). Os valores médios de frequência de contato para cada resíduo de FABP com a membrana foram calculados, junto com a margem de erro entre as amostras (réplicas).

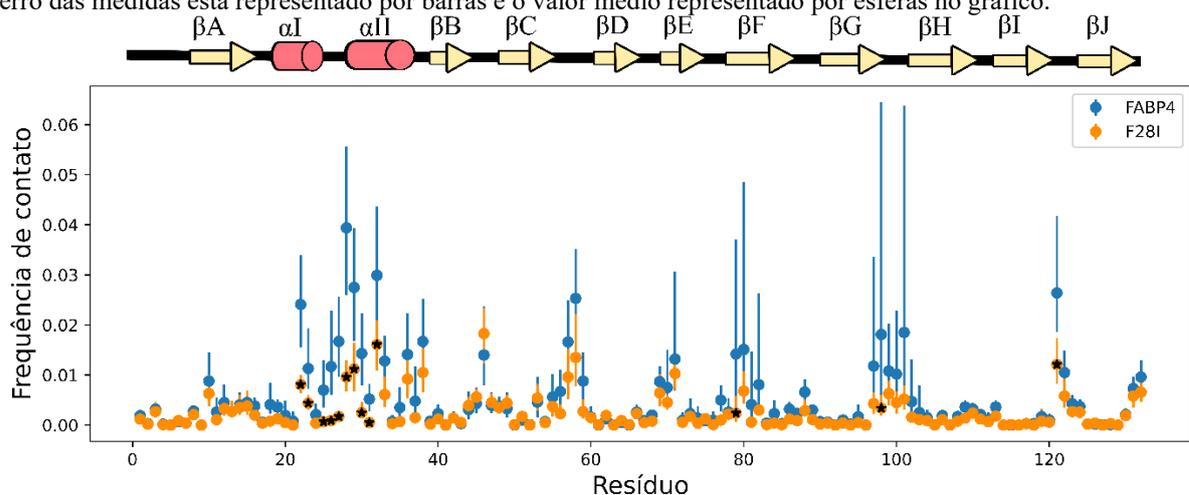
Como resultado, no tipo selvagem da FABP4 foi observado que a região das hélices apresentou os maiores valores de contato com a membrana e menor variabilidade entre os dados, enquanto a região de loop β GH apresentou maior variabilidade. (Figura18). Quando

² Ponto de corte = (Frequência de contato - Emin) \geq 0.01

ranqueados os resíduos de maior contato, considerando o intervalo de confiança, foi encontrada uma preferência de ligação com a membrana através dos resíduos K22, F28, A29, K32, F58 e K121, indicando que este conjunto de aminoácidos formam um provável sítio de ligação com a membrana. Quatro desses resíduos, que parecem ser fundamentais para interação, estão localizados na região das α -hélices, com a cadeia lateral voltada para o meio externo (K22, F28, A29 e K32), enquanto os outros dois aminoácidos estão localizados no loop β CD e loop β IJ, ambos adjacentes e próximos das hélices I e II (Apêndice C). Um vídeo ilustrativo do processo de ligação descrito pode ser acessado no Apêndice C ou no link (<https://youtu.be/UnDxEAU7eyw>).

Considerando que F28 foi o resíduo que mais entrou em contato com a membrana, nas simulações do tipo selvagem, e que esta posição apresentava uma variante depositada no banco de dados, a mutação F28I e a interação com a membrana foi avaliada. Quando comparado com os resultados do tipo selvagem, observou-se que há uma diminuição na frequência com que todas as regiões de FABP4(F28I) entraram em contato com a membrana, principalmente na região das α -hélices, em que a diferença é significativamente menor. Resíduos cuja diferença é significativa entre as simulações (selvagem versus variante) estão assinalados com “*” na Figura 18.

Figura 18- Gráfico de mapeamento das interações de FABP4 selvagem e F28I com a membrana, a partir dos dados de frequência de contato por resíduo. Para o tipo selvagem, em azul, a região das hélices I e II representam o local de preferência de ligação com a bicamada lipídica, enquanto para o mutante F28I essas interações são menores. O erro das medidas está representado por barras e o valor médio representado por esferas no gráfico.

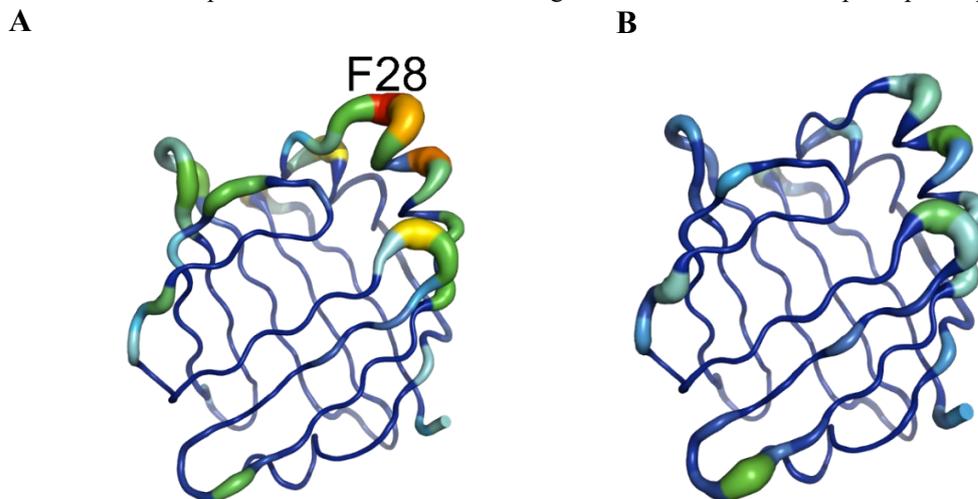


Fonte: Própria autora.

Se transportados os valores de frequência para a estrutura 3D (Figura 19) é possível ter uma ideia do efeito geral que uma única mutação, de um resíduo chave, poderia provocar na

dinâmica de interação com a membrana. Os dados indicaram que a presença de F28 na α -hélice I aumentou a frequência com que FABP4 interagiu com a bicamada lipídica. Foi observado que quando mutada para Ile toda a região do sítio de ligação com a membrana foi afetada, apontando para um possível papel de F28 no direcionamento, no ancoramento ou na aproximação com esta membrana.

Figura 19- Frequências de contato em representação 3D . Para o tipo selvagem (A) a frequência de interação com a membrana é maior em todas as regiões de estrutura secundária, principalmente na posição F28, cuja a mutação para Ile (em B) provoca fortes mudanças no contato entre as duas biomoléculas. Na representação quanto maior o contato mais cores quentes são observadas e mais largas são as linhas da cadeia principal da proteína.

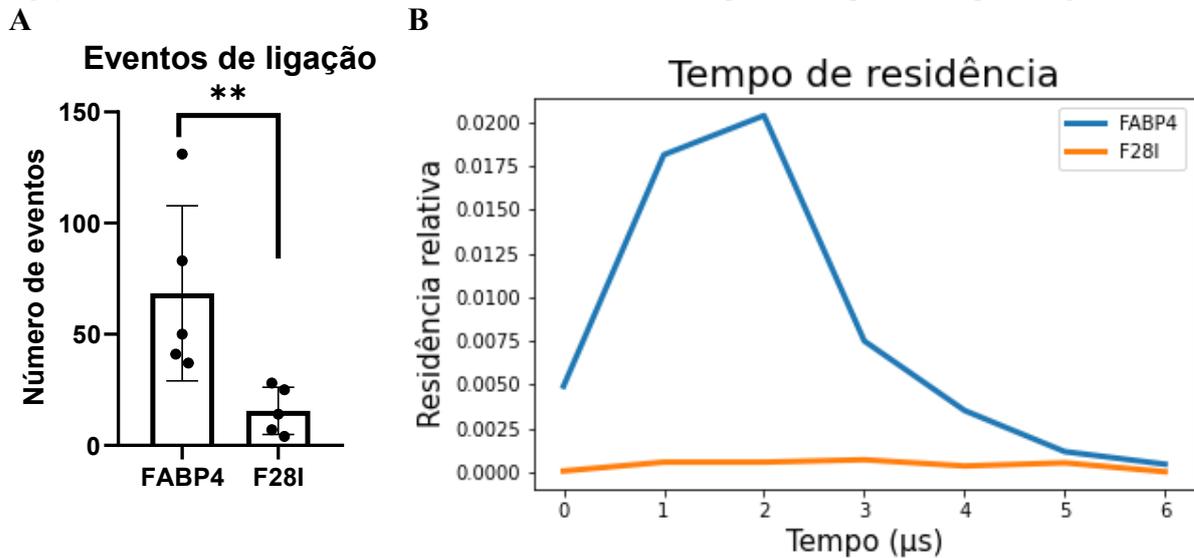


Fonte: Própria autora utilizando o programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

Considerando o sítio de ligação com a membrana como sendo a região que compreende os resíduos K22, F28, A29, K32, F58 e K121, foram calculados o número de vezes em que FABP4 e mutante (F28I) realizaram ligação por um período maior do que cinco frames com a membrana. A substituição de F28 por I28 em FABP4 reduziu significativamente ($p < 0,005$) o número de eventos de ligação com a membrana (Figura 20A) e o tempo de residência no sítio de ligação (Figura 20B). Os resultados mostraram, portanto, que o número de eventos de ligação do mutante F28I foi significativamente menor em relação ao tipo selvagem.

Figura 20- (A) Número de eventos de ligação de FABP (selvagem e mutante) com a membrana, com redução significativa nas quantidade de ligação da variante (F28I). Barras de erro indicam intervalos de confiança de 95%.

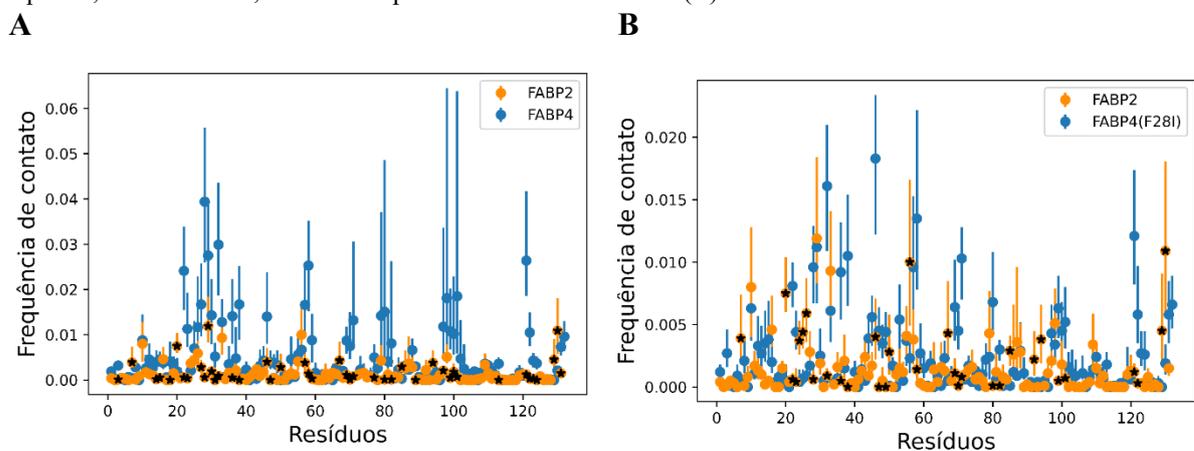
** $p < 0,005$ pelo teste U de Mann-Whitney-Wilcoxon. (B) Diferença relativa entre o tempo de interação durante a ligação, sendo a residência do mutante F28I relativamente menor quando comparada ao tipo selvagem.



Fonte: Dados produzidos pela autora.

Tendo em vista o efeito significativo da mutação F28I na dinâmica de interação com a membrana, foram alinhadas a sequência de FABP4 com as outras isoformas humanas e percebeu-se que a presença de Ile na posição 28 não é incomum Figura 22. Para avaliar a importância de Phe na hélice II foram simuladas réplicas de CG da isoforma FABP2 e comparadas com FABP4 e a variante F28I. Os resultados mostraram que FABP2 teve um comportamento dinâmico muito mais próximo da variante F28I, com quem compartilha Ile na posição 28, do que com FABP4, como mostra a figura 21 a seguir.

Figura 21-(A) Comparação das frequências com que cada resíduo de FABP2, FABP4 selvagem e FABP4 mutante interagem com a membrana. (A) Os valores de FABP2 são significativamente menores em relação a FABP4, enquanto, são em escala, muito mais próximos da variante F28I (B).



Fonte: Própria autora.

5 DISCUSSÃO

As proteínas de ligação com ácidos graxos (FABPs) coordenam o tráfego de lipídios celulares, principalmente ácidos graxos de cadeia longa. Evidências sugerem que, uma vez absorvidos pelos fosfolipídios da membrana celular, esses LCFA são sequestrados e administrados por FABPs (CHENG et al., 2019; STREMMEL et al., 2001). Embora muitos estudos tenham sido realizados para determinar os principais fatores estruturais e dinâmicos que contribuem para a ligação de ligantes lipofílicos e como esses são transportados em uma direção definida por FABPs, de um doador específico (membrana) para um acceptor (membrana ou proteína), a questão permanece em grande parte desconhecida (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008; PRENTICE; SAKSI; HOTAMISLIGIL, 2019).

Devido à natureza dinâmica dos processos de captação de ligantes, apenas estudos estruturais têm sido insuficientes para revelar as vias de interação. Além disso a natureza transitória e complexa desse processo dinâmico torna difícil a investigação experimental em nível atômico. Nesse sentido, a simulação de dinâmica molecular (MD) tem sido amplamente utilizada para explorar a dinâmica de FABPs, bem como sua interação com ácidos graxos (FRIEDMAN; NACHLIEL; GUTMAN, 2005; HUNTER; BAKULA; BRUCE, 2018; LONG; MU; YANG, 2009; MATSUOKA et al., 2015).

Os resultados deste trabalho apontaram para dois estados conformacionais distintos de FABP4, sendo um dos estados favorecido em condições apo (estado mais aberto, livre de ligante) e outro favorecido em condições holo (mais fechado e com ligante). O estado aberto corresponde ao tempo final de um processo de abertura da estrutura que se deu principalmente pelo distanciamento das fitas β D/E (distância máxima medida igual a 17,9 Å na base das fitas) (Figura 14). A mudança conformacional pode ser suportada por dados de NMR de FABP3 que mostram que nessa isoforma as fitas β D/E não estão dentro da distância de ligação de hidrogênio, e o espaço entre elas é referido como uma lacuna na estrutura. E na cavidade de ligação, um LCFA é ligado e ancorado em um dos átomos de oxigênio do grupo carboxila pelas cadeias laterais de R126 e Y128 (SCAPIN et al., 1993; YOUNG et al., 1994; ZANOTTI et al., 1992). As mesmas interações de ligação encontradas na cristalografia de FABP4 (PDB: 2HNX) foram evidenciadas nas simulações deste trabalho após a captação do ácido palmítico (Figura 17). Já a cadeia alquílica do LCFA ligado na estrutura experimental, interage com os resíduos hidrofóbicos que revestem a cavidade, a maioria deles localizados na hélice II e nos loops β CD

e β EF (MARR et al., 2006; SCAPIN et al., 1993; YOUNG et al., 1994; ZANOTTI et al., 1992). Essa disposição da cauda apolar foi encontrada na simulação cuja posição inicial o ácido palmítico já estava complexado a FABP4, e explica a restrição dessas regiões no gráfico de RMSF (Figura 13), principalmente quando comparadas com a simulação na forma apo. Em contrapartida, esse arranjo da cadeia alquílica não foi visualizado no modelo de captação proposto neste trabalho, muito possivelmente por interferência da região N-terminal, cuja sequência apresentava cinco resíduos extras (RGS₅H₅M), ou pelo modo de entrada do ligante que encontrou um ambiente favorável para acomodação. Para solucionar a questão da acomodação adequada e adicionar estatística as trajetórias, réplicas do sistema de captação poderiam ser realizadas com a retirada dos resíduos extras provenientes da estrutura cristalográfica de 2HNX.

Na tentativa de caracterizar ainda mais a interação de FABP4 com a membrana, cujos estudos são escassos, neste trabalho, foram analisados os choques dessa isoforma com a bicamada lipídica, mapeando a frequência de contatos, na resolução de resíduos, e identificando um provável sítio de ligação. Os resultados apontaram para uma preferência de contato da membrana, no tipo selvagem, pelos resíduos localizados na região α -helicoidal (K22, hélice I e F28, A29 e K32 na hélice II), loops β CD (F58) e β IJ (K121), sendo a posição F28 a de maior contato (Figura18). Em contrapartida, a variante F28I apresentou maiores contatos na região dos loops β CD e das hélices, embora a frequência desta última, seja significativamente menor do que a do tipo selvagem. Cheng et al. (2019), em estudos de RMN com nano discos lipídicos (mimetizadores de membrana), descreveram que para d-FABP na forma apo, ocorre uma interação com a membrana primeiro por meio de loops β EF e β GH, possivelmente por meio de uma interação carga-carga envolvendo resíduos carregados e os grupos principais da bicamada lipídica. Esta interação é seguida pelo portal da α -hélice II e cadeias β DE formando uma interação mais estável com a membrana.

Aos comparar os dados simulados de mapeamento dos contatos da FABP4 com membrana, percebe-se que todas as regiões descritas por Cheng et al. (2019), coincidem com as regiões de maior variabilidade e frequência de contatos (Figura18) encontradas neste estudo. Ainda segundo os achados de Cheng et al. (2019), as fitas β EF anfífilicas controlam a entrada do ligante, potencializando sua flexibilidade intrínseca ao interagir com a membrana. Se tomados em conjunto com os dados desse trabalho, é possível que as interações de FABPs em geral com a membrana se deem pela região superior do barril- β através da interação com as α -hélices e loops adjacentes. Uma vez que a FABP esteja complexada à bicamada lipídica, a via

Da mesma forma, que a substituição de F28 parece diminuir a interação com a membrana, é possível que as isoformas de FABP3, FABP7 e FABP9, que compartilham de Phe na mesma posição, apresentem um comportamento mais parecido com FABP4 do tipo selvagem. Nesse sentido, mais testes CG podem ser realizados para verificar esta hipótese. Contudo, de maneira geral, os resultados do presente trabalho indicam que a presença de F28 em FABP4 aumentam as chances de interação com a membrana e o que possivelmente pode estar relacionado a capacidade dessas isoformas de desempenharem papel crítico em tecidos metabolicamente muito ativos, FABP4 em adipócitos, FABP3 em miócitos cardíacos e FABP7 e FABP9 em células tumorais.

Ainda no contexto de FABP4 é esperado que mutações que diminuam sua atividade de transporte de LCFAs possam ser benéficas em situações específicas do metabolismo energético, e possivelmente, por conta disso, seja possível encontrar essa variação no banco de dados como não deletéria e sem significado clínico (rs770030293 Relatório RefSNP - dbSNP - NCBI). Segundo Furuhashi & Hotamisligil (2008), as FABPs são necessárias para ajustar o equilíbrio entre a disponibilidade de recursos metabólicos e o controle das respostas inflamatórias. Evolutivamente, quando humanos enfrentavam condições de fome ou pressão de patógenos, a presença de FABP4 pode ter sido benéfica, garantindo uma forte resposta imunológica dos macrófagos ou mantendo os estoques de energia adequado no tecido adiposo (PRENTICE; SAKSI; HOTAMISLIGIL, 2019). No entanto, a mudança no estilo de vida dos humanos contemporâneos, no sentido de ingestão calórica excessiva e contínua, gasto energético reduzido e estilo de vida estressante, tem nos levado em direção a uma epidemia de obesidade e doenças metabólicas crônicas, tendo possivelmente FABP4 como uma das protagonistas nesse processo e ao invés de manter a homeostase inflamatória e metabólica, estariam agora facilitando a formação de doenças como obesidade, diabetes, dislipidemia, aterosclerose e respostas imunológicas inadequadas (FURUHASHI; HOTAMISLIGIL, 2008; PRENTICE; SAKSI; HOTAMISLIGIL, 2019).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados deste trabalho mostraram que foi possível reproduzir um modelo de captação de ácido graxo por FABP e de choque com a membrana, condizente com dados experimentais de RMN. O resíduo de F28 na hélice II parece ser chave para o mecanismo de interação de FABPs com a membrana e mutações nessa posição podem ter efeitos expressivos na dinâmica de interação. A metodologia empregada pode ser estendida ao estudo de mais isoformas assim como também em uma estratégia de triagem para possíveis inibidores de FABP4, tendo em vista o interesse recente da comunidade científica na descoberta de compostos deste tipo. Além disso, a utilização de dinâmica acelerada CG permite o estudo mais aprofundado de outras interações que não foram avaliadas neste estudo, como ligação de FABP4 com outras proteínas, a exemplo da α -importina e PPARs.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.
- ARMSTRONG, E. H. et al. Structural basis for ligand regulation of the fatty acid-binding protein 5, peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (FABP5-PPAR β/δ) signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 21, p. 14941–14954, 2014.
- ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195–201, 2006.
- AYERS, S. D. et al. Continuous Nucleocytoplasmic Shuttling Underlies Transcriptional Activation of PPAR γ by FABP4[†]. **Biochemistry**, v. 46, n. 23, p. 6744–6752, jun. 2007.
- BAKOWIES, D.; VAN GUNSTEREN, W. F. Simulations of apo and holo-fatty acid binding protein: structure and dynamics of protein, ligand and internal water. **Journal of molecular biology**, v. 315, n. 4, p. 713–736, 2002.
- BAYEN, S.; LEE, H. K.; OBBARD, J. P. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. **Environmental research**, v. 103, n. 3, p. 375–382, 2007.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 1 fev. 2011.
- BERENDSEN, H. J.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer physics communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, 1995.
- BILBAO, E. et al. Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 3, p. 282–296, 2010.
- BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p. 147–157, 2004.
- BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 164–170, 1991.
- BURAK, M. F. et al. Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes. **Science translational medicine**, v. 7, n. 319, p. 319ra205-319ra205, 2015.
- CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of The Total Environment**, v. 247, n. 2, p. 295–311, 20 mar. 2000.

- CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 2009.
- CAO, H. et al. Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. **Cell metabolism**, v. 17, n. 5, p. 768–778, 2013.
- CHENG, Y.-Y. et al. The ligand-mediated affinity of brain-type fatty acid-binding protein for membranes determines the directionality of lipophilic cargo transport. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, p. S1388198119301441, ago. 2019.
- CHMURZYŃSKA, A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. **Journal of applied genetics**, v. 47, n. 1, p. 39–48, 2006.
- CISTOLA, D. P. et al. Fatty Acid Interactions with a Helix-less Variant of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein †. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 7559–7565, jan. 1996.
- COLLIN, H. et al. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 23, p. 4010–4017, 1 dez. 2010.
- CORSICO, B. et al. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12174–12178, 1998.
- DAVID, E. et al. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. **FEBS Journal**, v. 272, n. 21, p. 5635–5652, nov. 2005.
- DAVIES, I. M.; VETHAAK, D. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. **International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen(Denmark)**, 2012.
- DE JONG, D. H. et al. Improved parameters for the martini coarse-grained protein force field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 1, p. 687–697, 2012.
- ERNANDE, B. et al. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance: Plasticity in resource allocation in a marine bivalve. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, n. 2, p. 342–356, 23 dez. 2003.
- ESTEVEZ, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3–4, p. 262–274, 2006.
- FISER, A. Template-Based Protein Structure Modeling. In: FENYÖ, D. (Ed.). . **Computational Biology**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. v. 673p. 73–94.

FLORES-NUNES, F. et al. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17386–17396, 2015.

FLORESTA, G. et al. Computational Tools in the Discovery of FABP4 Ligands: A Statistical and Molecular Modeling Approach. **Marine Drugs**, v. 17, n. 11, p. 624, 31 out. 2019.

FRIEDMAN, R.; NACHLIEL, E.; GUTMAN, M. Molecular Dynamics Simulations of the Adipocyte Lipid Binding Protein Reveal a Novel Entry Site for the Ligand [†] · [‡]. **Biochemistry**, v. 44, n. 11, p. 4275–4283, mar. 2005.

FURUHASHI, M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. **Nature reviews Drug discovery**, v. 7, n. 6, p. 489, 2008.

GONZÁLEZ, J. M.; FISHER, S. Z. Structural analysis of ibuprofen binding to human adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4). **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 71, n. 2, p. 163–170, 2015.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl, p. W270–W277, 1 jul. 2011.

HAUNERLAND, N. H.; SPENER, F. Fatty acid-binding proteins—insights from genetic manipulations. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 4, p. 328–349, 2004.

HODSDON, M. E.; CISTOLA, D. P. Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by ¹⁵N NMR relaxation and ¹H exchange. **Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 2278–2290, 1997.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Uncoupling of Obesity from Insulin Resistance Through a Targeted Mutation in aP2, the Adipocyte Fatty Acid Binding Protein. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1377–1379, 22 nov. 1996.

HUI, X. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH2-terminal kinases and activator protein-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 14, p. 10273–10280, 2010.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

HUNT, S. E. et al. Ensembl variation resources. **Database**, v. 2018, 2018.

HUNTER, N. H.; BAKULA, B. C.; BRUCE, C. D. Molecular dynamics simulations of apo and holo forms of fatty acid binding protein 5 and cellular retinoic acid binding protein II reveal highly mobile protein, retinoic acid ligand, and water molecules. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 7, p. 1893–1907, 2018.

HUVET, A. et al. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. **Gene**, v. 343, n. 1, p. 211–220, dez. 2004.

ISHIMURA, S. et al. Circulating Levels of Fatty Acid-Binding Protein Family and Metabolic Phenotype in the General Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e81318, 20 nov. 2013.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, 1983.

LALONDE, J. M.; BERNLOHR, D. A.; BANASZAK, L. J. The up-and-down β -barrel proteins. **The FASEB Journal**, v. 8, n. 15, p. 1240–1247, dez. 1994.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182–186, fev. 2003.

LANG, R. P. et al. Transcriptome Profiling of Selectively Bred Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Families that Differ in Tolerance of Heat Shock. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 650–668, out. 2009.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LINDAHL et al. **GROMACS 2019.2 Source code**. [s.l.] Zenodo, 2019a.

LINDAHL et al. **GROMACS 2019.2 Manual**. 16 abr. 2019b.

LIU, Y. et al. Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. **Aquatic toxicology**, v. 89, n. 4, p. 242–250, 2008.

LONG, D.; MU, Y.; YANG, D. Molecular Dynamics Simulation of Ligand Dissociation from Liver Fatty Acid Binding Protein. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e6081, 30 jun. 2009.

LOVELL, S. C. et al. Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 8 jan. 2003.

MAKOWSKI, L. et al. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity: macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor γ and I κ B kinase activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12888–12895, 2005.

MARR, E. et al. Expression, purification, crystallization and structure of human adipocyte lipid-binding protein (aP2). **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, n. 11, p. 1058–1060, 1 nov. 2006.

MARRINK, S. J. et al. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. **The journal of physical chemistry B**, v. 111, n. 27, p. 7812–7824, 2007.

MARTIN, G. G. et al. The human liver fatty acid binding protein T94A variant alters the structure, stability, and interaction with fibrates. **Biochemistry**, v. 52, n. 51, p. 9347–9357, 2013.

MATSUOKA, D. et al. Molecular Dynamics Simulations of Heart-type Fatty Acid Binding Protein in Apo and Holo Forms, and Hydration Structure Analyses in the Binding Cavity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 1, p. 114–127, 8 jan. 2015.

MEDEIROS, I. D. et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine environmental research**, v. 66, n. 1, p. 156–157, 2008.

MELLO, D. F. et al. Cellular and Transcriptional Responses of *Crassostrea gigas* Hemocytes Exposed in Vitro to Brevetoxin (PbTx-2). **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p. 583–597, 5 mar. 2012.

MEZZELANI, M. et al. Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, Ibuprofen and Ketoprofen: Insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. **Chemosphere**, v. 198, p. 238–248, maio 2018.

MICHAUD-AGRAWAL, N. et al. MDAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 10, p. 2319–2327, 2011.

MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, n. 1, p. 39–51, 2006.

MIOSSEC, L.; LE DEUFF, R.-M.; GOULLETQUER, P. **Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster)**. Copenhagen: Internat. Council for the Exploration of the Sea, 2009.

MUKHERJEE, A. et al. Adipocyte-Induced FABP4 Expression in Ovarian Cancer Cells Promotes Metastasis and Mediates Carboplatin Resistance. **Cancer Research**, v. 80, n. 8, p. 1748–1761, 15 abr. 2020.

NCBI RESOURCE COORDINATORS et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D8–D13, 4 jan. 2018.

OLIVARES-RUBIO, H. F.; VEGA-LÓPEZ, A. Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 297–312, 2016.

PELTON, P. D. et al. PPAR γ activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 261, n. 2, p. 456–458, 1999.

PERIOLE, X. et al. Combining an elastic network with a coarse-grained molecular force field: structure, dynamics, and intermolecular recognition. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, n. 9, p. 2531–2543, 2009.

PRENTICE, K. J.; SAKSI, J.; HOTAMISLIGIL, G. S. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. **Journal of Lipid Research**, v. 60, n. 4, p. 734–740, abr. 2019.

REBACK, J. et al. **pandas-dev/pandas: Pandas 1.2.4**. [s.l.] Zenodo, 2021.

ROCHE, O.; KIYAMA, R.; BROOKS, C. L. Ligand–Protein DataBase: Linking Protein–Ligand Complex Structures to Binding Data. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 22, p. 3592–3598, out. 2001.

rs770030293 Relatório RefSNP - dbSNP - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs770030293?vertical_tab=true#frequency_tab>. Acesso em: 12 jul. 2021.

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1–4, p. 1–14, 2006.

SACCHETTINI, J. C.; GORDON, J. I.; BANASZAK, L. J. Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein: Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate. **Journal of molecular biology**, v. 208, n. 2, p. 327–339, 1989.

SCAPIN, G. et al. High resolution X-ray studies of mammalian intestinal and muscle fatty acid-binding proteins provide an opportunity for defining the chemical nature of fatty acid: protein interactions. In: GLATZ, J. F. C.; VAN DER VUSSE, G. J. (Eds.). **Cellular Fatty Acid-Binding Proteins II**. Boston, MA: Springer US, 1993. p. 3–13.

SCHAAP, F. G.; VAN DER VUSSE, G. J.; GLATZ, J. F. Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. In: **Cellular Lipid Binding Proteins**. [s.l.] Springer, 2002. p. 69–77.

SCHÖNING-STIERAND, K. et al. ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W48–W53, 2 jul. 2020.

SERRANO, M. A. et al. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17375–17385, 2015.

SMATHERS, R. L.; PETERSEN, D. R. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. **Human Genomics**, v. 5, n. 3, p. 170, 2011.

SMITH, A. J. et al. Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 44, p. 32424–32432, 2007.

SOUZA, P. C. T. et al. Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics. **Nature Methods**, v. 18, n. 4, p. 382–388, abr. 2021.

STORCH, J.; THUMSER, A. E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1486, n. 1, p. 28–44, 2000.

STORCH, J.; THUMSER, A. E. Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 43, p. 32679–32683, 2010.

STREMMEL, W. et al. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 981–989, 2001.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC. [s.l: s.n.].

TISCA, J. F. et al. Characterization of a fatty acid-binding protein from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): pharmaceutical and toxicological implications. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 22, p. 27811–27822, jun. 2021.

TOLEDO-SILVA, G. DE et al. Intracellular lipid binding protein family diversity from Oyster *Crassostrea gigas*: genomic and structural features of invertebrate lipid transporters. **Scientific reports**, v. 7, p. 46486, 2017.

TROMBINI, C.; HAMPEL, M.; BLASCO, J. Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: An integrative and multibiomarker approach. **Aquatic Toxicology**, v. 208, p. 146–156, mar. 2019.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, fev. 2003.

VAN DER VUSSE, G. J. et al. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. In: GLATZ, J. F. C. (Ed.). **Cellular Lipid Binding Proteins**. Boston, MA: Springer US, 2002. p. 9–15.

VAN DER WALT, S.; COLBERT, S. C.; VAROQUAUX, G. The NumPy array: a structure for efficient numerical computation. **Computing in science & engineering**, v. 13, n. 2, p. 22–30, 2011.

VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671–690, 2010.

VANOMMESLAEGHE, K.; MACKERELL, A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 12, p. 3144–3154, 21 dez. 2012.

VANOMMESLAEGHE, K.; RAMAN, E. P.; MACKERELL, A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 12, p. 3155–3168, 21 dez. 2012.

VEERKAMP, J. H.; VAN MOERKERK, H. T. B. Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. In: **Cellular Fatty Acid-Binding Proteins II**. [s.l.] Springer, 1993. p. 101–106.

VELKOV, T. et al. The interaction of lipophilic drugs with intestinal fatty acid-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 18, p. 17769–17776, 2005.

VELKOV, T. Interactions between Human Liver Fatty Acid Binding Protein and Peroxisome Proliferator Activated Receptor Selective Drugs. **PPAR Research**, v. 2013, p. 1–14, 2013.

VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 281–300, set. 2007.

WANG, Y. et al. Discovery of FDA-approved drugs as inhibitors of fatty acid binding protein 4 using molecular docking screening. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 11, p. 3046–3050, 2014.

WASSENAAR, T. A. et al. Mixing MARTINI: Electrostatic Coupling in Hybrid Atomistic–Coarse-Grained Biomolecular Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 13, p. 3516–3530, 4 abr. 2013.

WASSENAAR, T. A. et al. Computational lipidomics with insane: a versatile tool for generating custom membranes for molecular simulations. **Journal of chemical theory and computation**, v. 11, n. 5, p. 2144–2155, 2015a.

WASSENAAR, T. A. et al. High-Throughput Simulations of Dimer and Trimer Assembly of Membrane Proteins. The DAFT Approach. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 5, p. 2278–2291, 12 maio 2015b.

WESSEL, N. et al. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 133–142, nov. 2007.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_2, p. W407–W410, 2007.

XU, J.; ZHANG, Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? **Bioinformatics**, v. 26, n. 7, p. 889–895, 1 abr. 2010.

YOUNG, A. C. et al. Structural studies on human muscle fatty acid binding protein at 1.4 Å resolution: binding interactions with three C18 fatty acids. **Structure**, v. 2, n. 6, p. 523–534, jun. 1994.

ZACCHI, F. L. et al. Biochemical and molecular responses in oysters *Crassostrea brasiliensis* collected from estuarine aquaculture areas in Southern Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 135, p. 110–118, 2018.

ZANOTTI, G. et al. Three-dimensional structure of recombinant human muscle fatty acid-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 26, p. 18541–18550, set. 1992.

ZANOTTI, G. Muscle fatty acid-binding protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2–3, p. 94–105, 1999.

ZENG, J.; SAUTER, E. R.; LI, B. FABP4: A New Player in Obesity-Associated Breast Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 5, p. 437–440, maio 2020.

ZENG, X. et al. Molecular cloning and functional analysis of the fatty acid-binding protein (Sp-FABP) gene in the mud crab (*Scylla paramamosain*). **Genetics and molecular biology**, v. 36, n. 1, p. 140–147, 2013.

ZHANG, G. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49, 2012.

ZHANG, G. et al. Molecular basis for adaptation of oysters to stressful marine intertidal environments. **Annual review of animal biosciences**, v. 4, p. 357–381, 2016.

ZHANG, L.; REN, X.-M.; GUO, L.-H. Structure-based investigation on the interaction of perfluorinated compounds with human liver fatty acid binding protein. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 19, p. 11293–11301, 2013.

ZHANG, W.; SATO, T.; SMITH, S. O. NMR spectroscopy of basic/aromatic amino acid clusters in membrane proteins. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 48, n. 4, p. 183–199, jul. 2006.

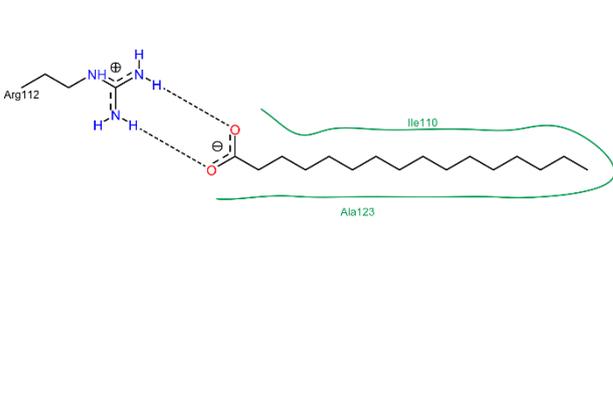
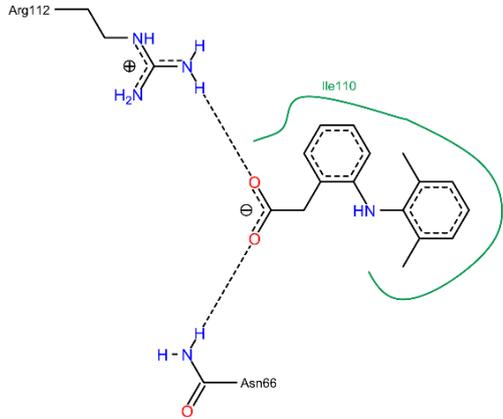
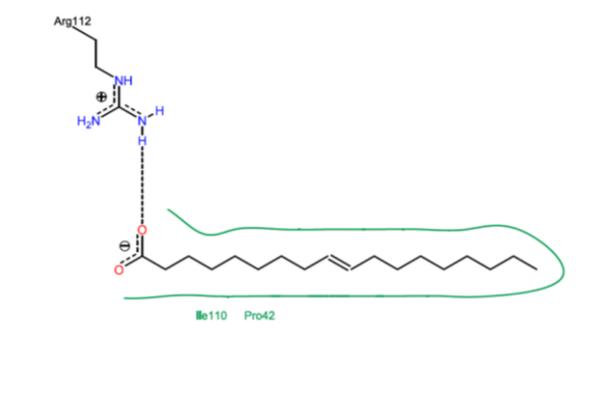
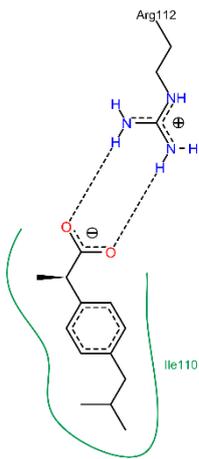
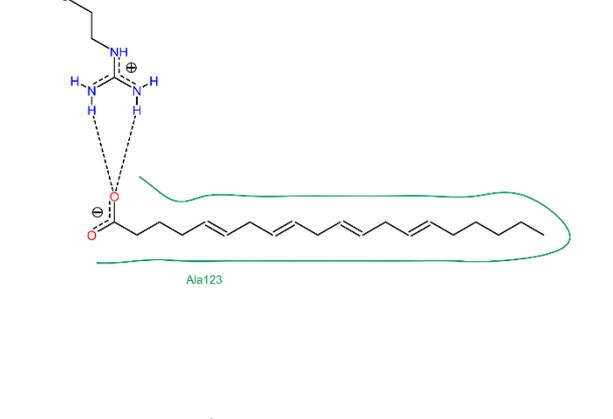
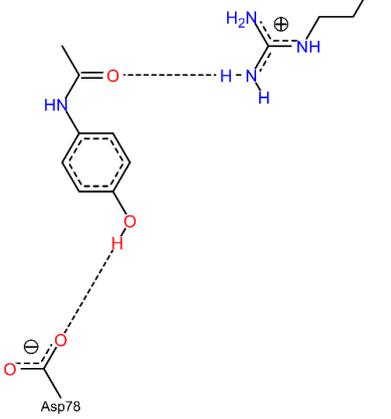
ZHANG, Y. et al. High expression of FABP4 and FABP6 in patients with colorectal cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 17, n. 1, p. 171, dez. 2019.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 57, n. 4, p. 702–710, 2004.

ZHOU, Y. et al. The discovery of novel and selective fatty acid binding protein 4 inhibitors by virtual screening and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4310–4317, 15 set. 2016.

APÊNDICE A – Docking Molecular

Quadro 2- Análise 2D das interações da melhor pose de *docking molecular* por ligante. Em verde estão representadas as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio em linhas tracejadas.

Ácidos graxos	Xenobióticos
 <p data-bbox="459 862 639 898">Ácido palmítico</p>	 <p data-bbox="1042 862 1273 898">Diclofenaco de sódio</p>
 <p data-bbox="475 1447 624 1480">Ácido Oleico</p>	 <p data-bbox="1098 1447 1222 1480">Ibuprofeno</p>
 <p data-bbox="443 1933 655 1964">Ácido araquidônico</p>	 <p data-bbox="1074 1933 1241 1964">Acetaminofeno</p>

Fonte: Os resultados foram obtidos pelo software SwissDock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011) e as imagens construídas pelo PoseView (SCHÖNING-STIERAND et al., 2020).

APÊNDICE B – Topologia Martini3.0 para palmitoyl-CoA

[moleculetype]

; molname nrexcl

PCN 1

[atoms]

; id type resnr residu atom cgnr charge mass

1	Q5	1	PCN	Q1	1	-1.0	
2	C1	1	PCN	C1	2	0	
3	C1	1	PCN	C2	3	0	
4	C1	1	PCN	C3	4	0	
5	C1	1	PCN	C4	5	0	

[bonds]

; i j funct length force.c.

1	2	1	0.47	3800
2	3	1	0.47	3800
3	4	1	0.47	3800
4	5	1	0.47	3800

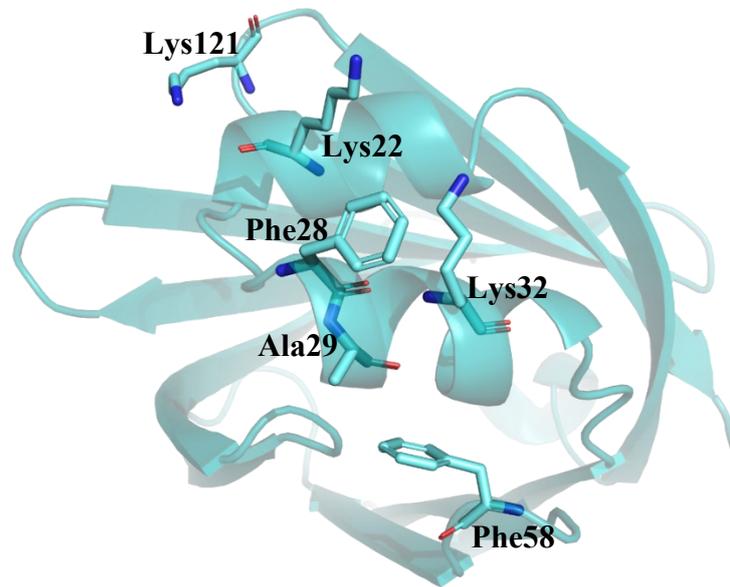
[angles]

; i j k funct angle force.c.

1	2	3	2	180.0	35.0
2	3	4	2	180.0	35.0
3	4	5	2	180.0	35.0

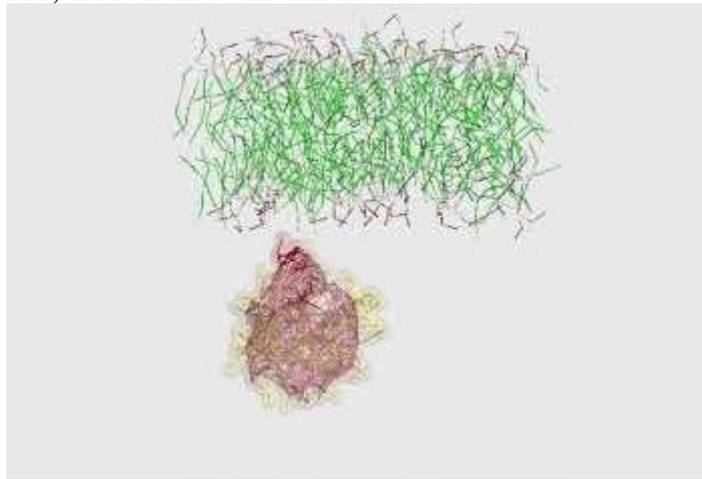
APÊNDICE C – Sítio de ligação com a membrana

Figura 23- Estrutura de FABP4 com detalhe para o sítio de ligação de com a membrana. Os resíduos em representação de *sticks* foram o que tiverem a maior frequência de contato com a bicamada lipídica.



Fonte: Própria autora utilizando o programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

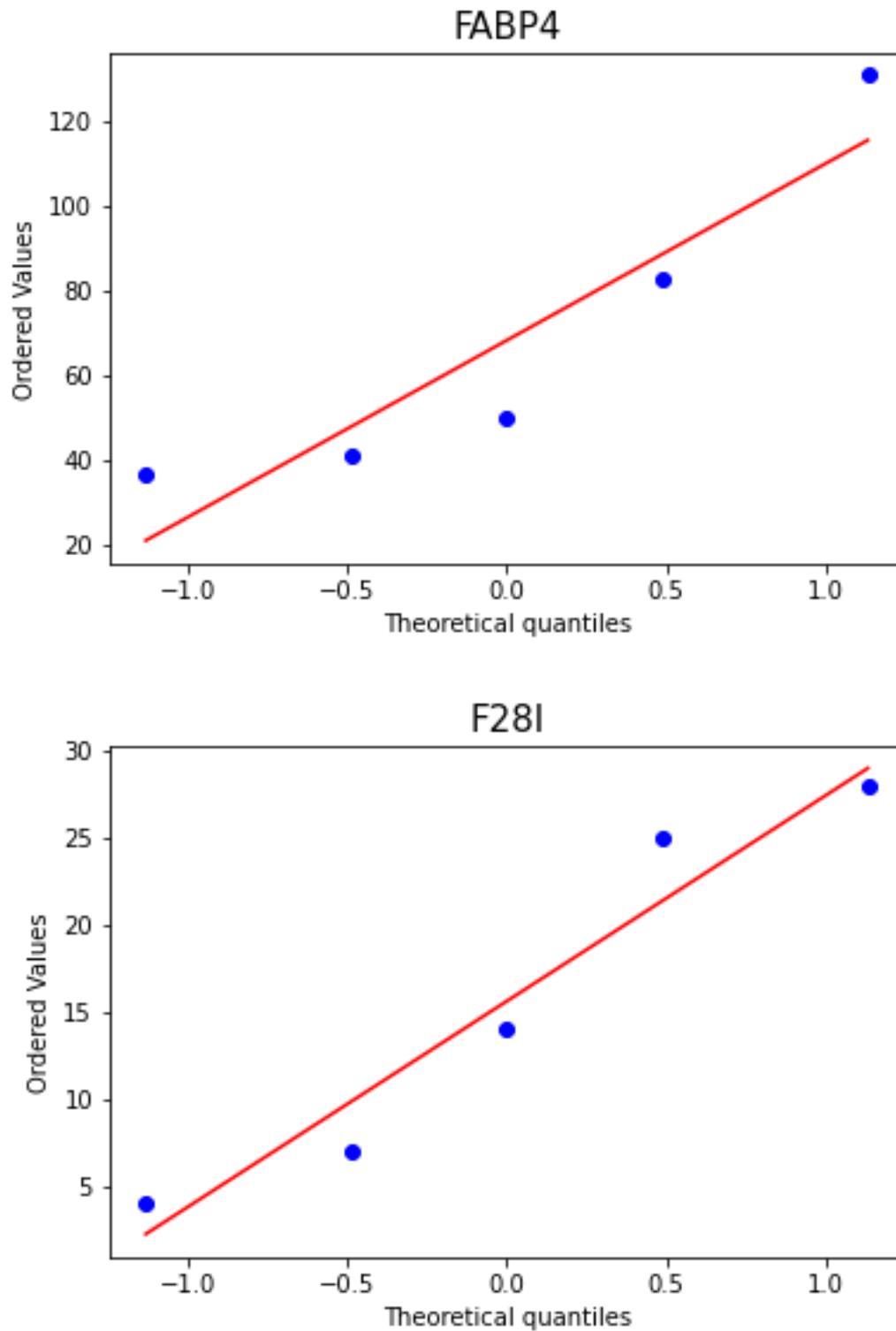
Figura 24- Evento de *binding* com da FABP4 com membrana. Os resíduos de maior frequência de contato (K22, F28, A29, K32, F58 e K121) estão coloridos em vermelho.



Fonte: Própria autora utilizando o programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., 2015).

APÊNDICE D – Distribuição dos dados

Figura 25- Gráfico de distribuição das contagens de eventos de ligação com membrana, mostrando que os eventos de *binding* não seguem uma distribuição normal.



Fonte: Dados próprios.

ANEXO A – Characterization of a fatty acid-binding protein from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): pharmaceutical and toxicological implications

Environmental Science and Pollution Research (2021) 28:27811–27822
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-12645-y>

RESEARCH ARTICLE



Characterization of a fatty acid-binding protein from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): pharmaceutical and toxicological implications

Juliana F. Tisca^{1,2} · Karin dos Santos^{2,3} · Tomás B. Pessati^{1,2} · Flávia L. Zacchi^{1,2} · Fabíola S. Soares² · Vanessa A. Oliveira⁴ · Maria J.A.F. Bebianno⁵ · Afonso C.D. Bainy^{1,2} · Guilherme Razzera^{1,2,3}

Received: 4 March 2020 / Accepted: 20 January 2021 / Published online: 30 January 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021, corrected publication 2021

Abstract

Pharmaceuticals and their metabolites constitute a class of xenobiotics commonly found in aquatic environments which may cause toxic effects in aquatic organisms. Several different lipophilic molecules, including some pharmaceuticals, can bind to fatty acid-binding proteins (FABPs), a group of evolutionarily related cytoplasmic proteins that belong to the intracellular lipid-binding protein (iLBP) family. An oyster FABP genome-wide investigation was not available until a recent study on gene organization, protein structure, and phylogeny of *Crassostrea gigas* iLBPs. Higher transcript levels of the *C. gigas* *FABP2* gene were found after exposure to sewage and pharmaceuticals. Because of its relevance as a potential biomarker of aquatic contamination, in this study, recombinant FABP2 from *C. gigas* (CgFABP2) was successfully cloned, expressed, and purified, and in vitro and in silico assays were performed using lipids and pharmaceuticals. This is the first characterization of a protein from the iLBP family in *C. gigas*. Homology modeling and molecular docking were used to evaluate the binding affinities of natural ligands (palmitic, oleic, and arachidonic acids) and pharmaceuticals (ibuprofen, sodium diclofenac, and acetaminophen). Among the tested fatty acids, CgFABP2 showed preference for palmitic acid. The selected pharmaceuticals presented a biphasic-binding mode, suggesting a different binding affinity with a preference for diclofenac. Therefore, the approach using circular dichroism and in silico data might be useful for ligand-binding screening in an invertebrate model organism.

Keywords Biomarker · Homology modeling · Lipid transporter · Molecular docking · Nonsteroidal drugs · Ecotoxicology

The original online version of this article was revised: The correct Figure 3 is presented in this paper.

Editorial Responsibility: Ta Yeong Wu

✉ Afonso C.D. Bainy
afonso.bainy@ufsc.br

✉ Guilherme Razzera
guilherme.razzera@ufsc.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

² Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

³ Núcleo de Bioinformática e Biologia Computacional da UFSC - NuBioinfo, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

⁴ Centro de Biologia Molecular Estrutural, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

⁵ Centre for Marine and Environmental Research, CIEMA, University of Algarve, Campus de Gambelas, 8000-139 Faro, Portugal

Introduction

Over the past few decades, new xenobiotics have been produced and introduced into the aquatic environment (Thomaidis et al. 2012; Petrie et al. 2014; Lolić et al. 2015). However, quantification of their levels was only recently possible, leading to the recognition of drugs as important and potentially harmful environmental compounds which should be considered emerging contaminants (Kolpin et al. 2002; Huggett et al. 2003; Yuan et al. 2009; Sirés and Brillas 2012). Aquatic contamination with pharmaceuticals and their metabolites can occur through leaching of hospital and urban wastewater effluents, and veterinary compounds (Kim et al. 2007; Nikolaou et al. 2007; Dussault et al. 2008). Some of these pharmaceuticals are not entirely removed during regular wastewater treatment (Jones et al. 2005; Langford and Thomas 2009; Rivera-Utrilla et al. 2013). Although