

Fabíola Santos Soares

Caracterização de uma proteína da família das ligantes intracelulares de lipídeos (iLBP) como uma proteína ligante de ácidos graxos do tipo FABP2 em *Crassostrea gigas*: implicações ecotoxicológicas

Monografia submetida ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Razzera

Florianópolis
2018

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

Soares, Fabiola Santos

Caracterização de uma proteína da família das
ligantes intracelulares de lipídeos (iLBP) como uma
proteína ligante de ácidos graxos do tipo FABP2 em
Crassostrea gigas: implicações ecotoxicológicas /
Fabiola Santos Soares ; orientador, Guilherme
Razzerá, 2018.
94 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biologia. 3.
Bioquímica. 4. Ecotoxicologia. 5. Bioinformática. I.
Razzerá, Guilherme. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

Fabiola Santos Soares

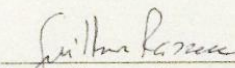
Caracterização de uma proteína da família das ligantes intracelulares de lipídeos (iLBP) como uma proteína ligante de ácidos graxos do tipo FABP2 em *Crassostrea gigas*: implicações ecotoxicológicas

Esta Monografia foi julgada adequada para obtenção do Título de “Licenciada em Ciências Biológicas” e aprovada em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas

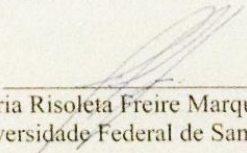
Florianópolis, 12 de novembro de 2018.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

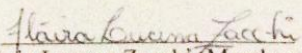
Banca Examinadora:



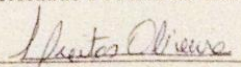
Prof. Dr. Guilherme Razzera (Orientador)
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.ª Dr.ª Maria Risoleta Freire Marques (Membro titular)
Universidade Federal de Santa Catarina



Dr.ª Flávia Lucena Zacchi (Membro titular)
Universidade Federal de Santa Catarina



M.ª Laura Freitas (Membro suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a todos que acreditam e lutam por um mundo melhor, com mais igualdade e menos ódio.

AGRADECIMENTOS

Este TCC demorou um tempo maior que o comum para ser finalizado. Nesse processo aprendi que, mais do que uma conquista profissional, finalizar essa etapa é além de tudo uma conquista pessoal, de vencer o medo e a insegurança. Eu venci, mas não foi sozinha. Nesse longo processo contei com pessoas que me mantiveram acreditando em dias melhores, a todos vocês meu muito obrigada. Essa é a minha justificativa por ter agradecimentos um pouco mais extenso que o comum, mas há muita gente que merece ser citada aqui.

Primeiramente quero agradecer ao meu orientador Guilherme Razzera, pela humanidade antes de tudo. Eu admiro muito todo conhecimento e experiência em bioinformática e bioquímica que o Guilherme sabe e passa para seus alunos, mas sem dúvida nenhuma o que mais me marcou nesse processo foi a humanidade de me enxergar como pessoa antes de aluna e respeitar meu próprio tempo. Se um dia eu orientar alguém, sem dúvida nenhuma procurarei seguir o exemplo.

À minha banca, que gentilmente aceitou ler e analisar meu trabalho. Tenho muito orgulho de ter três mulheres fortes e excelentes profissionais, Maria Risoleta, Flávia e Laura. Eu espero que gostem do resultado do meu trabalho. Especialmente a prof. Maria Risoleta, meu agradecimento por todo acompanhamento durante a minha graduação, foi com você que primeiramente aprendi sobre proteínas e apresentei meu primeiro seminário, sobre lipídios. E anos depois, cá estou estudando FABPs. A Flávia e a Laura por todo aprendizado que tive acompanhando o trabalho de vocês no laboratório.

À minha família, que sempre será minha família, meus pais, irmãos, tio e avós. Nos bons e nos maus momentos, na abundância e nos perrengues, sei que ninguém está mais feliz e orgulhoso com a minha conquista que vocês, muito obrigada.

À Coimbra, dos doutores. E a Capes por me permitir viver a melhor experiência da minha vida através do Programa de Licenciaturas Internacionais – PLI, jamais será esquecido.

Aos meus amigos, aqui são tantos e foram tão importantes para mim, que me fazem pensar como sou sortuda. Da minha turma Gabriel, Tomás, Thaís, Mariana, Bárbara, Gabriela e Maria Flávia (que nunca deixou de acreditar e perguntar quando meu TCC ficaria pronto). Minhas irmãs, parceiras de intercâmbio e de vida, Juliana Burger e Jadna, todas essas páginas seriam pequenas pra tudo que já passamos

juntos, mas recordo com detalhes enquanto toca a playlist do NL de fundo. Espero que possamos estar reunidas outra vez logo.

Aos irrelevantes, o dia em que me tornei uma foi muito importante. Me juntei a vocês numa fase difícil pra mim e então ela se tornou mais fácil, amo vocês. Em especial minhas amoras Eliza e Priscilla, a quem admiro muito. Eliza ainda vai conquistar o mundo e a Pri as capas das revistas científicas mundiais e eu estarei com vocês comemorando cada conquista. Vocês me levantaram quando eu duvidei que isso aconteceria.

Aos meus amigos de infância obrigada pelas décadas, em especial Mary, Kali e Diego, saber que levarei vocês pra vida torna a existência mais leve e feliz, meus amigos de alma.

Às minhas colegas de apartamento, e aí foram tantas.. Vanessa, Maísa, Tay, Maya, Jéssica, Ane, Gika, Preta, Júlia, Yasmin, Marcela, Anelise, Ju, Jadna. Obrigada por aturarem minhas esquisitices e ainda manterem a amizade.

Aos meus colegas de LABCAI, aos que pacientemente me explicaram coisas “óbvias”, Talita, Aninha, Laura, Gabriel, Karla, Tomás e claro, minha maior companhia de laboratório e de RU Ju Tisca, sem você esse TCC não estaria aqui.

Aos meus colegas de trabalho, da Cafundó e do Mind the Graph, mais do que um salário, vocês me garantem um lugar de acolhimento, empatia e amizade. Ao meu time Math e Renato, aos Carabão, ao Tetragon, aos agregados. Obrigada pelas dicas de alimentação saudável, design e cultura pop, seguimos deixando esse mundão um lugar melhor pra se viver.

Ao Flávio, meu companheiro, obrigada pela ajuda e incentivo. Há tanta coisa pra escrever, mas aí deixariam de ser histórias só nossas e só nós dois sabemos tudo que passamos juntos e tudo que sonhamos em passar. Que o futuro sorria pra nós.

Às ações afirmativas, à CAPES e ao CNPq, que me possibilitaram estudar. Nesse ponto preciso estender meu agradecimento ao governo que mais fez pelos estudantes e trabalhadores desse país, ao Lula e a primeira mulher presidenta do Brasil, Dilma. A bolsa de “desocupados” que me permitiu ter moradia e alimentação. Por todo apoio da PRAE e o entendimento que pro filho do pobre estudar, bolsas fazem-se necessárias. A ciência surgiu da curiosidade humana e é preciso que todos tenham o direito e as condições de serem cientistas se assim quiserem. Fica aqui meu desejo que a educação seja sempre vista como direito e não como mercadoria e que outros sonhadores sem

recursos se formem como eu. Pela educação e ciência como direitos da humanidade e não mercadorias do capital.

À todos os pesquisadores que dão seu sangue e suor pela pesquisa brasileira enquanto ouvem que “só estudam e não trabalham”, De grão em grão mudamos o mundo, sigamos de cabeça erguida.

Aos brasileiros, à classe trabalhadora que mantém esse país, não se deixem enganar, uni-vos.

À universidade, que precisa se manter como um ambiente de discussão de ideias, conversas e aprendizado. A UFSC me permitiu essa experiência transformadora e lutarei para que aos próximos seja garantidos os mesmos direitos. Que não nos caem, que a universidade seja dos estudantes e não de um governo fascista. Muitos antes de nós resistiram e agora é nossa vez de resistir para que nossos filhos possam sonhar. Eles passarão, nós passarinho.

A esperança venceu o medo (Lula, 2002)

RESUMO

O crescimento desordenado da população humana, a falta de planejamento e tratamento de esgoto adequado tem como consequência a contaminação aquática. Os chamados PPCPs, ou produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais estão entre os contaminantes mais comuns do litoral brasileiro. Os anti-inflamatórios não esteroidais, como o ibuprofeno, fazem parte desse grupo. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa apontaram uma superexpressão de vários genes na ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, quando exposta aos contaminantes, entre eles, um gene que expressa uma isoforma da proteína ligante de ácidos graxos (FABP). Sendo assim, é importante elucidar sua função no metabolismo de xenobióticos e seu possível potencial como biomarcador de contaminação aquática. Neste trabalho foi feita a caracterização da FABP de *C. gigas*, homóloga a FABP2 ou intestinal de vertebrados com experimentos *in silico* para construção de um modelo 3D da estrutura da proteína e análises de atracamento molecular (*docking*) com o ligante endógeno palmitato e o xenobiótico ibuprofeno. Para os testes de validação *in vitro*, a FABP foi clonada em vetor de expressão e purificada usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A proteína purificada foi usada para experimentos de dicróismo circular e fluorescência. As análises por *docking* da FABP mostraram que o ibuprofeno liga-se formando ponte de hidrogênio com o resíduo Arg112, o mesmo responsável pela ligação com o palmitato, o que indica potencial competição pelo sítio de ligação. Os dados do CD corroboram os resultados *in silico*, porém mostram que o palmitato têm uma afinidade de ligação 10 vezes superior à do ibuprofeno, indicando que é necessário uma alta quantidade do fármaco para um deslocamento na ligação. Os dados sugerem que ibuprofeno possa ser um potencial ligante de FABP, porém mais estudos *in vitro* são necessários.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. iLBPs. *Molecular docking*.

ABSTRACT

The rapid increase of human population and the lack of adequate sewage treatment result in contamination of water resources. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are a group of emerging environmental contaminants. Non-steroidal anti-inflammatories (NSAIDs) such as ibuprofen are part of this group. Previous studies conducted by our research team indicated that the Pacific oyster *Crassostrea gigas* has overexpression of several genes when exposed to aquatic contaminants as ibuprofen. One of these genes encoding an isoform of a fatty acid binding protein (FABP). Therefore, it is important to characterize the FABP of *C. gigas* to understand the FABP function in the metabolism of xenobiotics and the potential use as a biomarker of aquatic contamination. In the present study, the characterization of the FABP of *C. gigas*, homologous to FABP2 of vertebrates, was done with *in silico* experiments to construct a 3D model of the protein structure and molecular docking analyzes with the natural ligand palmitate and the xenobiotic ibuprofen. Also, the FABP was cloned into bacterial vector for expression and purified using high performance liquid chromatography (HPLC). The purified protein was used for circular dichroism and fluorescence experiments. The molecular docking of FABP showed that ibuprofen forms a hydrogen bond with the Arg112 residue. The same residue is responsible for the hydrogen bond with the palmitate, indicating that there is competition for the binding site between the ligands. The CD data corroborates with *in silico* results, however it has been shown that palmitate has a binding affinity 10 times higher than ibuprofen, indicating that a high amount of drug is required for a displacement in palmitate binding. The data suggests ibuprofen as a potential binder of FABP, however, more *in vitro* further studies is needed to elucidate the relation between the FABP and PPCPs in *C. gigas*.

Keywords: Ecotoxicology. iLBPs. Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular simplificada do ibuprofeno.....	29
Figura 2 - Esquema simplificado da biossíntese das prostaglandinas..	30
Figura 3 - Espécie de ostra <i>Crassostrea gigas</i>	32
Figura 4 - Representação gráfica do plasmídeo bacteriano pET-14b...	42
Figura 5 - Espectro padrão no dicroísmo circular.....	45
Figura 6 - Alinhamento da sequência da FABP2 de <i>C. gigas</i> com isoformas de FABP de outras espécies.....	48
Figura 7 - Alinhamento das sequências de FABP2 de <i>C. gigas</i> com isoformas de FABP de invertebrados.....	49
Figura 8 - Alinhamento das sequências de FABP intestinal de vertebrados.....	49
Figura 9 - Modelo 3D proposto para FABP2 de <i>C.gigas</i>	50
Figura 10 - Comparação entre o modelo estrutural proposto para FABP2 de <i>C. gigas</i> e a FABP intestinal de rato (2IFB).....	51
Figura 11 - <i>Docking</i> da FABP2 de <i>C. gigas</i> com o palmitato.....	53
Figura 12 - <i>Docking</i> da FABP2 de <i>C. gigas</i> com o ibuprofeno.....	54
Figura 13 - <i>Docking</i> da FABP2 de <i>C. gigas</i> com a 1,8-ANS.....	54
Figura 14 - <i>Docking</i> da FABP2 de <i>R. norvegicus</i> com o palmitato.....	56
Figura 15 - <i>Docking</i> da FABP2 de <i>R. norvegicus</i> com o ibuprofeno....	56
Figura 16 - <i>Docking</i> da FABP2 de <i>R. norvegicus</i> com a 1,8-ANS.....	57
Figura 17 - Gel de agarose mostrando a subclonagem do gene de FABP no vetor de expressão pET-14b.....	58

Figura 18 - Gel de poliacrilamida mostrando o resultado da expressão de FABP.....	59
Figura 19 - Gráfico do HPLC mostrando a radiação ultravioleta durante o processo de purificação da FABP.....	60
Figura 20 - Gel de poliacrilamida mostrando o resultado da purificação por cromatografia de afinidade.....	61
Figura 21 - Gráfico da fluorescência da 1,8-ANS ligada à FABP antes e depois da técnica do lipidex.....	62
Figura 22 - Gráfico mostrando o experimento inicial de dicroísmo circular (CD).....	63
Figura 23 - Resultado do experimento de CD com FABP e palmitato.....	64
Figura 24 - Resultado do experimento de CD com FABP e ibuprofeno.....	65
Figura 25 - Comparação das escalas logarítmicas da interação entre FABP e os ligantes palmitato e ibuprofeno.....	65
Figura 26 - Gráfico mostrando a padronização da técnica de fluorescência usando a albumina do soro bovina (BSA).....	66
Figura 27 - Emissão de fluorescência do triptofano da FABP2 de <i>C. gigas</i>	67
Figura 28 - Gráfico da fluorescência emitida pela ligação da ANS com a FABP.....	68
Figura 29 - Gráfico da fluorescência da 1,8-ANS na presença de palmitato.....	69
Figura 30 - Gráfico da fluorescência da 1,8-ANS na presença de ibuprofeno.....	69

69Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da FABP2 de *C. gigas*..... 39
- Tabela 2** - Valores de energia total e ΔG da FABP2 de *C. gigas* com os ligantes palmitato, ANS e ibuprofeno.....52
- Tabela 3** - Valores de energia total e ΔG da FABP2 de *R. novergicus* com os ligantes palmitato, ANS e ibuprofeno.....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1,8-ANS - 1-anilino-8-naftalenossulfonato
AA - Ácido araquidônico
AG - Ácidos Graxos
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
BSA - Albumina do soro bovina, sigla do inglês para *Bovine serum albumin*
CD - Dicroísmo Circular, sigla do inglês para *circular dichroism*
COX - Enzima ciclooxigenase
DO - Densidade óptica
DTT - Dithiothreitol
FABP - Proteína ligante de ácidos graxos, sigla em inglês para *fatty acid binding protein*
HPLC – Cromatografia líquida de alta performance, sigla em inglês para *High performance liquid chromatography*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iLBP - *Intracellular lipid binding protein*
IMAC - Cromatografia por metal imobilizado, sigla do inglês para *Immobilized metal affinity chromatography*
IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB - *Lysogeny broth*
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NSAID - Antiinflamatórios não esteroidais, sigla em inglês para *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Tampão fosfato-salino, sigla do inglês para *phosphate buffered saline*
PDB - *Protein Data Bank*
PG - Prostaglandia
PPAR - Receptores ativados por proliferador de peroxissoma, sigla do inglês para *Peroxisome proliferator-activated receptor*
PPCPs – Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, sigla em inglês para *Pharmaceuticals and personal care products*
RMSD - *root-mean-square deviation of atomic positions*
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SSH - Hibridização subtrativa por supressão, sigla em inglês para *suppression subtractive hybridization*

TM -score - *Template modeling score*

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância sigla em inglês
para *United Nations Children's Fund*

US EPA - United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

1	81	
1.1	POLUIÇÃO AMBIENTAL AQUÁTICA	25
1.2	FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES	2628
1.3	ECOTOXICOLOGIA E ORGANISMOS SENTINELA	2631
1.4	FABP COMO BIOMARCADOR	2633
1.5	BIOLOGIA ESTRUTURAL PARA FABPs	2635
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	45	
3.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	Erro! Indicador não definido.
3.2	SUBCLONAGEM EM VETOR BACTERIANO	2641
3.3	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	2643
3.4	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	2644
3.5	DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	2645
3.6	ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA	2646
4	8047	
4.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	2647
4.2	SUBCLONAGEM DA FABP	57
4.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	58
4.4	DICROÍSMO CIRCULAR	62
4.5	FLUORESCÊNCIA	66
5	8071	
6	Erro! Indicador não definido.	79
7	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL AQUÁTICA

A distribuição populacional é bastante irregular no Brasil, com 81,25% da população ocupando apenas 1,1% do território nacional (IBGE, 2010), causando um desordenamento espacial. Grande parte dessa ocupação se dá nas cidades costeiras, tornando o litoral brasileiro fortemente influenciado por fatores antrópicos. Segundo o mapa de Densidade Demográfica divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) mais de 26% da população brasileira vive em cidades litorâneas.

Como fator agravante, grande parte do desenvolvimento das cidades costeiras foi pouco planejado, resultando em saneamento básico insuficiente e poluição dos recursos hídricos.

Segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2015), apenas 42,7% do esgoto é tratado no Brasil. Florianópolis tem tratamento para apenas cerca de metade do esgoto produzido, em média 54%. Somente 10 cidades brasileiras têm mais de 80% do esgoto tratado. Devido ao baixo investimento na área por parte governamental, nosso país não deve alcançar a universalização do serviço em menos de 20 anos (OMS-UNICEF, 2014; ESTUDO TRATA BRASIL, 2017).

Esgotos industriais, domésticos e agrícolas despejados sem tratamento adequado poluem os recursos hídricos e comprometem o equilíbrio e diversidade dos ecossistemas aquáticos, com o aumento indiscriminado de matéria orgânica, compostos químicos industriais de difícil biodegradação, metais pesados, pesticidas e fármacos que podem gerar alterações metabólicas e distúrbios nos organismos (FREIRE et al, 2008).

O processo de poluição aquática pode ser definido como qualquer alteração das características físicas, químicas e biológicas que podem causar danos à saúde, à segurança e ao bem estar das populações, além de dificultar a utilização dos recursos hídricos e, também, a existência da fauna e flora aquática (BRASIL, 1961).

Muitos compostos orgânicos presentes nos efluentes são caracterizados como interferentes endócrinos, causando distúrbios e alterações metabólicas nos organismos aquáticos. Segundo a Agência Americana de Proteção do Ambiente (US EPA 1997), “um interferente endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, secreção,

transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”. Podem ser considerados interferentes endócrinos estrogênicos naturais ou sintéticos presentes na urina, derivados das indústrias químicas de aditivos, polímeros e plastificantes, derivados de indústria farmacêutica entre outros (BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLI e JARDIM, 2007; MANIKKAN *et al* 2013).

1.2 FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES

Grande parte dos produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (PPCPs) são lançados sem tratamento nos ambientes aquáticos, tornando-se uma grande ameaça para esses ecossistemas, pois são persistentes e biologicamente ativos (PAROLINI *et al*, 2013; SANTOS *et al*, 2010). Os PPCPs mais comuns são medicamentos, destacando-se os antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs), como ibuprofeno e diclofenaco (MADDEN *et al*, 2009), que estão entre os fármacos mais vendidos sem receita médica. O ibuprofeno (ácido 2-[4-(2-metilpropil)fenil] propanóico) (Figura 1) é mundialmente utilizado como anti-inflamatório, analgésico e antipirético pela inibição da síntese de prostaglandina (PG) (SERRANO *et al*, 2015).

Figura 1: Estrutura molecular simplificada do ibuprofeno (ácido 2-[4-(2-metilpropil) fenil] propanóico). Em cinza escuro as moléculas de carbono, em vermelho o oxigênio e cinza claro a molécula de hidrogênio.

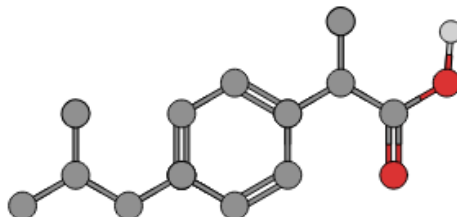


Figura da autora criada na plataforma Mind the Graph.

A ação dos NSAIDs se dá pela inibição de isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), que desempenham papel crucial na biosíntese de prostaglandinas (Figura 2). As PGs pertencem ao grupo de ácidos graxos eicosanóides, que também inclui os leucotrienos e tromboxanos, todos derivados do ácido araquidônico (AA) (LEHNINGER, 2012). O AA é um fosfolípido de membrana que pode ser hidrolisado e “liberado” das membranas celulares pela fosfolipase A, servindo então de substrato para a COX-1 e COX-2 que adicionam um anel pentano e várias insaturações para a formação das PGs (LICHTMAN, 2004).

Figura 2: Esquema simplificado da biossíntese das prostaglandinas. A partir de um estímulo inflamatório, a fosfolipase A2 transforma fosfolípeidos de membrana em ácido araquidônico, iniciando a cascata do ácido araquidônico. Está destacada a ação dos NSAIDs no processo inflamatório, que ocupam o sítio de ligação do ácido araquidônico, inibindo a ação das COX-1 e COX-2 inespecificamente.

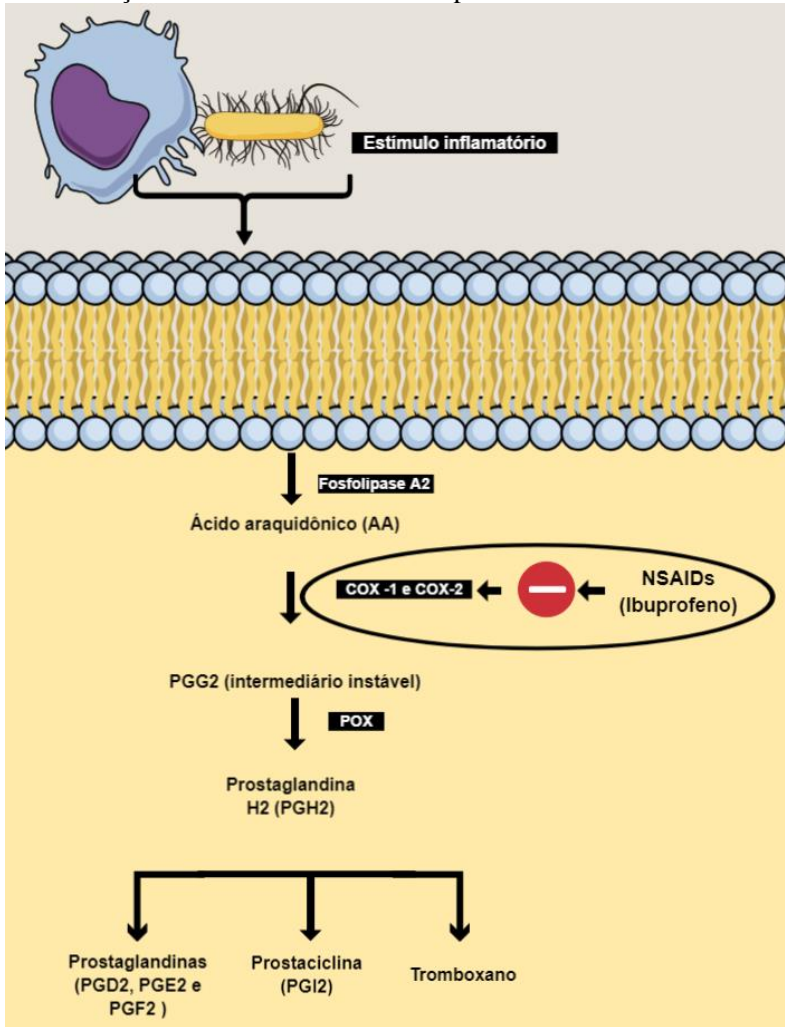


Figura criada na plataforma Mind the Graph.

As PGs participam de diversas vias metabólicas, processos fisiológicos e patológicos, sendo relacionadas à regulação do sistema imune, resposta inflamatória, equilíbrio iônico e transporte de água. Nos invertebrados, além dessas funções, as PGs podem atuar como hormônios em vias associadas à reprodução, como desova e desenvolvimento das gônadas e participar nos processos de defesa química (ROWLEY *et al.*, 2004).

Vários quilotons de NSAIDs são produzidos anualmente (CLEUVERS, 2004). Consequentemente, esses fármacos podem ser detectados nos ambientes aquáticos (SANTOS *et al.*, 2010; SERRANO, 2015), resultando em possíveis riscos e desequilíbrio para os ecossistemas.

Os efeitos dos fármacos em organismos não-alvo, principalmente invertebrados ainda não é completamente esclarecido. Alguns estudos sobre o efeito do ibuprofeno em invertebrados mostrou que a exposição ao fármaco inibe a atividade da COX e síntese de PGs na espécie de molusco *Elliptio complanata* (GAGNÉ *et al.*, 2005), e na espécie de mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, o ibuprofeno foi identificado como um desregulador endócrino por Gonzalez-Rey e Bebianno (2012).

1.3 *Crassostrea gigas* COMO ORGANISMO MODELO

Muitas espécies podem bioacumular contaminantes nos tecidos, principalmente compostos lipossolúveis que se acumulam nas membranas e em adipócitos. A bioacumulação de moléculas não biodegradáveis representa um risco para os organismos que pode resultar em problemas reprodutivos e comportamentais, processos carcinogênicos e até mesmo a morte precoce (BUENO *et al.*, 2008; FROEHNER e MARTINS, 2008; REMAILI *et al.*, 2015; SARKAR *et al.*, 2006). Por isso, apenas estudos físico-químicos do ambiente devem ser combinados com parâmetros de análises biológicas para mensurar os efeitos dos contaminantes, identificando índices de toxicidades letais e subletais.

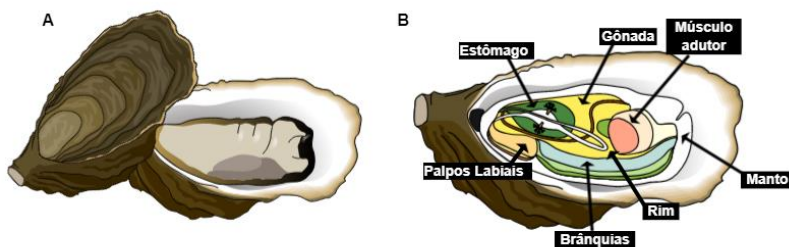
Alterações biológicas nos organismos ou populações podem ser identificadas através de bioindicadores ou organismos sentinela. (LAM e GRAY, 2003; NACHEV e SURES, 2016). O termo ‘organismo sentinela’ tem origem na década de 1950 para descrever espécies usadas para detectar e mapear radioatividade (BEEBY, 2001), e se tornou sinônimo de ‘bioacumulador’, definindo organismos que podem ser usados para monitoramento biológico e quantificação do nível de

contaminantes biologicamente disponível (PHILLIPS e SEGAR, 1986; AMOOZADEH *et al.*, 2014; NACHEV e SURES, 2016).

Os moluscos bivalves são considerados bons modelos de estudo como espécies sentinela, devido à capacidade de filtração, absorção e acumulação de contaminantes, distribuição cosmopolita, tamanho corporal suficiente para análises teciduais e vida sésil (PAVLICA *et al.*, 2001; MONIRITH *et al.* 2003; ZHAO *et al.*, 2005). São animais caracterizados pela presença de uma concha dividida em duas valvas que se fecham pela contração dos músculos adutores, envolvendo o corpo e a cavidade do manto (BRUSCA e BRUSCA, 2007).

Entre as espécies de moluscos bivalves, a ostra do Pacífico - *Crassostrea gigas* se destaca pela característica cosmopolita, genoma sequenciado (ZHANG *et al.*, 2012) e valor econômico no setor de aquicultura e alimentação humana (Figura 3). Espécie originária do Pacífico e mar do Japão tem, atualmente, populações estabelecidas em pelo menos 17 países, incluindo o Brasil (HERBERT *et al.*, 2016), sendo portanto um bom organismo modelo para o estudo, com capacidade de filtrar e bioacumular contaminantes.

Figura 3: Espécie de ostra *Crassostrea gigas*. Em A figura simplificada. Em B figura mostrando os principais órgãos.



Figuras criadas na plataforma Mind the Graph adaptada de BRUSCA & BRUSCA (2002).

1.4 FABP COMO BIOMARCADOR

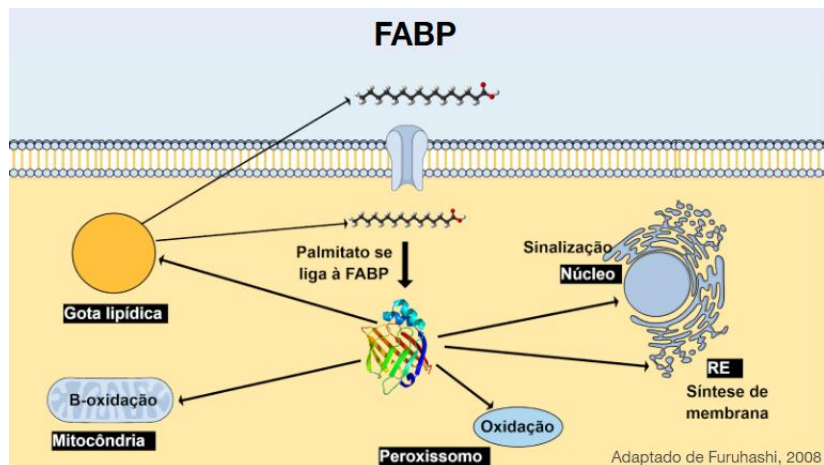
Enquanto alterações em espécies ou populações são, em geral, denominadas bioindicadores e podem ser detectadas pelo uso de organismos sentinela, alterações em nível molecular ou fisiológico são chamadas de biomarcadores, que nos permite detectar diferentes tipos de danos em diferentes tipos celulares e portanto, pode antecipar mudanças em níveis de maiores organizações biológicas servindo como sinal inicial de contaminação e toxicidade ambiental (RAND, 1995; LAM e GRAY, 2003; TOLEDO-SILVA, 2009).

Estudos anteriores de expressão gênica diferencial realizados no LABCAI identificaram através da técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH), alteração na expressão gênica induzida pela exposição ao esgoto sanitário em genes relacionados às vias de biotransformação (MEDEIROS *et al*, 2008a; TOLEDO-SILVA, 2009). Um dos genes estudados superexpressa uma proteína ligante de ácidos graxos (FABP) nos animais expostos aos contaminantes, indicando um possível potencial como biomarcador.

As FABPs pertencem a um grande grupo de proteínas relacionadas evolutivamente chamadas iLBPs, e são pequenas proteínas citosólicas que estão envolvidas no transporte de lipídios intracelulares (FAVRETTO *et al*, 2015; TOLEDO-SILVA *et al*, 2017). As FABPs têm em média 15 Kda e cerca de 126 a 134 resíduos de aminoácidos. Possuem uma cavidade central com capacidade de ligação reversível com moléculas hidrofóbicas. Essa ligação permite a solubilização e transporte de lipídios para lugares específicos da célula, regulando o metabolismo lipídico (HERTZEL *et al*, 2009; CAI *et al*, 2012).

Apesar das funções mais conhecidas das FABPs serem a ligação e transporte de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido palmítico e ácido oleico (ESTEVES e EHRILICH, 2006), outras funções têm sido descritas (Figura 4) (JAKOBSSON *et al*, 2003), entre elas a participação na transdução de sinal, associação com outras proteínas citosólicas, modulação do crescimento celular e regulação da expressão gênica, além da interação com receptores nucleares como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) (TAN *et al*, 20014; HUGHES *et al*, 2015).

Figura 04: Esquema simplificado mostrando a função das FABPs no transporte intracelular de lipídios



São amplamente encontradas em animais vertebrados e invertebrados, mostrando uma forte conservação evolutiva (FURUHASHI, 2008; HUGHES et al, 2015). Em humanos, já foram descritas várias FABPs tecido-específicas, no fígado, intestino, coração, cérebro e outros órgãos (FURUHASHI, 2008). A isoforma presente no fígado é capaz de ligar duas moléculas simultaneamente (CAI et al, 2012), enquanto outras como a intestinal possuem uma cavidade com capacidade para apenas um ligante por vez.

Alterações na concentração de FABPs são associadas a patologias em seres humanos, como obesidade, problemas cardíacos e crescimento de tumores, mostrando-se um biomarcador para danos teciduais (ESTEVES e EHRILICH, 2006; FURUHASHI et al, 2008; ZHANG et al, 2013; ZHENG et al 2014; LAU et al 2016; SAUTER et al, 2017). Em camundongos nocautes para o gene FAPB há uma menor atividade de macrófagos em infecções bacterianas, diminuindo a sensibilidade ao LPS e a resposta inflamatória (MAKOWSKI et al, 2005).

Em invertebrados já foram encontrados mais de 30 genes codificantes para FABP, sendo que um mesmo organismo pode apresentar isoformas diferentes, tecido-específicas com diferenças na afinidade de ligação (TOLEDO-SILVA et al, 2017).

A primeira espécie de invertebrado a ter uma FABP isolada foi o gafanhoto *Schistocerca gregaria* pelos pesquisadores Haunerl e Chisholm (1990). De lá pra cá, a família das FABPs foi estudada em outros grupos de invertebrados como moscas, nematódeos e platelmintos (ORITO, 2014). ZHENG *et al* (2013) estudou a presença de genes que codificam FABPs em 34 espécies de invertebrados, incluindo moluscos, sendo que, em apenas duas espécies de Cnidaria esses genes não foram identificados. Em *Crassostrea gigas* foram descritas várias isoformas de iLBPS nos palpos labiais, manto, brânquia, glândula digestiva e músculo adutor. Ainda assim, há poucos estudos ecotoxicológicos envolvendo FABPs em invertebrados, sendo pouco esclarecida sua função nos processos de metabolização de xenobióticos, stress oxidativo e resposta imunológica (TOLEDO-SILVA *et al*, 2017).

C. gigas são animais comumente usados como organismos sentinela em estudos com biomarcadores de contaminação aquática. Aliado a isso, o aumento na transcrição do gene relacionado à isoforma FABP2 (ou *CgiLBP4*) em brânquias de *C. gigas* expostas ao esgoto sanitário (MEDEIROS *et al*, 2008; FLORES-NUNES *et al* 2015) e ibuprofeno (SERRANO *et al*, 2015) e sua alta concentração também encontrada nos palpos labiais (descrita como isoforma *CgiLBP4*) (TOLEDO-SILVA *et al*, 2017), justifica a necessidade de uma maior elucidação da estrutura dessa proteína e sua capacidade de ligação com diferentes ligantes para estudos de contaminação aquática e biomarcadores.

1.5 BIOLOGIA ESTRUTURAL PARA FABPs

Estudos *in silico* se baseiam em modelos computacionais, para aprimorar o entendimento sobre as relações entre a estrutura e a atividade (QREA) ou entre a estrutura e propriedades funcionais (QSAR) entre outros modelos (MODA, 2007). Nas análises de toxicidade, o uso de metodologias *in silico* possibilita um melhor custo-efetividade, reduzindo o tempo e os custos das análises, além da diminuição do uso de animais em testes *in vivo*. Os modelos computacionais podem auxiliar a seleção de moléculas promissoras e guiar a escolha das proteínas que serão testadas *in vitro* ou *in vivo*.

Enquanto as isoformas de FABP humanas têm sua estrutura conhecida e bem definida, há poucos modelos disponíveis da estrutura tridimensional das FABPs de invertebrados, sendo necessária a construção do modelo 3D e de testes de atracamento molecular.

Em relação à estrutura primária, entre as FABPs, pode haver uma variação significativa entre as proteínas, com cerca de 20% a 70% de identidade na sequência de aminoácidos (HERTZEL *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2013). Entretanto, sua estrutura terciária tende a ser conservada, sugerindo uma forte relação entre a forma e a função da proteína.

As FABPs têm formato cilíndrico, uma estrutura comumente vista em proteínas transportadoras de moléculas hidrofóbicas, sendo geralmente chamadas de β -barril. Essa conformação é formada por 10 folhas β -pregueadas, unidas de maneira anti-paralela por ligações de hidrogênio, onde se ligam várias moléculas de água (HERTZEL *et al.*, 2009; TOLEDO-SILVA *et al.*, 2017; ZAMARREÑO *et al.*, 2017).

Possuem aminoácidos apolares formando um núcleo hidrofóbico, que fica em contato com o ligante lipídico e aminoácidos polares voltados para o exterior, em geral argininas, onde ocorrem as ligações com a cabeça polar dos ácidos graxos de cadeia longa. Além das folhas β -pregueadas, duas α -hélices funcionam como uma “tampa”, abrindo e fechando para regular a entrada de ligantes na cavidade. Resíduos de fenilalaninas (Phe) presentes na α -hélice são muito importantes para a afinidade de ligação (HERTZEL *et al.*, 2009).

Estudos de interação e ligação são necessários para elucidar se o aumento na transcrição gênica de FAPB em brânquias de *C. gigas* expostas aos contaminantes, avaliada através da técnica de SSH, está relacionada a uma capacidade de ligação dessa FAPB com fármacos e outras moléculas além dos AG, atuando assim no processo de metabolização desses contaminantes e detoxificação nesses animais ou se é apenas um reflexo de um aumento na necessidade energética do animal derivado do stress causado pela exposição aos contaminantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a isoforma FABP2 em *Crassostrea gigas* e avaliar potenciais ligantes endógenos e xenobióticos

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer uma análise e comparação da sequência da FABP superexpressa em *C. gigas* com FABPs de outras espécies, para análise de conservação entre as isoformas de invertebrados;
- Construir um modelo da estrutura 3D funcional para a FABP2 de *Crassostrea gigas in silico*;
- Realizar os testes de atracamento molecular com o modelo construído de FABP2 e os ligantes palmitato, ibuprofeno e a sonda fluorescente 1,8-ANS, para analisar a afinidade de interação entre a proteína e os ligantes;
- Clonar, expressar e purificar a FABP em forma funcional para testes de ligação *in vitro* buscando validar os resultados encontrados nas análises *in silico*;
- Testar a interação *in vitro* entre a FABP e os ligantes palmitato e o ibuprofeno através do técnica de dicroísmo circular;
- Padronizar a ligação de FABP2 com a sonda fluorescente 1,8-ANS para ensaios de competição com ligantes.

3 METODOLOGIA

3.1 ANÁLISES *IN SILICO*

A FABP2 de *C.gigas* utilizada para as análises *in silico* foi sequenciada no laboratório (Labcai) previamente por MEDEIROS (2008). O gene da FABP2 tem 559 pares de base e está disponível no NCBI com o código ABU41520.1 (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da FABP2 de *C. gigas*, sequenciada previamente no laboratório por MEDEIROS (2008), usada para as análises *in silico*.

Sequência de nucleotídeos	GCCAGCGGAACCAATCAACATGGAAGAA ATCAAGTCCAAGTTTGAGGGAAACTGGGA ATGCATCAAAAAGGAAAATGTGGAGGGA TTTCTGGAGGCATTAGGAATCAACGTCAT CAAACGCAAGGCCGCTGCCCAGTTCAACC CTAAACTGTTGATCAGCGTGGGGGGCGGG TGCGTGAAGGTGGTCAGGAAGATGCCCAT CAAAGAAATCACCAACGAGTTCAAGCTGG ACGATGAAATCGACGTCAACGACACGACC ACAAATACAAGGCTAAACTGACATATTCC GACGGAAAGATGACGCTTTGTCTGCGAGC TGTAGTGGCAAATCTAAAGATAACACAAT AGTGAGGGAGATAGAGGGTGACAATCTC GTACAGACAGCAACATGAATGGCGTCACG GCTAAAACGACCTTCAAGAAATGTTAATA CCAGTATTCATTATCAGATGTGTCCATTTT TTTATGTGTTCAATGTATGAATTGTTTATC ATGTTTTGAGAGCCTTTTTACATAATAAAA AATAATATTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA
Sequência de aminoácidos	MEEIKSKFEGNWECIKKENVEGFLEALGINV IKRKAQAQFNPKLLISVGGGCVKVVRKMPI KEITNEFKLDDEIDVNDHDKYKAKLTYSD GKMTLCLRAVDGKSKDNTIVREIEGDNLVQ TATCNGVTAKTTFKKC

Primeiramente, a sequência de aminoácidos da FABP2 foi submetida ao BLASTp (NCBI) para comparação e alinhamento com sequências homólogas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*).

Foram selecionadas 5 espécies de organismos modelo, com FABP descrita, para alinhamento e comparação de sequências. As espécies de invertebrados selecionadas foram o nematódeo *Caenorhabditis elegans* e o braquiópoda *Lingula anatina*. Para representar o grupo dos vertebrados, foram selecionadas as isoformas intestinais de FABPs de três espécies, *Xenopus laevis*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*. O alinhamento foi feito na plataforma Clustal Omega e a edição e produção das imagens foram feitas no Jalview.

Para a construção do modelo 3D, foi utilizado como critério de seleção, um valor mínimo de 33% de identidade de sequência correspondentes às *holo*-FABPs (não foram selecionadas sequências com mutações ou deleções).

A modelagem em 3D da proteína foi feita na plataforma SwissModel (Swiss Institute of Bioinformatics, Suíça), alinhando a sequência da FABP2 com a proteína *holo*-FABP intestinal de rato em estrutura de cristal (molde PDB ID:2IF, Resolução: 2.0 Å).

O modelo 3D resultante foi utilizado para análise de atracamento molecular (*docking*), comparando as energias de ligação do ácido graxo de cadeia longa, ácido palmítico (ligante natural da proteína), da sonda fluorescente 1,8-ANS e do ibuprofeno. A plataforma Swissdock (Swiss Institute of Bioinformatics, Suíça) foi utilizada para criação do *docking*, usando uma flexibilidade de 5Å.

Para a análise do *docking*, escolha da pose e obtenção dos valores de ΔG e energia livre foi usado o *software* Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, EUA) e para a produção das imagens o *software* Pymol. As análises de ligação foram feitas pelo Pose View (Zentrum für Bioinformatik: Universität Hamburg, Alemanha).

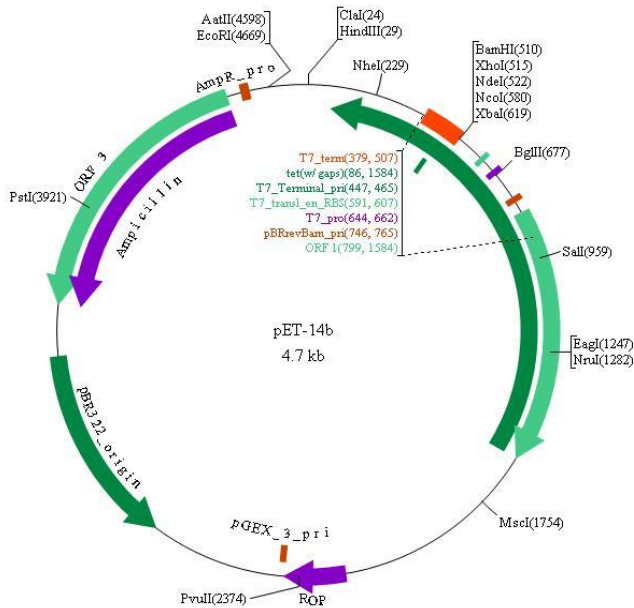
3.2 SUBCLONAGEM EM VETOR BACTERIANO

O plasmídeo bacteriano contendo o gene FABP (ABU41520.1) foi previamente desenhado e sintetizado (IDT life Technologies), a partir do gene de FABP de *C. gigas* sequenciada por MEDEIROS *et al.* (2008) (Tabela 1). Além da sequência de FABP, foram incluídos os sítios de restrição para as enzimas NdeI e BamHI.

Foi feita dupla digestão do plasmídeo com as enzimas NdeI e BamHI (Fermentas). Para isso, foi adicionado 1µg de cada enzima de restrição e 5µL de tampão buffer Tango à 1µg do DNA plasmidial, incubados por 1 hora à 37°C no termociclador (Eppendorf). O produto da clivagem foi separado por gel de agarose 2% e corado com GELRED (Uniscience), resultando em um material com 414 pares de bases (pb), conforme o esperado. Para extrair o DNA do gel de agarose foi utilizado kit de extração (Kit Qiagen), conforme o protocolo do fabricante e o material resultante foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, EUA) com leituras a 260nm.

O vetor de expressão utilizado foi plasmídeo pET14b, que contém uma sequência N-terminal de His-Tag seguido por um sítio de trombina (Figura 4). O pET14b foi digerido e purificado pelos mesmos protocolos utilizados para a FABP citados acima.

Figura 4: Representação gráfica do plasmídeo bacteriano pET-14b, mostrando o sítio de clivagem das enzimas NdeI e BamHI e o gene de resistência à ampicilina.



Fonte: Google imagens; disponível em <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET-14b.jpg>

A ligação do gene de FABP ao vetor de expressão foi feita através da reação da T4 DNA ligase (Fermentas). Para um volume final de reação de 20µL, foram adicionados 2µL da enzima ligase, 4µL do buffer da reação, 1,1µg de FABP e 50ng de pET-14b, em uma proporção de 3:1 de inserto e vetor, utilizando a fórmula: massa requerida do inserto(g) = razão molar inserto:vetor * massa do vetor(g) * razão do tamanho inserto e vetor. Foram feitos controles sem a adição do inserto de FABP. A reação foi incubada a 16°C *overnight* em termociclador (Eppendorf).

O produto resultante da ligação (pET14b-FABP) foi utilizado para transformação de bactérias competentes *E.coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS, através da técnica de choque térmico. Para isso, 1µg de FABP ligada ao vetor de expressão foram incubados com 50µL de BL21 por 30 minutos no gelo, seguido de 1 minuto em banho-maria a 42°C e mais 1 minuto no gelo. Após o choque térmico, foi adicionado

1ml de meio líquido LB Broth (Sigma-Aldrich) sem antibióticos e feita a incubação em incubadora de bancada (Cientec) com agitação a 130 rpm e temperatura de 37°C por 1 hora e 20 minutos.

Após esse período, o meio de cultura foi centrifugado por 5 min a 5000 rpm em microcentrífuga de bancada (Sigma) para formação de pellet bacteriano. Foram descartados 800 µL do sobrenadante e o pellet foi ressuscitado nos 200µL restantes, que foram utilizados para plaqueamento em meio de cultura LB sólido (Sigma-Aldrich) com os antibióticos ampicilina (100µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL). A placa foi incubada em estufa a 37°C *overnight* e armazenada em geladeira a 10°C.

3.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para o pré-inóculo, foram selecionadas colônias isoladas de BL21 transformadas com pET14b-FABP e incubadas para crescimento em 10ml em meio líquido LB a 37°C com agitação de 130rpm *overnight*.

Após a incubação *overnight*, 1L de meio líquido LB Broth (Sigma-Aldrich) foi dividido em 4 erlenmeyers, com 250ml de LB em cada. Para cada erlenmeyer, foram adicionados 250µL de ampicilina (100µg/mL), 250µL de cloranfenicol (34µg/mL) e o pré-inóculo de BL21 (proporção 1:100) e foi feita a incubação a 37°C com agitação de 130 rpm até atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,6 a 0,8 a 600 nm de absorbância. Quando a DO foi atingida, foi adicionado 250µL de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) 1M para indução da expressão da proteína heteróloga, e o meio de cultura foi incubado novamente a 37°C por 3 horas.

Finalizadas as 3 horas de incubação, a cultura foi centrifugada a 4500rpm por 30 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Eppendorf), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi congelado a -20°C. Para análise quantitativa da expressão foi feito eletroforese em gel de poliacrilamida 15% do sobrenadante e corado com *Comassie Blue*.

3.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

O *pellet* foi ressuscitado com tampão de Lise-fosfato (50mM Tris Base, 250mM NaCl, 5mM DTT, Glicerol a 10%, pH 7,0) e

sonicado (sonicador ultra sônico) no gelo por 5 min, em ciclos de 30 segundos com 30s de intervalo e amplitude de 34%. Depois de sonicado, o material foi centrifugado a 4°C por 20 minutos a 15000rpm (Ultracentrífuga refrigerada Hitachi). O sobrenadante foi purificado com cromatografia por metal imobilizado (IMAC) usando coluna de níquel *HisTrap* (*HisTrap HP Kit for Purification of Histidine Tagged Proteins*, GE) ligada a um cromatógrafo *AKTA purifier* (GE Healthcare). Para equilibrar a coluna foi utilizado o tampão de lise e para eluir a amostra foram feitas lavagens com concentrações crescentes de imidazol utilizando o tampão de eluição (5mM Tris Base, 0,25M NaCl, 0,005M DTT, 1M Imidazol, Glicerol 10%, pH 7,0).

A análise qualitativa do resultado da purificação foi feita utilizando gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% corado com *Comassie Blue G-250* (Sigma-Aldrich). A quantificação das frações proteicas de rFABP foi feita através da fluorescência do triptofano, utilizando espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, EUA) com leituras a 280nm.

Para retirar possíveis ácidos graxos ligados previamente à proteína recombinante, a rFABP foi incubada em resina de Lipidex-1000 (Hydroxyalkoxypropyl-Dextran). Foram adicionados 200µL da FABP purificada em um microtubo com solução Lipidex, incubados a 37°C por 1 hora e então centrifugados por 4 min a 10.000g e o sobrenadante foi guardado. Foi medida a diferença na capacidade de ligação da FABP antes e depois do processo de Lipidex utilizando a sonda fluorescente 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS) em fluorímetro.

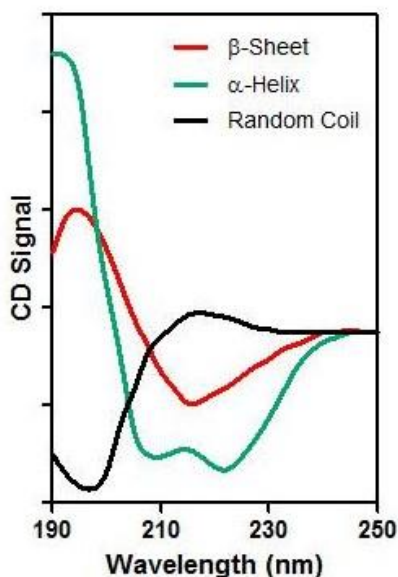
Posteriormente, para retirar o imidazol e NaCl, as frações proteicas foram dialisadas com tampão PBS (0,01M NaH₂ PO₄ , 0,025 NaCl, 0,002 DTT e Glicerol 5%) por 4 e 12 horas.

3.5 DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

Para analisar a estrutura secundária da rFABP, enovelamento e possíveis alterações na conformação decorrentes da interação com ligantes, foi utilizada a metodologia de dicróismo circular. Para isso, a FABP obtida após as metodologias de diálise e Lipidex, foi diluída em tampão com etanol e 5µM da proteína foram adicionados em uma

cubeta de quartzo, com caminho óptico de 10mm. Os espectros do CD foram medidos em espectropolarímetro (Jasco modelo J-815 com acessório de Peltier modelo PDF 425S-15) em comprimento de onda entre 195nm- 300nm. Também foi analisada a influência da temperatura na desnaturação da proteína, utilizando variações de temperatura de 30°C até 90°C. Foram feitas medições da proteína apo e com concentrações crescentes de 0,25 a 4 μ g de palmitato e ibuprofeno separadamente. O modelo proposto para as curvas de α -hélices e folhas- β (GREENFIELD, 2006) foi usado para comparação e análise dos resultados encontrados (Figura 5).

Figura 5: Padrão descrito para o espectro gerado para α -hélices, folhas- β e estruturas randômicas.



3.6 ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA

A padronização da metodologia de fluorescência foi feita com a proteína albumina de soro bovino (BSA), comumente utilizada em protocolos padrão. Utilizando-se 5 μ M de BSA, 70 μ L de tampão TRIS (pH 7,5) e concentrações de 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M e 3,12 μ M de

ANS. A taxa de fluorescência foi medida em fluorímetro. Foram feitas triplicatas de cada reação e o valor médio foi utilizado para a criação da curva padrão.

Após a padronização com BSA, foram feitos os testes de emissão de fluorescência da FABP purificada, pelo aminoácido triptofano e da sonda com concentrações crescentes da 1,8-ANS.

O triptofano é uma aminoácido com anel aromático e fluoróforo, portanto, a fluorescência emitida pela própria FABP foi medida, para analisar um possível deslocamento da curva de emissão, nos comprimentos de onda de 280nm para excitação e 310-520nm emissão.

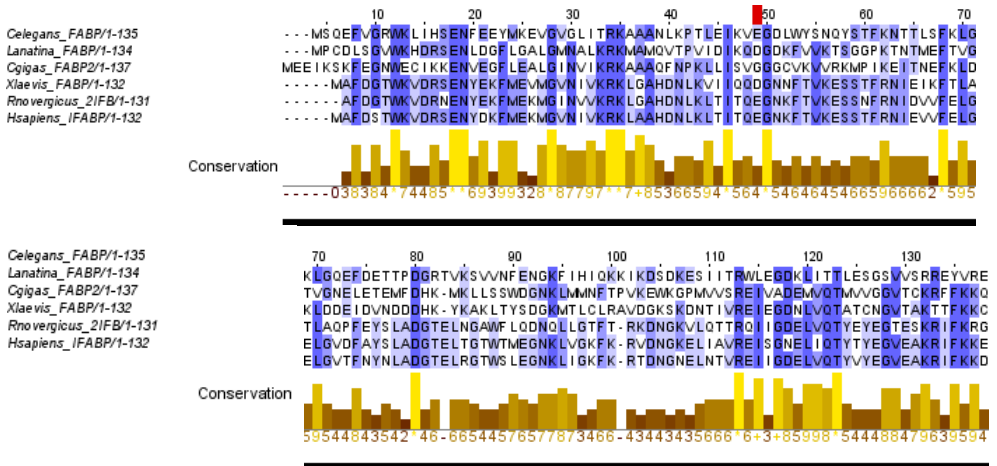
4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES IN SILICO

Para analisar o grau de identidade e conservação da sequência primária da FABP2 de *C. gigas*, foi feito o alinhamento de sequências usando a plataforma Clustal Omega. Foram selecionadas duas espécies de invertebrados, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* e o braquiópoda *Lingula anatina*. Para representar o grupo dos vertebrados foram selecionadas as isoformas intestinais de três espécies, *Xenopus laevis*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*, sendo a isoforma intestinal de *R. norvegicus* (2ifb) a sequência que serviu posteriormente de molde para criação do modelo 3D.

O alinhamento das sequências mostrou que, apesar de uma identidade de sequência média de 30% entre as espécies selecionadas, alguns aminoácidos permanecem altamente conservados (Figura 6). O resíduo Arg112 em *C. gigas* (Arg106 nas espécies comparadas, ocupando a mesma posição) está presente nas cinco espécies. O Trp82 que também forma pontes de hidrogênio com os ligantes está conservado nas três espécies de vertebrados, enquanto em *C. gigas* essa posição é ocupada por um resíduo de leucina (Leu87).

Figura 6: Alinhamento das sequências da FABP2 de *C. gigas* com isoformas de FABP das espécies *Caenorhabditis elegans*, *Lingula anatina*, *Xenopus laevis* (intestinal), *Rattus norvegicus* (intestinal) e *Homo sapiens* (intestinal - IFABP), mostrando a conservação e grau de identidade. Aminoácidos marcados em azul são mais conservados entre as espécies, sendo que quanto mais forte o azul, maior a identidade.



Para analisar a conservação entre invertebrados e vertebrados separadamente, foram feitos alinhamentos separados entre os grupos. Enquanto as espécies de invertebrados obtiveram uma porcentagem de 28.72% de identidade de sequência (Figura 7), as FABPs de vertebrados apresentaram uma identidade de sequência de 73.86% (Figura 8).

Figura 7: Alinhamento das seqüências de FABP2 de *C. gigas* com isoformas de FABP apenas com as espécies de invertebrados *C. elegans* e *L. anatina*, mostrando a conservação e grau de identidade. Aminoácidos marcados em azul são mais conservados entre as espécies, sendo que quanto mais forte o azul, maior a identidade.

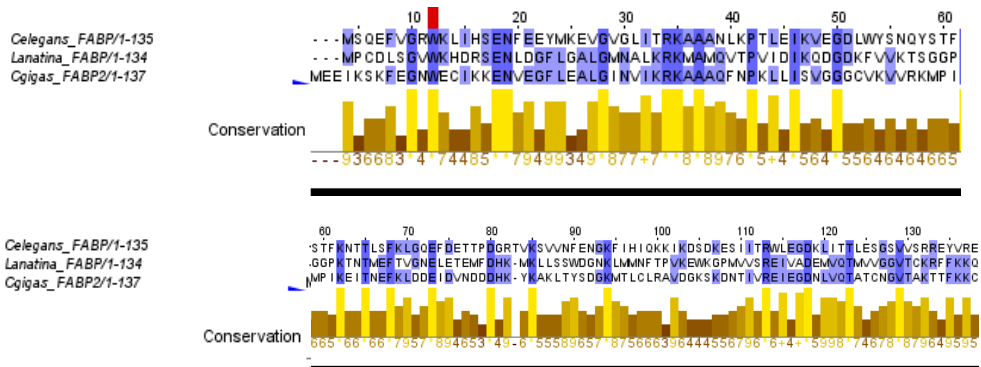
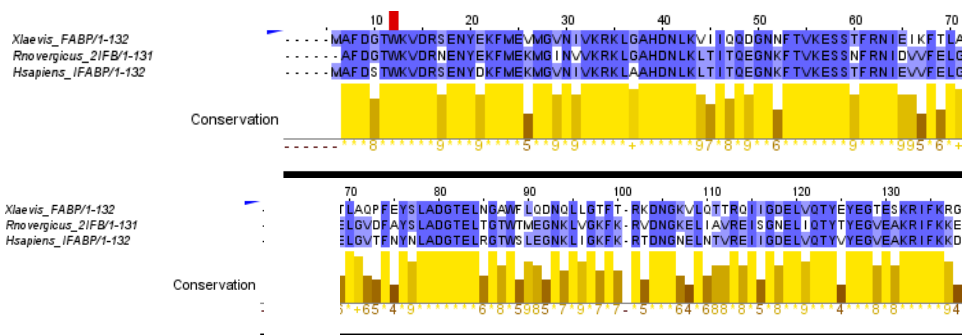
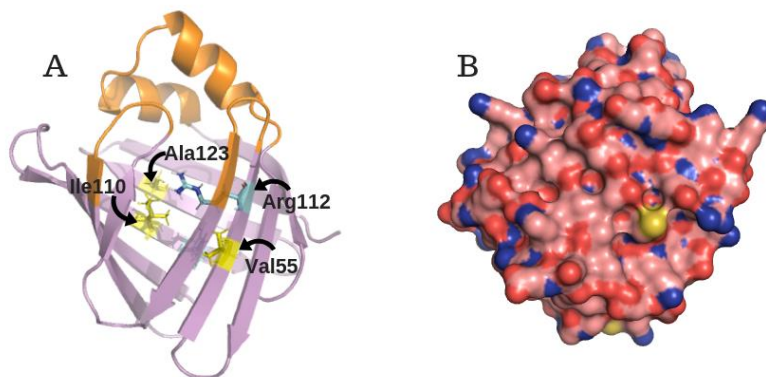


Figura 8: Alinhamento das seqüências de FABP intestinal dos vertebrados *Xenopus laevis*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*, mostrando a conservação e o grau de identidade. Aminoácidos marcados em azul são mais conservados entre as espécies, sendo que quanto mais forte o azul, maior a identidade.



O modelo 3D da CgFABP foi criado a partir da estrutura cristalográfica *holo*-FABP intestinal de rato (molde PDB ID: 2IFB, Resolução: 2.0 Å) sendo a estrutura mais idêntica a FAPB de *C. gigas*. O modelo obtido (Figura 9) apresentou 35% de identidade de sequência, QMEAN4 de -16.18 e foi utilizado para as análises de atracamento molecular (*docking*). Os quatro domínios - ponte salina, região do portal, região das alças e *charge quartet*, são conservados na estrutura terciária embora no alinhamento de sequências apresentem baixa conservação.

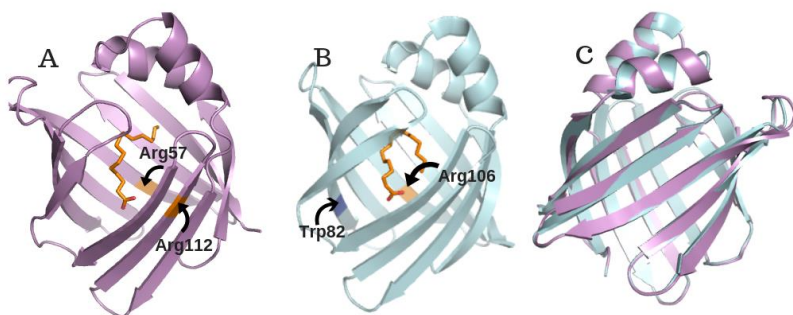
Figura 9: Estrutura terciária proposta para FABP2 de *C.gigas*. A. Estrutura em *cartoon* mostrando o barril beta com 10 folhas β -pregueadas e as duas α -hélices, com a região do portal destacada em laranja, os resíduos apolares Val55, Ile110 e Ala123 destacados em amarelo e o resíduo polar Arg112 destacado em azul. B: Estrutura da superfície da proteína, colorida de acordo com os átomos da superfície.



Apesar da baixa homologia na estrutura primária, a estrutura terciária mantém-se conservada, com a forma característica de beta-barril das proteínas responsáveis pelo transporte de ácidos graxos. A rFABP de *C. gigas* possui 10 folhas β -pregueadas antiparalelas e duas α -hélices.

Na imagem 10 é possível analisar a semelhança entre as estruturas terciárias do modelo de FABP de *C. gigas* e o molde 2IFB, ambos com 131 resíduos de aminoácidos e similaridade estrutural de 0.98848 (*TM score*). O valor do desvio da raiz quadrada média das posições atômicas (*root-mean-square deviation of atomic positions - RMSD*) foi de 0.27.

Figura 10: Comparação entre o modelo estrutural proposto para FABP2 de *C. gigas* e a FABP intestinal de rato (2IFB) que serviu de molde para criação na plataforma swissmodel. A: Modelo da FABP2 de *C. gigas* em cartoon com os resíduos Arg57 e Arg112 destacados em laranja e o ligante natural palmitato no centro da cavidade. B: *holo*-FABP intestinal de rato (2IFB) obtida a partir de cristalografia e disponível no banco de dados PDB, com o palmitato ligado na cavidade. O resíduo Arg106 está destacado em laranja e o resíduo Trp82 está destacado em azul. C. Sobreposição das duas estruturas, em rosa a FABP2 de *C. gigas* e em azul a FABP intestinal de rato.



Com a metodologia de atracamento molecular foi possível avaliar a relação proteína-ligante em FABP de *C. gigas* e obter os valores de ΔG e energia livre resultante das interações (Tabela 2).

A primeira relação proteína-ligante avaliada foi entre a FABP e o ácido palmítico, ácido graxo de cadeia longa e ligante natural de FABP em vertebrados e invertebrados. Os valores de ΔG e energia livre resultantes dessa interação foram comparados aos valores de interação com os ligantes ibuprofeno e ANS para inferir uma possível interação da proteína com esses ligantes não-clássicos. Valores próximos ou mais negativos que os ligantes naturais indicam uma possível ligação com a proteína.

Tabela 2: Valores de energia livre e ΔG resultantes do atracamento molecular da FABP2 de *C. gigas* com os ligantes palmitato, ANS e ibuprofeno. Valores negativos indicam uma possível ligação com a proteína.

Molécula	<i>Fullfitness</i>	ΔG (estimado)
Palmitato	-1.074.5951	-10,2 kcal/mol
ANS	-958.2059	-7,1 kcal/mol
Ibuprofeno	-1.019.1214	-8,9 kcal/mol

O *docking* de FABP e palmitato apresentou um ΔG de -10,204kcal/mol, enquanto os valores da ligação com a ANS e o ibuprofeno foram de -7,1kcal/mol e -8,9kcal/mol, respectivamente. Os resultados obtidos mostram que a energia de ligação e ΔG são negativos e próximos aos ligantes naturais, o que sugere que tanto a sonda 1,8-ANS quanto o ibuprofeno possuem potencial para interagir com a porção interna da rFABP de *C. gigas* e para que haja deslocamento por competição é necessário uma alta concentração de competidores.

Para analisar melhor a competição entre os ligantes, foram obtidas as imagens resultantes do atracamento molecular. As argininas Arg57 e Arg112 foram destacadas para mostrar a formação das pontes de hidrogênio com a cabeça polar do palmitato (Figura 11) e com o ibuprofeno (Figura 12). As argininas apresentaram um papel de destaque na ligação com o palmitato e o ibuprofeno, juntamente com alguns aminoácidos apolares como a Val55 e o Asn66, indicando que os mesmos aminoácidos são responsáveis pela ligação. O *docking* com a sonda 1,8-ANS (Figura 13) mostrou aminoácidos diferentes, responsável pela ligação fora da cavidade. Nesse caso, foram destacados os aminoácidos Val20 e Glu21 que fazem ponte de hidrogênio com a 1,8-ANS além dos resíduos Lys17 e Ala38 que fazem uma interação apolar. A Val20 foi substituída por um resíduo de tirosina nos vertebrados.

Figura 11: Resultado do atracamento molecular da FABP2 de *C. gigas* e o palmitato pela plataforma Swissdock. Em A, a proteína completa com as argininas destacadas como bastões e o palmitato dentro do sítio de ligação. Em B, uma imagem da cabeça polar do palmitato fazendo ponte de hidrogênio com a Arg112. Em C, a imagem bidimensional produzida na plataforma pose view mostrando a estrutura da ligação com o resíduo Arg112 formando uma ponte de hidrogênio com o oxigênio da cabeça polar do palmitato e os resíduos Ile110 e Ala123 fazendo interações hidrofóbicas

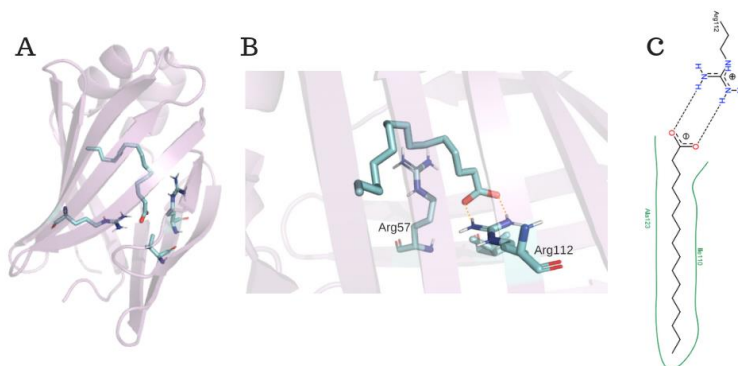


Figura 12: Resultado do atracamento molecular da FABP2 de *C. gigas* e o ibuprofeno pela plataforma swissdock. Em A a proteína completa com as argininas destacadas como bastões e o ibuprofeno dentro do sítio de ligação. Em B, uma imagem detalhada da cabeça polar do ibuprofeno fazendo ponte de hidrogênio com a Arg112. Em C imagem bidimensional produzida na plataforma pose view mostrando a estrutura da ligação com o resíduo Arg112 formando uma ponte de hidrogênio com os oxigênios do ibuprofeno e o resíduo Ile110 responsável pelas interações hidrofóbicas.

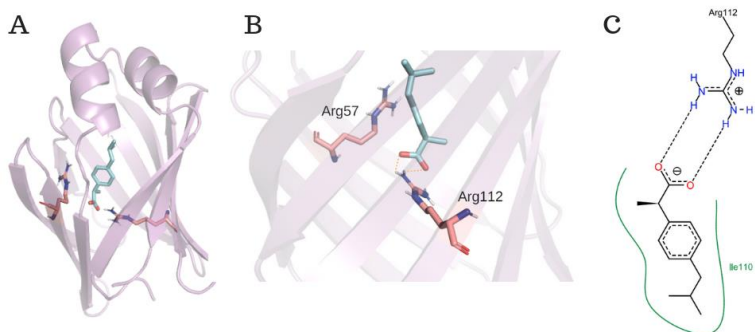
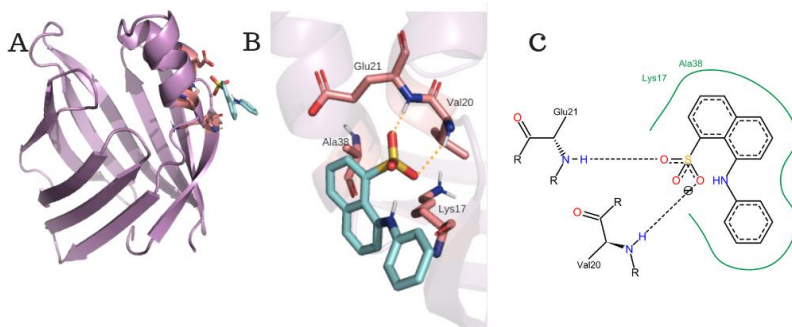


Figura 13: Resultado do atracamento molecular da FABP2 de *C. gigas* e a sonda ANS pela plataforma swissdock. Em A, a proteína completa com os resíduos Val20 e Glu21 destacados em bastão e a sonda fora da cavidade de ligação. Em B um zoom mostrando os detalhes da ponte de hidrogênio com os resíduos Val20 e Glu21 destacados em bastões. Em C a imagem do poseview mostrando a estrutura 2D das pontes de hidrogênio e da interação apolar da ANS com os resíduos Lys17 e Ala38.



Para comparação, foram feitos os *dockings* com a FABP intestinal de rato (2IFB) e os ligantes palmitato (Figura 14), ibuprofeno (Figura 15), e ANS (Figura 16). Os resultados de energia total podem ser vistos na tabela 3.

Tabela 3: Valores de energia livre e ΔG resultantes do atracamento molecular da FABP2 de *R. norvegicus* com os ligantes palmitato, ANS e ibuprofeno. Valores negativos indicam uma possível ligação com a proteína.

FABP 2IFB	Fullfitness	ΔG
Palmitato	-893.272	-9.39188
Ans	-723.0506	-6.74428

Ibuprofeno	-844.3614	-8.0728655
------------	-----------	------------

O atracamento molecular mostrou que na isoforma 2ifb, o resíduo Trp82, em conjunto com a Arg106, tem um papel principal na ligação e formação de pontes de hidrogênio. O Trp82, está ausente na CgFABP2 porém é conservado nas 3 espécies de vertebrados analisadas, sendo uma peça chave para a formação de pontes de hidrogênio com os ligantes. Entretanto, na ligação com a 1,8-ANS, outro aminoácido, Gln42, parece ser o responsável pela ponte de hidrogênio, com uma ligação em um sítio diferente da cavidade de ligação ocupada pelo palmitato e pelo ibuprofeno (Figura 16). O resíduo Gln42 é conservado apenas entre os vertebrados e em *C. gigas* é substituído por um resíduo de valina.

Figura 14: Resultado do atracamento molecular da FABP intestinal de rato (2ifb) e o palmitato pela plataforma swissdock. Em A a proteína completa com os resíduos Trp82 e Arg106 destacados como bastões e o palmitato dentro do sítio de ligação. Em B um zoom mostrando os detalhes da cabeça polar do ibuprofeno fazendo ponte de hidrogênio com a Arg106 e com o Trp82. Em C imagem bidimensional produzida na plataforma poseview mostrando a estrutura da ponte de hidrogênio com a cabeça polar do palmitato e a interação hidrofóbica do ligante com o resíduo Ile110.

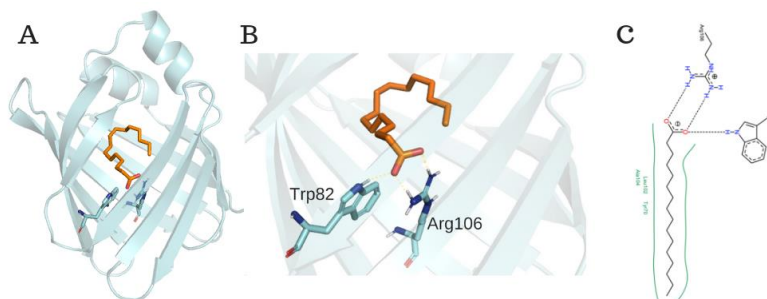


Figura 15: Resultado do atracamento molecular da FABP intestinal de rato (2ifb) e o ibuprofeno pela plataforma swissdock. Em A a proteína completa com os resíduos Trp82 e Arg106 destacados em bastões e o ibuprofeno dentro do sítio de ligação. Em B um zoom mostrando os detalhes da cabeça polar do ibuprofeno fazendo ponte de hidrogênio com a Arg106 e com o Trp82. Em C imagem bidimensional produzida na plataforma poseview mostrando a estrutura da ponte de hidrogênio com os oxigênios do ibuprofeno, com destaque para a ponte de hidrogênio com o Trp82 e a interação entre os anéis aromáticos do ibuprofeno e da tirosina, que estão ausente na CgFABP2. A interação apolar é feita através do resíduo Ile110.

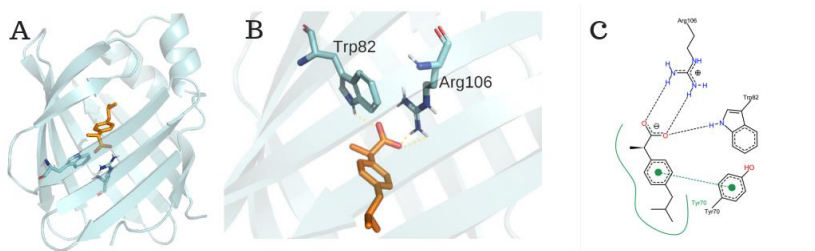
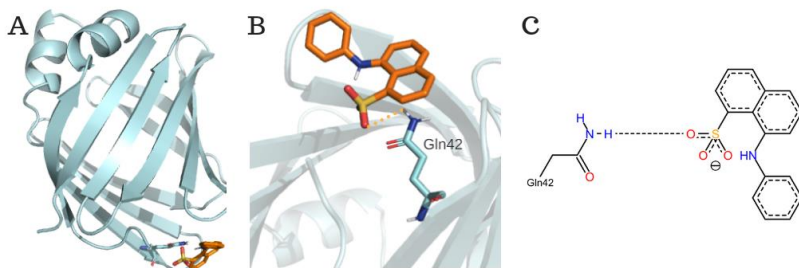


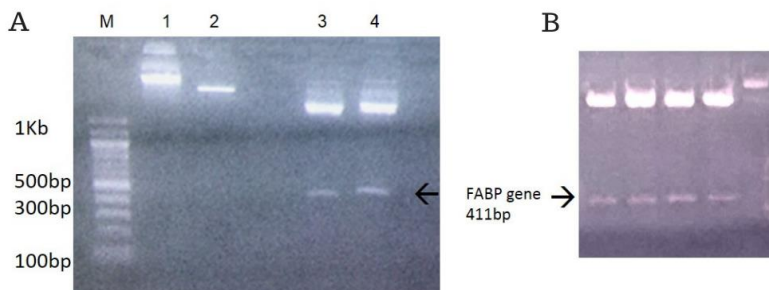
Figura 16: Resultado do atracamento molecular da FABP intestinal de rato (2ifb) e a 1,8-ANS pela plataforma swissdock. Em A a proteína completa com o resíduo Gln42 destacado em bastão e a 1,8-ANS fora do sítio de ligação. Em B um zoom mostrando os detalhes da ponte de hidrogênio entre o resíduo Gln42 e o oxigênio da 1,8-ANS. Em C imagem bidimensional produzida na plataforma pose view mostrando a estrutura da ponte de hidrogênio com o oxigênio da ANS.



4.2 SUBCLONAGEM DA FABP EM VETOR DE EXPRESSÃO

O gene da FABP2 de *C. gigas* (isoforma ABU41520.1) foi ligado no vetor de expressão pET-14b. Após a clivagem do plasmídeo clonado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I foi possível observar uma banda de aproximadamente 400pb (Figura 17) compatível com o tamanho esperado de 411pb.

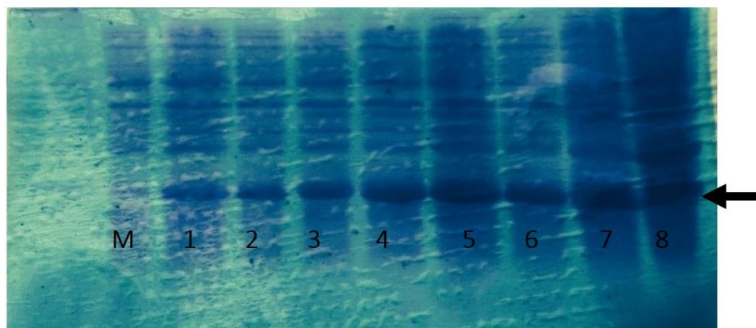
Figura 17: Gel de agarose mostrando a subclonagem do gene de FABP no vetor de expressão pET-14b. Em A, o M é o marcador de peso molecular, em 1 o vetor fechado, em 2 o vetor aberto com *Nde*I e *Bam*HI. Nas colunas 3 e 4 estão o vetor de expressão abertos e os fragmentos do gene de FABP. Em B, é possível ver o resultado da ligação final e as bandas de FABP.



4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

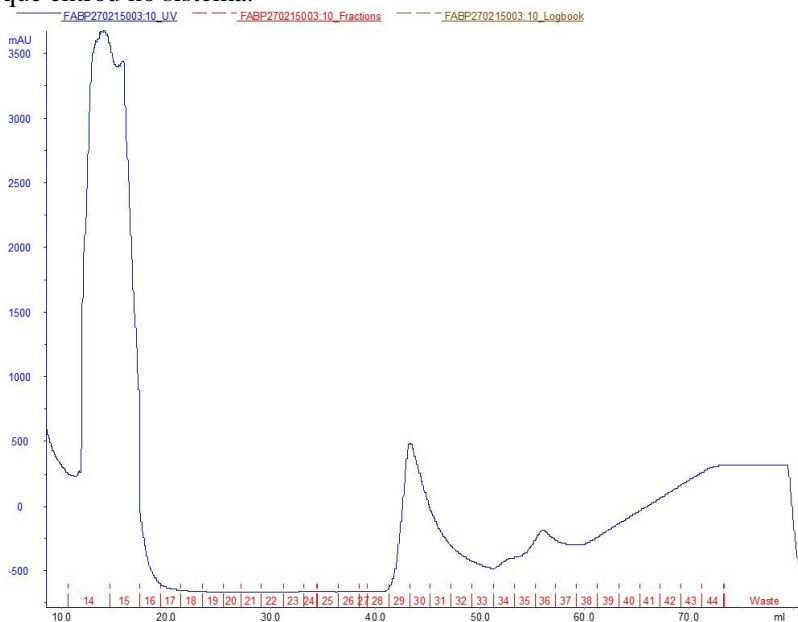
Com as análises em gel de poliacrilamida SDS-page do *pellet* e sobrenadante resultantes da expressão heteróloga verificou-se que grande parte da expressão da proteína FABP recombinante (rFABP) estava solúvel no sobrenadante, não sendo necessário, portanto, nenhum processo de renovelamento. A proteína apresentou o tamanho esperado de 17kD com o acréscimo da cauda de histidina *His-Tag*. A FABP recombinante é expressa em alta quantidade a partir de 3 horas de indução com 1M de IPTG (Figura 18).

Figura 18: Gel de poliacrilamida mostrando o resultado da expressão de FABP. Amostra do sobrenadante. A seta indica a banda esperada para FABP. Em M está o marcador molecular. 1 e 2 a expressão no momento de indução do IPTG. 3 e 4 após duas horas de indução, 5 e 6 após três horas de indução, 7 e 8 mostra a quantidade de proteína expressa no período *overnight*.



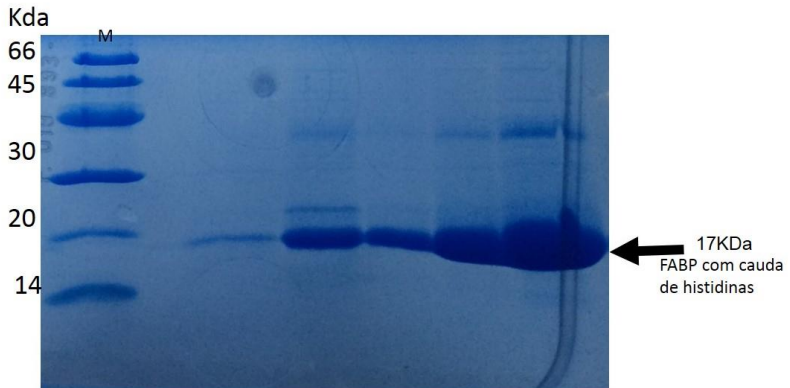
Após 3 horas de expressão induzidas com IPTG, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi purificado através da técnica de cromatografia por afinidade. Na figura 19 pode-se visualizar os picos de radiação ultravioleta (UV) durante o processo de purificação no HPLC (Cromatografia por afinidade). O primeiro pico é referente a entrada de FABP no sistema e os outros picos são referentes a saída da FABP purificada do sistema devido ao aumento progressivo do imidazol, que compete com a cauda *His-Tag* da FABP pela ligação com as histidinas da coluna cromatográfica.

Figura 19: Gráfico resultante da Cromatografia Líquida de alta resolução mostrando a radiação ultravioleta durante o processo de purificação da FABP. O primeiro pico mostra quando a proteína foi injetada no sistema e os outros picos mostram a saída da coluna pelo aumento da concentração de imidazol. O eixo X mostra a intensidade da radiação ultravioleta (mAU) e o eixo Y a quantidade em mL de líquido que entrou no sistema.



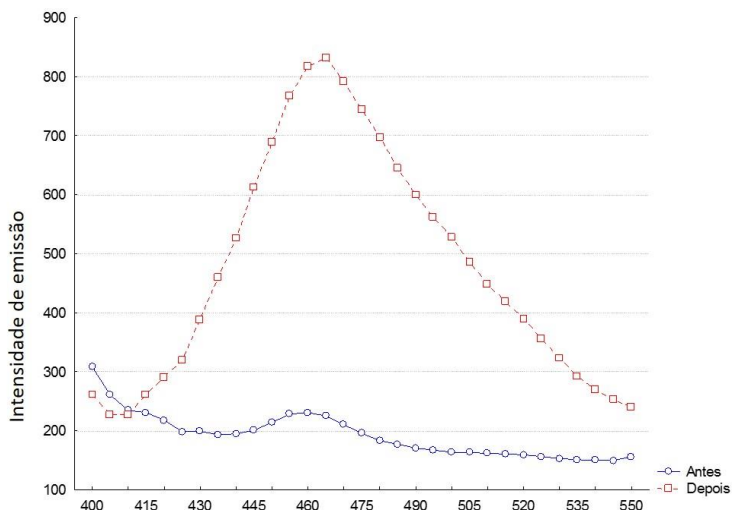
O gel de poliacrilamida mostrando o resultado final da purificação está representado na figura 20. Pelo gel é possível observar a qualidade das amostras. As amostras com maior concentração de proteína foram usadas para os testes de fluorescência e dicroísmo circular.

Figura 20: Gel de poliacrilamida mostrando o resultado da purificação por cromatografia de afinidade. Em M o marcador molecular.



Na figura 21 o gráfico mostra a diferença de fluorescência no pico de 470nm devido a ligação da 1,8-ANS com a FABP após a remoção dos ácidos graxos pela coluna lipidex. A alteração na curva de fluorescência indica que a 1,8-ANS consegue se ligar à proteína significativamente apenas após a retirada dos possíveis lipídeos ligados à proteína anteriormente no processo de clonagem e expressão.

Figura 21: Gráfico mostrando a fluorescência da sonda 1,8-ANS ligada à FABP antes (em azul) e depois (em vermelho) da técnica do lipidex de remoção dos ligantes endógenos. O pico da 1,8-ANS ocorre do comprimento de onda de 470nm.



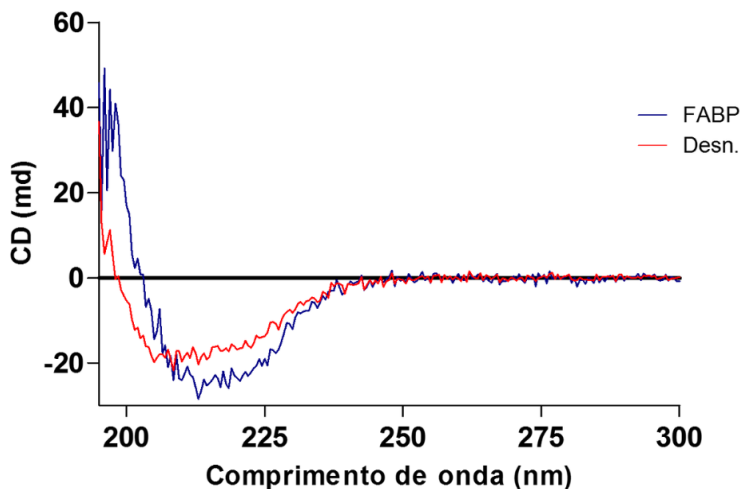
A proteína purificada e com os possíveis ácidos graxos da bactéria *E. coli* BL21 ligados a FABP removidos foi utilizada para os testes de interação de dicroísmo circular e fluorescência.

4.4 TESTES DE INTERAÇÃO: DICROÍSMO CIRCULAR

A metodologia de dicroísmo circular (CD) é utilizada para medir a atividade óptica de moléculas quirais, como proteínas, através da absorção diferencial da luz circularmente polarizada. No presente estudo, a técnica de CD foi utilizada para analisar a estrutura secundária e o enovelamento da FABP2 de *C. gigas*, além da temperatura de desnaturação e alterações conformacionais resultantes da adição dos ligantes palmitato e ibuprofeno.

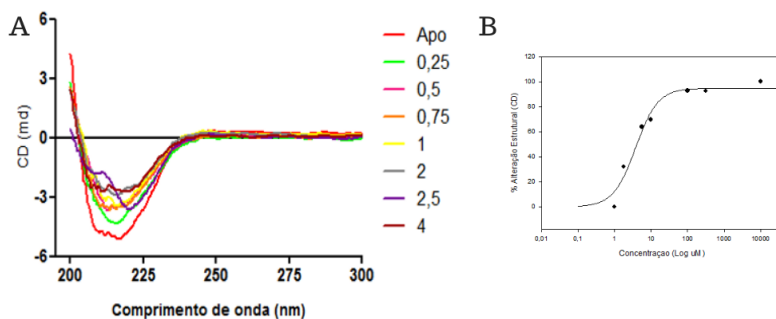
O experimento de CD com a proteína *apo*-FABP, ou seja, sem ligante, como pode ser observado na figura 22, apresentou um espectro clássico de proteínas com estrutura em β -barril.

Figura 22: Gráfico mostrando o experimento inicial de dicroísmo circular (CD), com a CgFABP2 em azul mostrando um padrão típico de folhas-beta. Em vermelho a proteína desnaturada na temperatura de 65°C.



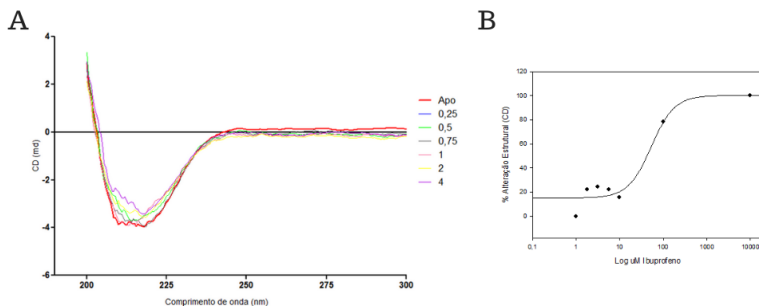
Para o teste de interação com o palmitato, foram adicionadas concentrações crescentes do ligante. No gráfico (Figura 23) é possível ver variação nas curvas do comprimento de onda, principalmente na faixa de 210-225nm, sugerindo uma mudança estrutural, principalmente na estrutura das folhas β -pregueadas.

Figura 23: Resultado do experimento de dicroísmo circular mostrando as diferenças no comprimento de onda emitido pela FABP na presença de concentrações de palmitato. A: A linha vermelha representa a proteína apo e as outras linhas representam a variação na quantidade de palmitato (em μg) adicionados a amostra, conforme as cores da legenda. B: Escala logarítmica mostrando a relação entre porcentagem de variação estrutural e concentração de palmitato.



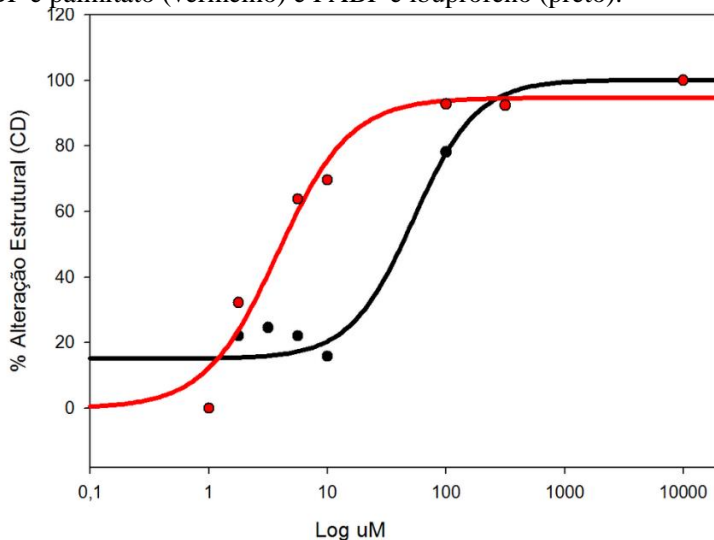
Para o experimento de CD com a FABP e ibuprofeno, também foram usadas concentrações crescentes do ligante. No gráfico (Figura 24) é possível ver variação nas curvas do comprimento de onda, principalmente na faixa de 210-225nm, sugerindo que também há uma mudança estrutural na presença do ibuprofeno, principalmente na estrutura das folhas β -pregueadas.

Figura 24: Resultado do experimento de dicroísmo circular mostrando as diferenças no comprimento de onda emitido pela FABP na presença de concentrações de ibuprofeno. A: A linha vermelha representa a proteína apo e as outras linhas representam a variação na quantidade de ibuprofeno (em μg) adicionados a amostra, conforme as cores da legenda. B: Escala logarítmica mostrando a relação entre porcentagem de variação estrutural e concentração de ibuprofeno.



A comparação da variação estrutural da FABP2 na presença de palmitato versus presença de ibuprofeno em escala logarítmica é importante para perceber a variação das curvas. Com a escala logarítmica observa-se que há uma clara relação entre a quantidade de ligante e a mudança conformacional da proteína. Além disso, nota-se que o palmitato causa mudanças conformacionais e desnaturação mesmo em menores concentrações, portanto é necessário uma concentração maior de ibuprofeno para causar a mesma mudança estrutural causada pelo palmitato. Quando analisamos a EC_{50} destas curvas percebemos que palmitato afeta a estrutura da FABP em aproximadamente dez vezes mais que ibuprofeno (Figura 25).

Figura 25: Comparação das escalas logarítmicas da interação entre FABP e palmitato (vermelho) e FABP e ibuprofeno (preto).

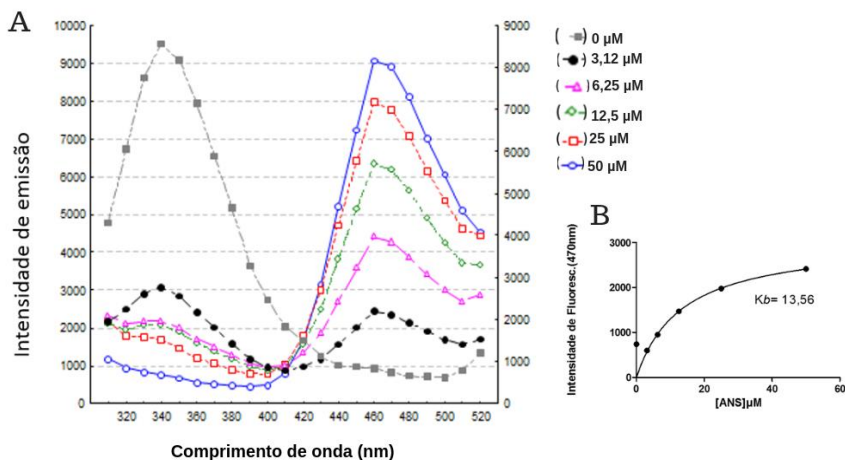


4.5 TESTES DE INTERAÇÃO: FLUORESCÊNCIA

Para padronizar a técnica, foi utilizada a albumina do soro bovino. Na figura 26 está o gráfico mostrando o pico de emissão de fluorescência do triptofano em 350nm e o pico de emissão com concentrações crescentes de 1,8-ANS em 470nm.

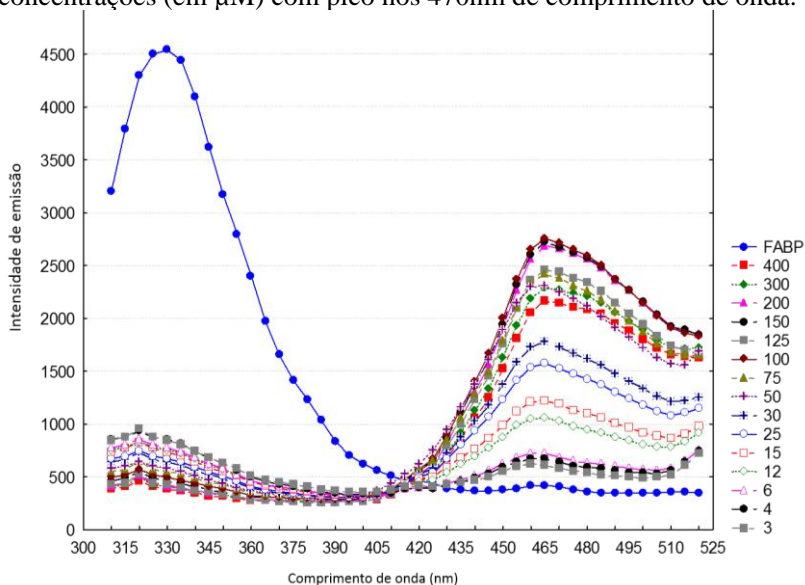
O aminoácido triptofano é um fluoróforo intrínseco devido à sua estrutura em anel aromático e, portanto, é utilizado em testes de fluorescência para analisar principalmente a conformação da proteína e possíveis alterações estruturais causadas por mudanças no ambiente ou presença de outras moléculas. Para o triptofano, são utilizados os comprimentos de onda de 280nm para excitação e 310-520nm emissão.

Figura 26A: Gráfico mostrando a padronização da técnica de fluorescência usando a albumina do soro bovina (BSA) como padrão, com concentrações crescentes de 1,8-ANS. Em 350nm ocorre o pico do triptofano e em 470nm o pico de emissão da 1,8-ANS. Em B, a curva da ligação da ANS com 5mM de BSA observando a emissão da ANS com 280nm de excitação.



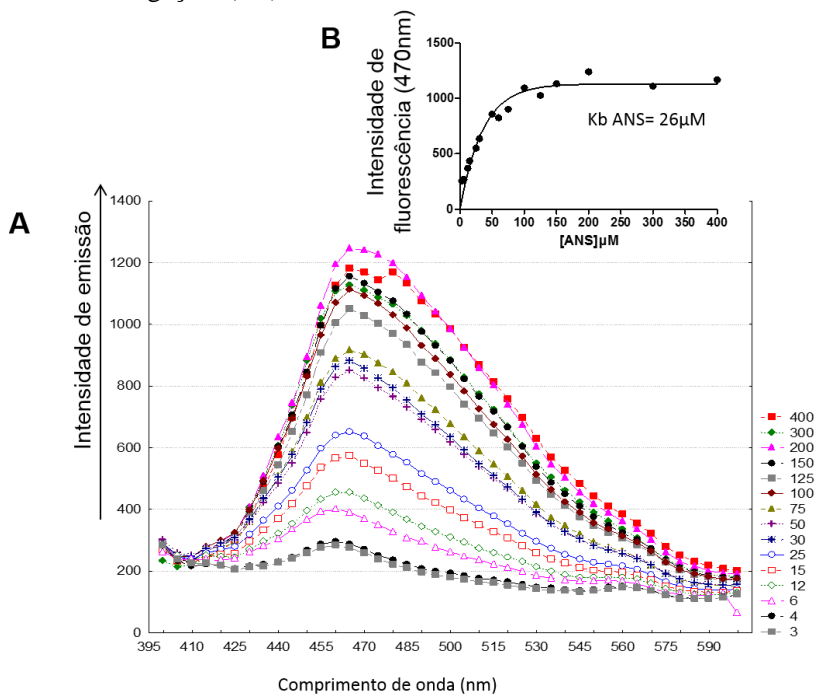
Após a padronização com BSA, foi testada a emissão de fluorescência do triptofano da CgFABP2 (Figura 27). Além do triptofano, foram feitos testes com a sonda fluorescente 1,8-ANS, que emite fluorescência quando está ligada à proteína, com excitação em 350nm e emissão 400-520nm.

Figura 27: Emissão de fluorescência do triptofano da FABP (em azul) com pico em 330nm, e da sonda 1,8-ANS em diferentes concentrações (em μM) com pico nos 470nm de comprimento de onda.



Nos testes de fluorescência era esperado um aumento na emissão de fluorescência conforme forem adicionadas maiores concentrações da sonda. Porém, como pode ser visto na figura 28, existe um claro padrão em concentrações menores da sonda, que é perdido em concentrações mais altas.

Figura 28: Gráfico mostrando a fluorescência emitida pela ligação da 1,8-ANS com a FABP. É possível perceber um padrão de ligação principalmente em concentrações menores, indicando saturação nas concentrações maiores (pico de excitação em 350nm, emissão em 400-520nm). Em B, vemos o gráfico que mostra a curva de saturação (valores retirados do pico de 470nm de intensidade), para calcular a constante de ligação (K_b).



A competitividade pelo sítio de ligação da FABP entre a 1,8-ANS e palmitato e o ibuprofeno pode ser visto pelas curvas de fluorescência. Quando a sonda é deslocada do sítio de ligação pelo palmitato ou ibuprofeno a fluorescência diminui. Logo, o padrão esperado era de que quanto maior a concentração de palmitato ou ibuprofeno no meio, menor a emissão de fluorescência. Entretanto, como pode ser observado na figura 29, ocorreu uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de palmitato e a emissão de fluorescência. O mesmo padrão pode ser observado no experimento com o ibuprofeno na figura 30.

Figura 29: Gráfico mostrando a variação da fluorescência emitida pela ligação da 1,8-ANS com a FABP em relação à diferentes concentrações de palmitato.

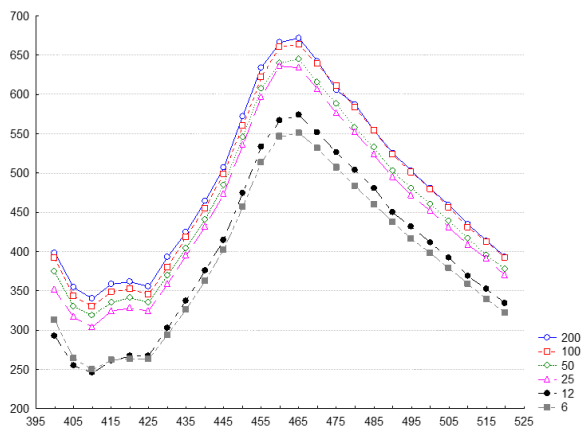
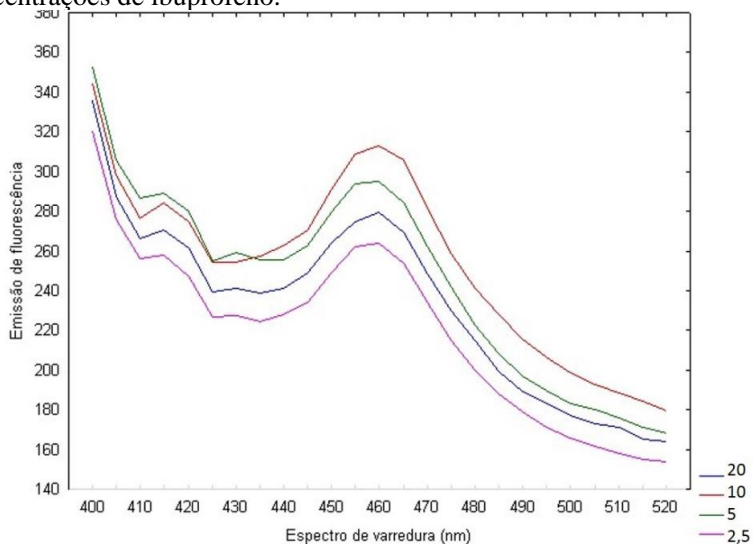


Figura 30: Gráfico mostrando a variação da fluorescência emitida pela ligação da 1,8-ANS com a FABP em relação à diferentes concentrações de ibuprofeno.



5 DISCUSSÃO

A família de proteínas FABP apresenta alta variação de sequências entre espécies diferentes e mesmo entre isoformas de uma mesma espécie (ESTEVEES e EHRILICH, 2006; TOLEDO-SILVA *et al*, 2017).

Classicamente, as diferentes isoformas da proteína têm sido associadas à uma especialização funcional. Hoje em dia se sabe que as funções das FABPs são ao mesmo tempo especializadas e sobrepostas, como ligação com ácidos graxos de cadeias longas e outras moléculas hidrofóbicas, interações proteína-proteína e proteína-membrana, sinalização nuclear e oxidação de ácidos graxos (STORCH, 2009).

Em mamíferos, foram classificadas 9 isoformas de FABP tecido-específicas no fígado (FABP1), intestino (FABP2), coração (FABP3), adipócitos e monócitos (FABP4), epiderme (FABP5), íleo (FABP6), cérebro (FABP7), mielina (FABP8) e testículo (FABP9) (FLORESTA, 2017). As isoformas de FABPs juntamente com outras proteínas que formam o grupo das iLBPs são classificadas em 4 subfamílias dependendo da interação com ligantes. A subfamília I inclui as proteínas que ligam ácidos retinóicos (CRBP and CRABP), a subfamília II inclui as isoformas de FABPs 1 e 6, que ligam ácidos graxos e outros ligantes maiores como colesterol ou bile. Além disso, a FABP do fígado é capaz de manter dois ligantes simultaneamente. Na subfamília III está apenas a FABP2, que liga ácidos graxos em uma posição diferente e por fim, a subfamília IV engloba todas as isoformas de FABPs restantes que ligam ácidos graxos, retinóides e eicosanóides (HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015; FLORESTA, 2017).

Essa classificação é baseada nas iLBPs de vertebrados, mais especificamente de mamíferos, pois não há classificação em subfamílias para as iLBPs de invertebrados e muitas espécies de invertebrados ainda não tem o genoma sequenciado. Além disso, a distinta história evolutiva entre o grupo das iLBPs de vertebrados e invertebrados gera dificuldades para uma classificação conjunta, e a atual classificação poderia sofrer algumas alterações com a adição das FABPs de invertebrados (ESTEVEES e EHRILICH, 2006; TOLEDO-SILVA *et al*, 2017).

Para o alinhamento da estrutura primária de CgFABP com as iLBPs dos vertebrados, foi selecionada a FABP2 ou intestinal das espécies de vertebrados *Xenopus laevis*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*, pois foi a isoforma que apresentou maior identidade de sequência no alinhamento BLASTp. Segundo Toledo-Silva *et al* (2017), a FABP de *C. gigas* nomeada pelo autor de CgiLBP4, referindo-se à CgFABP2,

utilizada nesse estudo, tem como isoforma humana mais próxima filogeneticamente a FABP2 ou intestinal. Sendo a única representante da subfamília III, a FABP2 liga-se ao palmitato em uma conformação linear, diferentemente das outras isoformas de vertebrados, onde o palmitato liga em uma forma de U.

O resultado do alinhamento da CgFABP2, mostrou uma conservação muito maior entre as espécies de vertebrados com uma identidade de sequência de 73.86% em comparação à conservação 28.72% de identidade de sequência entre os invertebrados.

Essa diferença maior entre invertebrados pode ser explicada pelo fato de que, em geral, as iLPBs de invertebrados têm mais similaridades e são agrupadas com a FABP3 na subfamília IV de vertebrados, incluindo as FABPs dos nematódeos, como a espécie *Caenorhabditis elegans* (ESTEVES e EHRILICH, 2006). Entretanto, segundo Toledo-Silva et al (2017) a CgiLPBP4 e outras isoformas de *C. gigas* são homólogas a FABP2 de vertebrados.

Enquanto a FABP2 de vertebrado e a CgFABP2 apresentam uma homologia evolutiva, a similaridade da FABP3 com outras isoformas de invertebrados parece ser resultado de uma convergência evolutiva, considerando que a subfamília IV é encontrada geralmente em vertebrados mais derivados evolutivamente e que o surgimento de várias iLPBs por duplicação de genes aconteceu após a separação evolutiva desses dois grupos (TOLEDO-SILVA et al 2017).

A família de proteínas FABP possui em geral uma estrutura terciária altamente conservada entre as espécies de vertebrados e invertebrados, mesmo entre isoformas com baixa homologia nas sequências. A relação entre a forma e a função parece ser a chave da manutenção evolutiva da estrutura de beta barril com a ‘tampa’ de alfa-hélice. Essa conservação da estrutura terciária da proteína tem sido apresentada e discutida por muitos autores, através de técnicas de cristalografia de raio-X e ressonância magnética em estudos com FABPs humanas e de outros vertebrados (STORCH, 2009).

Em vertebrados as isoformas têm sido amplamente estudadas, com resultados sugerindo que isoformas tecido-específicas tem relação com uma especialização na interação com outras proteínas e com a membrana, além de diferentes afinidades com os ligantes. Entre as funções propostas para as FABPs estão a assimilação dos lipídios ingeridos na alimentação, distribuição dos ácidos graxos para vias catabólicas e anabólicas, regulação da acumulação de lipídios e manutenção dos fosfolipídios de membrana em tecidos neurais (SMITH et al, 2008; HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015). Segundo Storch e

Storch (2010), a regulação desses processos está relacionado com a expressão de diferentes FABPs nos tecidos, com isoformas capazes de diferentes interações proteína-proteína e proteína-membrana. Essas interações podem ser em grande parte definidas pelas duas alfa-hélices e a região do portal.

A FABP intestinal de rato que serviu de molde para criação do modelo da FABP2 possui 35% de similaridade de sequências, porém apresenta uma estrutura muito semelhante com o modelo criado, com *TM-score* de 0.988.

O modelo gerado para *C. gigas* possui o formato clássico das FABPs com dez folhas- β antiparalelas e duas α -hélices formando a estrutura de β -barril. Os quatro domínios principais são bem conservados na estrutura terciária de CgFAPB2, embora apresentem variações na sequência de aminoácidos. Quando analisamos nossos dados de dicroísmo circular, observamos que a estrutura da CgFAPB2 apresenta uma mistura de alfa-hélices e folhas-beta, o que é compatível com o enovelamento esperado para FABP (Figura 23) (CLÉRICO e ERMÁCORA, 2001). Nossos dados indicam que o modelo gerado 3D é compatível com os dados experimentais obtidos com a proteína recombinante purificada.

A variação das sequências de FABP4 e FABP2 de vertebrados com a FABP2 de *C. gigas* nos quatro domínios pode ter correlação com as afinidades de ligação e por isso são discutidas aqui.

Enquanto a isoforma intestinal ou FABP2 apresenta a maior similaridade com a FABP de *C. gigas* (TOLEDO-SILVA et al, 2017), a isoforma FABP4 é a mais bem estudada e com informações disponíveis para comparação (SMITH et al, 2008; GONZÁLEZ e FISHER, 2014; FLORESTA, 2017), sendo portanto, as isoformas principais aqui discutidas.

O *charge quartet* é formado por quatro resíduos das α -hélices e é responsável pela interação proteína-proteína e proteína-membrana. Apesar da importância das α -hélices para a interação proteína-proteína ser conhecida, (STORCH e THUMSER, 2000; HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015) faltam informações sobre quais proteínas interagem com as isoformas de FABPs. A lipase hormônio-sensível (HSL) e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR), estão entre as proteínas mais bem estudadas em relação à interação com FABPs.

Na FABP4, a região do *charge quartet* é formada pelos resíduos Asp17, Asp18, Lys21 e Arg30 (GONZÁLEZ e FISHER, 2015; HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015). Segundo Smith et al (2008), essa composição de resíduos está envolvida na capacidade de interação

com a HSL, sendo bem conservada na FABP4 e outras isoformas humanas, exceto FABP1 e FABP2. Essas duas isoformas não interagem com HSL, mas são capazes de modular a ativação dos receptores PPAR α .

Essa mudança na capacidade de interação com diferentes proteínas parece estar relacionada à mudança nesses resíduos das α -hélices, portanto a conservação encontrada entre a FABP2 humana e a FABP *C. gigas* sugere que também possa existir interação entre o PPAR α e a FABP em *C. gigas*, necessitando de mais estudos de interação para testar a hipótese.

Além disso, outra importante função dessa região das α -hélices para a FABP2, parece estar relacionada à interação proteína-membrana para transporte de lipídios, através de um mecanismo de transferência colisional com a membrana (CÓRSICO *et al*, 2005; ESTEVES e EHRILICH, 2006; HE *et al*, 2007). Thumser *et al* (2000) demonstrou que a FABP2 pode extrair ácidos graxos da membrana, aumentando o fluxo de lipídios no interior celular através de uma transferência intermembrana. Em uma versão mutante da FABP2, sem as α -hélices a estrutura em barril permanece, mas a forma de interação com a membrana muda da forma colisional para um mecanismo de difusão de transferência de ácidos graxos.

A chamada região do portal engloba outra função importante das α -hélices (resíduos 19-41 em *C. gigas*), juntamente com as alças entre as folhas β 3- β 4 (resíduos 59-64) e β 5- β 6 (resíduos 79-83), é a mudança de conformação para entrada e saída do ligante. É uma região altamente conservada nas espécies de vertebrados estudadas, como visto na figura 8 do alinhamento, porém mostrou pouco padrão de conservação nas espécies de invertebrados.

Na região da ponte salina, os resíduos polares da proteína formam as pontes de hidrogênio com o grupo carboxila dos ácidos graxos e com a cabeça polar do ibuprofeno. Dos 4 domínios da FABP citados aqui, é a região com maior conservação entre as seis espécies estudadas, o que pode indicar que é uma região fundamental para interação com ligantes. Como mostra o alinhamento da figura 6, os resíduos polares Arg112, Glu113, Asp117, Gln121, Thr122, Gly127, Lys131, Lys135 e Lys136 estão conservados nos vertebrados e em *C. gigas*. Destes aminoácidos, a Arg112 parece desempenhar a função de ligação de ponte de hidrogênio com a região polar do palmitato e do ibuprofeno, tanto em *C. gigas* quanto na FABP2 de rato, na figuras 11, 12, 14 e 15 respectivamente, sendo que em rato, o resíduo é citado como Arg106, porém ocupa a mesma posição da Arg112 de *C. gigas* no alinhamento de sequências.

Uma diferença importante entre a FABP2 de *C. gigas* e de *R. norvegicus* na formação de ponte de hidrogênio com palmitato e ibuprofeno é o resíduo Trp82. O Trp82 é conservado nas três espécies de vertebrados analisadas, inclusive em *R. norvegicus*, formando, juntamente com a Arg106, as pontes de hidrogênio com a cabeça polar do palmitato e o oxigênio do ibuprofeno. Em *C. gigas*, o resíduo Trp82 é substituído por um resíduo de leucina e apenas uma ponte de hidrogênio é identificada no atracamento molecular. Apesar disso, não foram encontradas variações significativas no ΔG das ligações com palmitato e ibuprofeno em as FABPs de *C. gigas* e *R. norvegicus*.

A região das alças no portal permitem a flexibilidade e mudança de conformação, com a rotação da região das hélices para entrada do ligante e na FABP4 é formada pelos resíduos Glu14, Asn15 and Phe16 (HOTAMISLIGIL e BERNLOHR, 2015). González e Fisher (2014) estudaram a ligação entre FABP4 e ibuprofeno, destacando a importância da interação entre o anel aromático da Phe16 com o anel do ibuprofeno, chamada de *edge-to-face* (ou empilhamento □ em português). Segundo os autores, mesmo fracas interações aromáticas podem afetar significativamente a conformação de um ligante num ambiente hidrofóbico. Enquanto os aminoácidos Glu14 e Asn15 são conservados nas seis espécies estudadas (Figura 7), a Phe16 é substituída por um resíduo de tirosina, que também é um aminoácido aromático, nas isoformas intestinais dos vertebrados.

Edge-to-face são interações não-covalentes entre anéis aromáticos, importantes para formação de agregados e estabilização de complexos intermoleculares. Os aminoácidos Phe, Trp e Tyr são frequentemente envolvidos nessas interações entre as cadeias laterais aromáticas nas proteínas. Enquanto na FABP4 a Phe16, na região das alças, é peça chave para a interação *edge-to-face* (GONZÁLEZ e FISHER, 2014), na FABP2 de rato, os dados do atracamento molecular sugerem que essa função parece ser ocupada pela Tyr70 (Figuras 14 e 15).

Segundo os resultados do atracamento molecular, não há interação *edge-to-face* com o anel do ibuprofeno em *C. gigas*. Ao invés disso, ocorrem interações hidrofóbicas mais fracas do tipo *van der Waals* entre os resíduos Ile110 e Ala123 e o ibuprofeno. Esse resultado está de acordo com o alinhamento obtido, pois em *C. gigas*, os resíduos Phe16 e Tyr70 não são conservados, sendo substituídos por resíduos de valina, um aminoácido apolar sem anel aromático.

A falta de interações *edge-to-face* em *C. gigas* pode indicar uma dificuldade maior na ligação com o ibuprofeno em relação a FABP4 descrita por González e Fisher (2014), pois segundo os autores, essa

interação seria determinante para a conformação do ligante na cavidade hidrofóbica.

Em *C. gigas* os mesmos resíduos são aminoácidos-chave para a ligação com o palmitato e com o ibuprofeno, a Arg112 para a formação de ponte de hidrogênio e a Ile110 e Ala123 nas interações apolares, o que indica que eles competem diretamente pelo mesmo sítio de ligação. O ΔG e energia total resultantes do *docking* com o ibuprofeno obtiveram valores próximos dos alcançados pelo palmitato, ligante natural, sugerindo que a ligação com o ibuprofeno é favorável, mesmo sem o Trip82 e a Phe16.

Os resultados obtidos *in silico* são suportados pelos experimentos iniciais *in vitro*. Primeiramente, a proteína foi devidamente expressa e purificada seguindo a metodologia já utilizados para outras FABPs, como a FABP1 humana, clonada e purificada por Yang *et al* (2010). O resultado do dicróismo circular com a proteína apo mostrou a conformação esperada para a proteína com presença majoritariamente de folhas- β (GREENFIELD, 2006), com uma diferença significativa nas curvas da proteína em estado natural e desnaturada pela alta temperatura. A proteína devidamente purificada e enovelada além de ser utilizada nos testes de interação discutidos aqui, poderá ser utilizada para novos testes que ajudem a elucidar a função e especialização das FABPs em *C. gigas* em futuros experimentos de contaminação aquática.

Enquanto os ligantes palmitato e ibuprofeno parecem competir pelo mesmo sítio de ligação, a 1,8-ANS parece se ligar a FABP2 de *C. gigas* e a de *R. novergicus* apenas fora da cavidade de ligação. No *docking* não foi encontrado nenhuma ligação entre a sonda e a CgFABP2 ou RnFABP2 com a sonda dentro da cavidade. Este dado corrobora com os encontrados nos experimentos de fluorescência, onde não foi encontrado o padrão esperado de deslocamento da sonda pelo aumento na concentração dos ligantes palmitato e ibuprofeno. A 1,8-ANS já foi utilizada para testes de interação por fluorescência com outras FABPs com resultados positivos, como o experimento realizado por González e Fisher (2014) em que a 1,8-ANS foi utilizada para medir a afinidade de ligação da FABP4 humana com vários ligantes, entre eles o ibuprofeno. Lee *et al* (2015) também utilizou a 1,8-ANS para medir a interação entre a FABP3 humana e o fármaco ceterolaco.

A curva esperada para o experimento de fluorescência era uma relação inversa entre a quantidade de ligante (palmitato e ibuprofeno) adicionado à amostra e a emissão de fluorescência pela 1,8-ANS. A falta desse padrão pode ser explicada pela não-competição pelo sítio de ligação entre a sonda e palmitato e ibuprofeno. Estudos posteriores são

importantes para entender melhor a possível diferença na ligação da 1,8-ANS com a FABP2 e com a FABP4, além de testar a interação de outras sondas com FABP2, como a 11-(Dansylamino) undecanoic acid (DAUDA).

Seguindo os resultados dos experimentos de interação da FABP, utilizando a técnica de difração circular, tanto a presença do palmitato quanto do ibuprofeno, mesmo em baixas concentrações, alteram a estrutura da proteína, o que indica que a FABP consegue se ligar às duas moléculas. Em altas concentrações dos ligantes, principalmente do palmitato, a proteína parece se desnaturar. Entretanto, as curvas de porcentagem de variação em escala logarítmica mostraram que a FABP é cerca de 10 vezes mais sensível à presença de palmitato, em relação ao ibuprofeno. Esse dado corrobora com os dados do *docking*, pois apesar dos valores de ΔG do ibuprofeno serem próximos aos valores do palmitato, o ligante natural apresenta valores mais negativos, indicando uma afinidade de ligação maior.

Essa capacidade de ligação do ibuprofeno com uma afinidade menor, sugere que, mesmo a FABP de *C. gigas* sendo capaz de se ligar ao fármaco, é necessário uma alta concentração do mesmo para gerar uma competição pelo sítio de ligação com o palmitato que cause um deslocamento na capacidade de ligação da proteína com o ligante natural, na hipótese formulada de que a superexpressão de FABP se dê pela ligação da proteína com xenobióticos além dos ligantes naturais. Experimentos complementares precisam ser feitos para elucidar o aumento da necessidade energética de *C. gigas* na presença de xenobióticos e, conseqüentemente o aumento da oxidação de ácidos graxos e superexpressão de proteínas envolvidas nessa via metabólica.

Os resultados de validação *in vitro* aqui apresentados e discutidos são derivados dos experimentos iniciais desenvolvidos no laboratório de interação *in vitro* entre CgFABP2 e fármacos. Com a proteína devidamente caracterizada e purificada, novos dados *in vitro* são esperados para uma completa elucidação da função da FABP em ostras expostas aos contaminantes. Segundo Toledo-Silva *et al* (2017) outras três isoformas de FABP são expressas maioritariamente nas brânquias em *C. gigas*. Considerando que as brânquias estão em contato com o ambiente exterior, é importante elucidar as funções das outras isoformas de FABP encontradas em *C. gigas* e sua relação com a presença de xenobióticos.

6 CONCLUSÃO

Apesar da variação na sequência de aminoácidos, a FABP de *C. gigas* tem uma estrutura terciária altamente conservada, com 10 folhas beta-pregueadas e duas alfa-hélices, sendo assim uma proteína funcional de *C. gigas* caracterizada nesse trabalho.

Os resultados obtidos nesse trabalho pelo atracamento molecular e o dicroísmo circular corroboram com a hipótese de que a FABP de *C. gigas* é capaz de se ligar ao ibuprofeno. Entretanto, é necessário uma alta quantidade do contaminante para deslocar a ligação e acoplamento da FABP com o palmitato, pois, segundo os dados obtidos pelo CD, a estrutura da FABP2 de *C. gigas* é afetada pelo palmitato em concentrações 10 vezes menores que o necessário para o ibuprofeno.

Os resultados obtidos *in silico* mostraram que é possível usar metodologias computacionais para analisar primariamente estruturas biológicas, sendo uma metodologia importante para filtrar as análises que serão realizadas *in vitro*, economizando tempo e dinheiro.

A proteína purificada permite testes *in vitro* de cinética enzimática, além da possibilidade de testar outros ligantes ou inibidores. O protocolo utilizado para clonagem e purificação *in vitro* pode ser utilizado para replicar a produção *in vitro* da FABP2 de *C. gigas*, além das outras isoforma da proteína.

Ter a FABP2 clonada e purificada *in vitro* será importante para novos testes de interação. Para continuação deste trabalho recomenda-se a utilização da sonda DAUDA para os experimentos de fluorescência, utilizando concentrações crescentes dos ligantes para observar se ocorre o deslocamento da sonda e a diminuição da emissão de fluorescência. Podem ser testados outros ligantes naturais como ácido oleico e novos xenobióticos, como paracetamol e ceterolaco.

Para os experimentos de CD, são necessários experimentos com ligantes em menores concentrações, para entender melhor a afinidade de ligação e a concentração mínima para afetar a estrutura da FABP.

Além disso, outras isoformas de FABP em *C. gigas* já foram identificadas pelo nosso grupo de pesquisa. Três dessas isoformas são expressas majoritariamente nas brânquias, que estão em contato com o ambiente exterior, e consequentemente, com os contaminantes, é importante caracterizar as outras isoformas de FABP de *C. gigas* para elucidar as funções dessas isoformas e sua relação com a presença de xenobióticos.

7 REFERÊNCIAS

AMOOZADEH, E. *et al.* Marine organisms as heavy metal bioindicators in the Persian Gulf and the Gulf of Oman. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.2386-2395, 18 jun. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-1890-8>.

BEEBY, Alan. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 112, n. 2, p.285-298, abr. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491\(00\)00038-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491(00)00038-5).

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MEIO AMBIENTE: EFEITOS E CONSEQÜÊNCIAS. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p.651-666, 01 jul. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/26.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2018

BRASIL. Regulamenta o artigo 10 do Código da Pesca, baixado com o Decreto-Lei N° 794, de 19 de outubro de 1938, que dispõe sobre o lançamento de resíduos tóxicos ou oleosos nas águas litorâneas ou interiores do País e dá outras providências. Brasília (DF). Decreto n° 50.887, de 26 de junho de 1961.

BRUSCA, R.C. & G.J. BRUSCA, 2007. **Invertebrados**. Segunda edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 968 pp.

CAI, Jun *et al.* Solution Structure and Backbone Dynamics of Human Liver Fatty Acid Binding Protein: Fatty Acid Binding Revisited. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 102, n. 11, p.2585-2594, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.039>.

CLÉRICO, Eugenia M.; ERMÁCORA, Mario R.. Tryptophan Mutants of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein: Ultraviolet Absorption and Circular Dichroism Studies. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 395, n. 2, p.215-224, nov. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2001.2554>.

CLEUVERS, Michael. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs

diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 59, n. 3, p.309-315, nov. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0147-6513\(03\)00141-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0147-6513(03)00141-6).

ESTEVEES, Adriana; EHRLICH, Ricardo. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 142, n. 3-4, p.262-274, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.006>.

FAVRETTO, Filippo *et al.* Bile salt recognition by human liver fatty acid binding protein. **Febs Journal**, [s.l.], v. 282, n. 7, p.1271-1288, 18 fev. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13218>.

FLORES-NUNES, Fabrício *et al.* Changes in protein expression of pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed in situ to urban sewage. **Environmental Science And Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 22, p.17267-17279, 16 nov. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3821-8>.

FURUHASHI, Masato; HOTAMISLIGIL, Gökhan S.. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.489-503, jun. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2589>.

FREIRE, Marina Moreira *et al.* . Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 12, p.347-354, 25 jun. 2008.

FROEHNER, Sandro; MARTINS, Raquel Fernandes. Avaliação da composição química de sedimentos do Rio Barigüi na região metropolitana de Curitiba. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 8, p.2020-2026, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000800020>.

GAGNÉ, F. *et al.* Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels — lack of effects from anti-inflammatory drugs. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 141, n. 4, p.332-337, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2005.06.006>.

GONZÁLEZ, Javier M.; FISHER, S. Zoë. Structural analysis of

ibuprofen binding to human adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4). **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.163-170, 28 jan. 2015. International Union of Crystallography (IUCr). <http://dx.doi.org/10.1107/s2053230x14027897>

GONZALEZ-REY, Maria; BEBIANNO, Maria João. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.361-371, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.017>.

GHISELLI, Gislaïne; JARDIM, Wilson F.. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.695-706, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000300032>.

GREENFIELD, Norma J. Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 6, p.2891-2899, jan. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.244>.

HAO, Jiaqing *et al.* Circulating Adipose Fatty Acid Binding Protein Is a New Link Underlying Obesity-Associated Breast/Mammary Tumor Development. **Cell Metabolism**, [s.l.], p.327-345, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.006>.

HAUNERL, Norbert H.; CHISHOLM, Joan M.. Fatty acid binding protein in flight muscle of the locust, *Schistocerca gregaria*. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Lipids And Lipid Metabolism**, [s.l.], v. 1047, n. 3, p.233-238, dez. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(90\)90521-x](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(90)90521-x).

HE, Yan *et al.* Solution-State Molecular Structure of Apo and Oleate-Liganded Liver Fatty Acid-Binding Protein†. **Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 44, p.12543-12556, nov. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi701092r>.

HERBERT, Roger J. H. *et al.* Ecological impacts of non-native Pacific

oysters (*Crassostrea gigas*) and management measures for protected areas in Europe. **Biodiversity And Conservation**, [s.l.], v. 25, n. 14, p.2835-2865, 1 out. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-016-1209-4>.

HERTZEL, Ann V. *et al.* Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Fatty Acid Binding Proteins. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 19, p.6024-6031, 8 out. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm900720m>.

HUGHES, Maria L. R. *et al.* Fatty Acid-binding Proteins 1 and 2 Differentially Modulate the Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α in a Ligand-selective Manner. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 290, n. 22, p.13895-13906, 6 abr. 2015. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m114.605998>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2010. Mapa de densidade demográfica. Disponível em:
<
<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=10&uf=00>
> Acesso em 01/09/2018.

Instituto Trata Brasil. 2017. Ranking do saneamento instituto Trata Brasil. Disponível em
<<http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/estudos/ranking/2017/relatorio-completo.pdf>> Acesso em 10/10/2018.

JAKOBSSON, Emma *et al.* The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1649, n. 1, p.40-50, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1570-9639\(03\)00151-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1570-9639(03)00151-1).

LAM, Paul K.s; GRAY, John S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.182-186, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x\(02\)00449-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x(02)00449-6).

LAU, Eva *et al.* The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier

dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. **Nutrition & Metabolism**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-7, 30 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-016-0089-7>.

LEE, Gordon S. *et al.* Fatty Acid Binding Proteins Expressed at the Human Blood–Brain Barrier Bind Drugs in an Isoform-Specific Manner. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 32, n. 10, p.3432-3446, 7 ago. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-015-1764-5>.

LEHNINGER, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Princípios de bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

OTRUBOVA, Katerina; CRAVATT, Benjamin F.; BOGER, Dale L.. Design, Synthesis, and Characterization of α -Ketoheterocycles That Additionally Target the Cytosolic Port Cys269 of Fatty Acid Amide Hydrolase. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.1079-1089, 23 jan. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm401820q>.

MADDEN, Judith C. *et al.* Pharmaceuticals in the environment: Good practice in predicting acute ecotoxicological effects. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 185, n. 2, p.85-101, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.12.005>.

MAKOWSKI, Liza *et al.* The Fatty Acid-binding Protein, aP2, Coordinates Macrophage Cholesterol Trafficking and Inflammatory Activity. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 280, n. 13, p.12888-12895, 31 jan. 2005. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m413788200>.

MANIKKAM, Mohan *et al.* Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-8, 24 jan. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055387>.

MARENGONI, Nilton Garcia *et al.* Estado trófico e bioacumulação do fósforo total no cultivo de peixes em tanques-rede na área aquícola do reservatório de Itaipu. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.237-243, 9 out. 2008. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v30i3.519>.

MEDEIROS, Igor D. *et al.* Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.362-365, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2008.05.004>.

MEDEIROS, Igor Dias *et al.* Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.156-157, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.048>.

MODA, Tiago L.; MONTANARI, Carlos A.; ANDRICOPULO, Adriano D.. Hologram QSAR model for the prediction of human oral bioavailability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 24, p.7738-7745, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.060>.

MONIRITH, In *et al.* Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.281-300, mar. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x\(02\)00400-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x(02)00400-9).

NACHEV, Milen; SURES, Bernd. Environmental parasitology: Parasites as accumulation bioindicators in the marine environment. **Journal Of Sea Research**, [s.l.], v. 113, p.45-50, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2015.06.005>.

ORITO, Wataru; OHHIRA, Fuyuko; OGASAWARA, Michio. Gene expression profiles of FABP genes in protochordates, *Ciona intestinalis* and *Branchiostoma belcheri*. **Cell And Tissue Research**, [s.l.], v. 362, n. 2, p.331-345, 10 maio 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-015-2198-4>.

PAROLINI, Marco; PEDRIALI, Alessandra; BINELLI, Andrea. Application of a Biomarker Response Index for Ranking the Toxicity of Five Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) to the Bivalve

Dreissena polymorpha. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.439-447, 7 dez. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-012-9847-3>.

PAVLICA, Mirjana *et al.* Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 490, n. 2, p.209-214, fev. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718\(00\)00162-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718(00)00162-5).

PHILLIPS, David J.h.; SEGAR, Douglas A.. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: Programme design imperatives. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.10-17, jan. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x\(86\)90797-6](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x(86)90797-6).

RAND, Gary M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2. ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. 1125 p.

REMAILI, Timothy M. *et al.* The impact of sediment bioturbation by secondary organisms on metal bioavailability, bioaccumulation and toxicity to target organisms in benthic bioassays: Implications for sediment quality assessment. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 208, p.590-599, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.033>.

SANTOS, Lúcia H.m.l.m. *et al.* Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 175, n. 1-3, p.45-95, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>.

SARKAR, A. *et al.* Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.333-340, maio 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-006-0069-1>.

HAO, Jiaqing *et al.* Circulating Adipose Fatty Acid Binding Protein Is a New Link Underlying Obesity-Associated Breast/Mammary Tumor Development. **Cell Metabolism**, [s.l.], p.327-345, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.006>.

SILVA, Guilherme de Toledo e. **Análise da expressão gênica diferencial em ostras-do-pacífico *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico in situ**. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/93348>>. Acesso em: 15 set. 2018.

Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). 2015. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/component/content/article?id=140>> Acesso em 10/10/2018.

SMITH, Anne J. *et al.* Mapping of the Hormone-sensitive Lipase Binding Site on the Adipocyte Fatty Acid-binding Protein (AFABP). **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 283, n. 48, p.33536-33543, 27 set. 2008. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m806732200>.

TAN, Maria Carmen *et al.* Interaction kinetics of liposome-incorporated unsaturated fatty acids with fatty acid-binding protein 3 by surface plasmon resonance. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.1804-1808, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.02.001>.

THUMSER, Alfred; STORCH, Judith. Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. **Journal of lipid research**, v.41, n.4, p. 647-656, 2000.

TOLEDO-SILVA, Guilherme de *et al.* Intracellular lipid binding protein family diversity from Oyster *Crassostrea gigas*: genomic and structural features of invertebrate lipid transporters. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.23-36, 21 abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep46486>.

UNICEF. 2015. Progress on Sanitation and Drinking-Water. Disponível em: <https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2015/12/Progress-on-Sanitation-and-Drinking-Water_234.pdf> Acesso em 10/10/2018.

UNITED STATES OF AMERICA. Thomas M Crisp. Environmental Protection Agency. **Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis:** (EPA/630/R-96/012). Washington, Dc: Environmental Protection Agency, 1997. 111 p. Disponível em:

<[YANG, Hai-bo; LIU, Jing; WANG, Lian-zhe. Expression, purification and identification of liver fatty acid binding protein \[J\]. **Chongqing Medicine**, vol.18, n.3, 2010.](https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30004ZD3.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C95thru99%5CTxt%5C00000006%5C30004ZD3.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>. Acesso em: 06 ago. 2018.</p>
</div>
<div data-bbox=)

ZAMARREÑO, Fernando *et al.* Conserved charged amino acids are key determinants for fatty acid binding proteins (FABPs)-membrane interactions. A multi-methodological computational approach. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.861-877, 16 mar. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2017.1301271>.

ZHANG, Guofan *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, [s.l.], v. 490, n. 7418, p.49-54, 19 set. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11413>.

ZHANG, Lianying; REN, Xiao-min; GUO, Liang-hong. Structure-Based Investigation on the Interaction of Perfluorinated Compounds with Human Liver Fatty Acid Binding Protein. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 47, n. 19, p.11293-11301, 20 set. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es4026722>.

ZHAO, X *et al.* Assessment of PCBs and PCDD/Fs Along the Chinese Bohai Sea Coastline Using Mollusks as Bioindicators. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.178-185, 6 jul. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-004-0130-0>.

ZHENG, Yadong; BLAIR, David; BRADLEY, Janette E.. Phyletic Distribution of Fatty Acid-Binding Protein Genes. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.7763-7766, 14 out. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077636>.

ZHENG, Yadong. Fatty Acid-Binding Proteins at a Glance. **Protein & Peptide Letters**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.572-577, abr. 2014. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986652106140425124628>.

