

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Fernando Freitas Siqueira Silva

Estudo farmacofórico sobre isomanídeos peptidomiméticos inibidores das
calicreínas teciduais humanas 5 e 7

Uberaba – MG

2013

FERNANDO FREITAS SIQUEIRA SILVA

Estudo farmacofórico sobre isomanídeos peptidomiméticos inibidores das
calicreínas teciduais humanas 5 e 7

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

Uberaba – MG

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução e divulgação total ou parcial são permitidas exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

S58e Silva, Fernando Freitas Siqueira
Estudo farmacofórico sobre isomanídeos peptidomiméticos inibidores das caliceínas teciduais humanas 5 e 7 / Fernando Freitas Siqueira Silva. -- 2014. 95 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2014.
Orientador: Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

1. Caliceínas. 2. Inibidores de serino proteinase. 3. Enzimas. 4. Química farmacêutica. 5. Modelagem. I. Abrahão Júnior, Odonório. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 577.152.34

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus e à vida me presenteada, na qual o amor ao conhecimento e à Ciência se manteve vigorante para a conquista que aqui se finda.

Agradeço aos meus pais, Reinaldo e Celice pelo alicerce físico e emocional contra cada empecilho iminente em meu caminho. À minha mãe, em especial, uma das principais forças-motriz, motivação inexaurível de mais esta etapa.

A minha irmã, Carolina, pela compreensão nas situações conflitantes e inevitáveis, concedendo-me seu espaço frente as minhas necessidades; agradeço o seu carinho, apoio e bondade de todas as horas.

As minhas avós, Celina e Iracema, tios, tias, primos e primas pelas palavras e ações de incentivo, fortalecendo a cada gesto, meu empenho em continuar.

Agradeço ao professor Dr. Valdo José Dias da Silva, cuja exímia dedicação ao seu trabalho permitiu a fundação e vigência deste programa de pós-graduação do qual me despeço. Por meio deste, também agradeço à bolsa de auxílio financeiro a mim concedida pela Capes.

Aos professores, mestres e doutores, e pesquisadores Cláudio Simon, Roseli Gomes, Lívia Teodoro, Milton Sonoda, Renato Freitas, Adriana Camargo, Alexandre Rogério, e todos os demais e que me ensinaram, sobretudo a importância da transparência e do rigor imprescindíveis para um trabalho científico de relevância. Ao professor Dr. Luciano Puzer também por me tornar bem-vindo à sua linha de pesquisa, da qual faz parte meu objeto de estudo.

Aos funcionários e colegas dos laboratórios da disciplina de Bioquímica – Flávio, Geraldo, Marco Túlio, Joyce Lacerda, Leonardo Almeida, Simone, Roosevelt –, do Laboratório de Química Computacional Medicinal – Evandro, Leonardo Baesse, Thiago, Wender – e da disciplina de Fisiologia – Elisabete Ambrosio, Liciane e Lidiane – pela presteza em ajudar, por proporcionar um agradável ambiente de trabalho e pelos conhecimentos mutuamente transmitidos.

Em especial, agradeço à Luísa Nangi, pela amizade, auxílio e companheirismo incondicionais durante esses quase sete anos juntos de vida acadêmica; estendo este a todos os meus amigos, que também proporcionaram momentos de ânimo para prosseguir nessa jornada, sob qualquer instância.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Odonório Abrahão Júnior, primeiramente, e mais uma vez, pela paciência e oportunidade de permitir reafirmar sua confiança em meus esforços, iniciada na graduação, e então pelo trabalho de orientação, que caminhou lado a lado de sua visão científica arrojada e a frente de convenções. Permito-me ainda lhe fazer um agradecimento especial, estendido à professora Dra. Roseli Gomes, aos seus colegas de formação médica e a toda a equipe de profissionais, família e amigos, de importância imensurável durante uma etapa conturbada em relação à minha saúde. A todos eles minha sincera gratidão.

Agradeço por fim a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram, torceram ou demonstraram admiração pelo desenvolvimento deste trabalho, que se aqui se conclui com o empenho e responsabilidade de todos os envolvidos.

“É certo que devemos dar suporte e agir de acordo com nossos princípios, mas não é certo apoiá-los em uma cega obstinação, ou mantê-los quando se provam estar errados.”

(Michael Faraday)

RESUMO

As quinze calicreínas teciduais humanas (KLKs) são endopeptidases, cujos genes pertencem ao maior *cluster* ininterrupto de enzimas do genoma, e nomeadas de 1 a 15 de acordo com sua ordem de descoberta. Apesar do domínio catalítico comum (serino-protease), as calicreínas possuem relativamente pouca relação filogenética com a calicreína plasmática e compartilham a conservada tríade de resíduos catalíticos da família a qual pertencem, His57, Asp102 e Ser195. Mas é segundo a natureza do resíduo 189 (representante do subsítio S1 do sítio ativo), que suas atividades (preferências por diferentes substratos) são classificadas em quimotripsina-símile ou tripsina-símile. As KLKs humanas podem ser subdivididas em vários grupos tecido-específicos, os quais cumprem inúmeras tarefas ao longo da vida. Distúrbios concomitantes à regulação alterada de suas atividades variam de acordo com local onde seus genes são expressos. As KLKs 5 e 7 apresentam atividade trípica e quimotríptica respectivamente. São normalmente encontradas em vários tecidos, porém ambas são especificamente abundantes nas camadas granular e espinhosa da epiderme, onde degradam as proteínas do corneodesmosomos, levando à descamação. Além de desempenhar papéis em distúrbios da pele como dermatite atópica, psoríase e síndrome de Netherton, podem digerir vários componentes da matriz extracelular, contribuindo para a disseminação metastática de células tumorais em vários tipos de cânceres, como o carcinoma ovariano epitelial e pancreático. As KLKs são muitas vezes mantidas inibidas por uma variedade de inibidores endógenos, que, em equilíbrio fino com a atividade enzimática são essenciais para a homeostase tecidual. Várias estratégias vêm sendo aplicadas visando o projeto de inibidores de serino-proteases. Isomanídeos são compostos originados da desidratação do D-manitol, que apresentam uma estrutura bicíclica característica. Em nosso trabalho, foi feito um estudo farmacofórico computacional com compostos derivados de isomanídeos, divididos em duas séries: amidas e ésteres. Em vista de resultados experimentais prévios, sabia-se que o mecanismo de inibição desses compostos varia de reversível competitiva a reversível não competitiva. A busca através do servidor CASTp, apontou os prováveis exossítios de interação para a KLK5 e KLK7, os quais, juntamente com os sítios ativos, serviram de bolsões receptores dos compostos separadamente, pelo método de docking molecular. As posições gerais dos inibidores nas docagens não foram significativamente próximas daquelas nos testes cinéticos, o que já era esperado. A análise da variação das conformações segundo os ângulos de torção também não pode contribuir para uma padronização das afinidades dos isomanídeos, devido à sua liberdade conformacional. Porém, observou-se que o inibidor não-competitivo AM04 apresentou score relativamente alto em um dos exossítios encontrados, mais provável de influenciar conformacionalmente a disposição dos resíduos do sítio ativo da KLK5. O outro composto não-competitivo, AM05, apresentou menor score para o exossítio de maior identidade com o sítio ativo e score alto para os demais. Este achado principalmente corrobora com provável presença de um ou vários sítios com significativa atividade alostérica na superfície da enzima, o que, com maiores estudos, pode ser estendido à KLK7 e demais calicreínas. Além disso, os cálculos DFT, da estrutura eletrônica dos inibidores, mostraram que, na KLK5, o HOMO da AM04 e LUMO da AM05 estão correlacionados às suas interações com os sítios alostéricos. A abordagem de outros métodos de predição, como dinâmica molecular, possibilitariam maiores detalhes sobre a influência desses ligantes no comprometimento ou não da abertura e capacidade de acomodação de outros compostos nos sítios ativos, essencialmente da KLK5. O desenvolvimento de inibidores para KLK5 e KLK7 pode ainda ajudar a elucidar os papéis fisiopatológicos das calicreínas e no projeto de novos inibidores.

Palavras-chave: calicreína, isomanídeo, *docking* molecular, DFT, farmacóforo.

ABSTRACT

The fifteen human tissue kallikrein (KLKs) are endopeptidases, whose genes belong to the largest uninterrupted cluster of enzymes in genome, and named 1-15 according to their order of discovery. Despite the common catalytic domain (serine protease), they have relatively little phylogenetic relationship with plasma kallikrein. They share the conserved catalytic triad residues of the family to which they belong, His57, Asp102 and Ser195. However, their activities (preference for different substrates) are classified according to the nature of the residue 189 (representative of the S1 subsite of the active site), as chymotrypsin-like or trypsin-like. Human KLKs can be subdivided into various tissue-specific groups, which fulfill numerous tasks throughout life. Disorders that occur due altered regulation of kallikreins activities vary according to where their genes are expressed. KLK5 and 7 present tryptic and quimotryptic activities, respectively. Both are usually found in many tissues, but they are specifically abundant in spinous and granular layers of the epidermis, where they degrade the proteins of corneodesmosomos, leading to desquamation. In addition to playing role in skin disorders such as atopic dermatitis, psoriasis and Netherton's syndrome, the two enzymes are able to digest multiple components of the extracellular matrix, leading to metastatic spread of tumor cells in various types of cancers such as epithelial ovarian carcinoma and pancreatic adenocarcinoma. KLKs are often maintained inhibited by a variety of endogenous inhibitors, which are in fine equilibrium with the enzymatic activity, essential for tissue homeostasis. Several strategies have been applied in order to design inhibitors to serine proteases. Isomannides are compounds derived from D-mannitol dehydration, which possess a characteristic bicyclic structure. In our work, a computational pharmacophoric study was done with compounds derived from isomannide, divided into two series: amides and esters. In view of previous experimental results, it was known that the mechanism of inhibition of those compounds range from reversible competitive to reversible non-competitive. The search through CASTp online server pointed probable exosites for interaction in KLK5 and KLK7. Such exosites, in addition to the active sites, were used as receptor pockets for the compounds separately by molecular docking method. General positions of the docking inhibitors were not significantly close to those in the kinetic assays. That result was expected. Conformational analysis of torsion angles didn't contribute to standardization of isomannides affinities to receptors, mainly due the large conformational freedom of those compounds. In other hand, it was observed that the non-competitive inhibitor, AM04 showed relatively high score in one exosite, topographically more likely to influence conformation disposition of the active site residues of KLK5. The other non-competitive compound, AM05, showed lower score for the exosite of greater identity with the active site, and score high for the others allosteric pockets. That result corroborates with probable presence of one or several allosteric sites with significant activity on the enzyme surface, which can be extended to other kallikreins and KLK7 through further studies. Additionally, electronic structure DFT calculations of inhibitors showed that, in KLK5, the HOMO of AM04 and LUMO of AM05 are favorably correlated to their interactions with allosteric sites. Other prediction methods approach, such as molecular dynamics, would give details about the influence of those ligands involvement in accommodation of other compounds in the active sites, primarily in KLK5. The development of inhibitors for KLK5 and KLK7 may also help elucidate the pathophysiological roles of kallikrein and the designing of new drugs.

Key-words: kallikrein, isomannide, molecular docking, DFT, pharmacophore.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| Ala | Alanina |
| Alo5a | Exossítio 5a da KLK5 |
| Alo5b | Exossítio 5b da KLK5 |
| Alo5c | Exossítio 5c da KLK5 |
| Alo5d | Exossítio 5d da KLK5 |
| Alo5e | Exossítio 5e da KLK5 |
| Alo7a | Exossítio 7a da KLK7 |
| Alo7b | Exossítio 7b da KLK7 |
| Alo7c | Exossítio 7c da KLK7 |
| Alo7d | Exossítio 7d da KLK7 |
| Alo7e | Exossítio 7e da KLK7 |
| AMxx | Derivado isomanídeo (série amidas) |
| Arg | Arginina |
| Asn | Asparagina |
| Asp | Ácido aspártico |
| CASTp | Computed Atlas of Surface proteins |
| CMK | Clorometil cetona |
| Cys | Cisteína |
| DFT | Teoria do Funcional de Densidade |
| FSU | Florida State University |
| ESxx | Derivado isomanídeo (série ésteres) |
| Glide | Grid-based ligand docking with energetic |
| Gln | Glutamina |
| Glu | Ácido glutâmico |
| GluNAC | 2-acetamido-2-desoxi-b-D-glicopiranosose |

| | |
|------------------|---|
| Gly | Glicina |
| His | Histidina |
| HOMO | Orbital molecular ocupado de mais alta energia |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória de 50% da atividade |
| IEFPCM | Modelo Contínuo Polarizável no formalismo da equação integral |
| Ile | Isoleucina |
| K7J | Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-clorometilcetona |
| K _i | Constante de dissociação enzimática |
| KLK | Calicreína |
| Leu | Leucina |
| LUMO | Orbital molecular desocupado de mais baixa energia |
| Lys | Lisina |
| Met | Metionina |
| OPLS | <i>Optimized Potentials for Liquid Simulations</i> |
| P1, P2, P3, P4 | Resíduos do substrato em interação com S1, S2, S3 e S4, respectivamente |
| Phe | Fenilalanina |
| Pro | Prolina |
| RMSD | Raiz quadrada do desvio quadrático médio |
| S1, S2, S3, S4 | Subsítios 1, 2, 3 e 4, respectivamente, dos sítios ativos |
| Ser | Serina |
| Thr | Treonina |
| Trp | Triptofano |
| Tyr | Tirosina |
| UFABC | Universidade Federal do ABC |
| Val | Valina |
| XP | <i>Extra Precision Mode</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 INTRODUÇÃO ÀS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS..... | 13 |
| 1.1.1 Classificação das enzimas proteolíticas..... | 13 |
| 1.1.2 Especificidade enzimática..... | 13 |
| 1.2 AS CALICREÍNAS TECIDUAIS HUMANAS..... | 14 |
| 1.2.1 As calicreínas teciduais humanas..... | 14 |
| 1.2.1.1 Descoberta e organização gênica..... | 14 |
| 1.2.1.2 Relações filogenéticas entre as calicreínas teciduais e a calicreína plasmática..... | 15 |
| 1.2.1.3 Expressão, processamento bioquímico e especificidade..... | 16 |
| 1.2.1.4 Estrutura molecular..... | 17 |
| 1.2.1.5 Papel fisiopatológico..... | 17 |
| 1.2.2 As calicreínas teciduais humanas 5 e 7..... | 19 |
| 1.2.2.1 Aspectos físico-químicos e estrutura tridimensional..... | 20 |
| 1.2.2.2 Aspectos fisiopatológicos..... | 22 |
| 1.3 INIBIDORES DAS CALICREÍNAS TECIDUAIS HUMANAS..... | 24 |
| 1.3.1 Compostos derivados de isomanídeos como peptidomiméticos..... | 25 |
| 1.3.1.1 Amidas e ésteres derivados de isomanídeos..... | 26 |
| 1.4 MODELO FARMACOFÓRICO E <i>DOCKING</i> MOLECULAR NO ESTUDO DE FÁRMACOS..... | 30 |
| 1.4.1 Conceito e aplicação do modelo farmacofórico..... | 31 |
| 1.4.2 Fundamentação teórica do <i>docking</i> molecular..... | 31 |
| 1.4.3 Glide – <i>Grid-based ligand docking with energetics</i>..... | 32 |
| 1.4.3.1 Glide XP e o contribuinte lipofílico..... | 36 |
| 1.4.3.2 Glide XP e os termos de penalidade..... | 36 |
| 1.4.4 Princípios da mecânica quântica..... | 37 |
| 1.4.4.1 Cálculos baseados na Teoria do Funcional de Densidade..... | 38 |
| 2 OBJETIVOS | 40 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 40 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 40 |

| | |
|--|----|
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 <i>DOCKING</i> MOLECULAR..... | 41 |
| 3.2 ESTUDO QUÂNTICO – DFT..... | 43 |
| | |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS EXOSSÍTIOS NAS SUPERFÍCIES DA KLK5 E KLK7..... | 44 |
| 4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS INIBIDORES POR AFINIDADE SEGUNDO O <i>DOCKING</i> MOLECULAR..... | 47 |
| 4.3 CONFORMAÇÃO, INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS E LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO DAS POSES DE MELHOR ESCORE..... | 57 |
| 4.3.1 Conformação | 57 |
| 4.3.2 Ligações de hidrogênio | 66 |
| 4.3.2.1 Sítios ativos..... | 66 |
| 4.3.2.2 Sítios alostéricos..... | 68 |
| 4.3.3 Interações hidrofóbicas | 70 |
| 4.3.4 Interações intermoleculares, <i>docking</i> score e mecanismos inibitórios relacionados | 74 |
| 4.3.4.1 Gly193 e Ser195..... | 74 |
| 4.3.4.2 His57 e Asp102..... | 75 |
| 4.3.4.3 Gln192, Asn192 e Gly216..... | 77 |
| 4.3.4.4 Subsítios de interação..... | 78 |
| 4.3.4 Orbitais moleculares de fronteira | 81 |
| | |
| 5 CONCLUSÃO | 88 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 90 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO ÀS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

1.1.1 Classificação das enzimas proteolíticas

Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas específicas, cujos reagentes são genericamente denominados substratos. Ao estabilizar o estado de transição do substrato, elas diminuem a energia de ativação levando ao aumento da velocidade da reação. Tal estabilização é feita por resíduos de aminoácidos de natureza química complementar ao substrato, presentes na cavidade da enzima onde ocorre a reação. Sem a catálise, tais reações não ocorreriam a taxas significativas e compatíveis com a vida (Nelson & Cox, 2008).

As enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases ou peptidases, catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em outras proteínas e polipeptídeos. Baseando-se nos estudos de Hartley (1960), elas são classificadas nos tipos catalíticos serino-, aspártico-, metalo-, cisteíno-, glutâmico-, asparagino- e treonino-proteases, de acordo com o resíduo de aminoácido efetor do ataque químico ao substrato. Há ainda aquelas cujo mecanismo é misto ou desconhecido (revisado por Kinch & Grishin, 2013).

Outra classificação, por estrutura molecular e homologia, é detalhada na base de dados MEROPS, onde as peptidases são distribuídas em famílias, que são agrupadas em clãs, baseando-se em uma relação estatisticamente significativa da seqüência de seus aminoácidos (Rawlings & Barrett, 1993).

1.1.2 Especificidade enzimática

As enzimas também são classificadas quanto à especificidade por diferentes substratos (Rawlings & Barrett, 1993), que é ditada pelas propriedades de subsítios de ligação dispostos ao longo do sulco catalítico e cuja forma e polaridade explicam as preferências da enzima (Debela *et al.*, 2008). Cada subsítio é capaz de acomodar a cadeia lateral de um único resíduo do substrato peptídico. São numerados a partir do subsítio S1, no centro, continuando de S2 à Sn para o N-terminal do substrato, e S1', S2' a Sn' para o C-terminal. Os resíduos que eles acomodam são numerados P1, P2 a Pn, e P1', P2' a Pn', respectivamente (N – P3 – P2 – P1 – P1' – P2' – P3' – C) (Rawlings & Barrett, 1993). S1 contém o resíduo primariamente responsável pela especificidade enzimática (revisado por Teixeira *et al.*, 2011).

1.2 AS CALICREÍNAS TECIDUAIS HUMANAS

1.2.1 As calicreínas teciduais humanas

As calicreínas teciduais humanas até hoje descritas são proteases pertencentes à família S1A do clã PA(S) (Yousef *et al.*, 2000; Rawlings, Barrett & Bateman, 2010). Todos os membros caracterizados do clã são endopeptidases, cujo tipo catalítico é cisteíno- ou serino-peptidase. A família S1, cuja peptidase-tipo (referência) é a quimotripsina A, é a maior de todas as famílias de peptidase. O “S” no nome representa a inicial do tipo catalítico serino-protease (Rawlings & Barrett, 1993).

Existem três tipos de atividades principais das serino-proteases dentro da família: tripsina-símile (onde há clivagem de substratos contendo arginina ou lisina em P1), quimotripsina-símile (onde há clivagem de substratos contendo resíduos hidrofóbicos em P1) e elastase-símile (onde há clivagem de substratos contendo alanina em P1). Apenas as duas primeiras são observadas para calicreínas teciduais humanas (Rawlings & Barrett, 1993).

1.2.1.1 Descoberta e organização gênica

A primeira observação da atividade da calicreína tecidual clássica ou glandular (KLK1) foi feita por Abelous e Bardier, a qual era descrita como um vasodilatador periférico e hipotensivo em cães, encontrado na urina (revisado por Lawrence, Lai, & Clements, 2010). Nas décadas de 1920 e 1930, Frey, Kraut e Werle mostrou que tal fator era abundante no pâncreas (*kallikreas*, em grego), de onde veio seu nome (Frey, Kraut & Werle, 1932). O efeito hipotensivo da KLK1 é hoje atribuído à sua atividade de cininogenase: hidrólise do cininogênio de baixo peso molecular, liberando cininas vasoativas (Bhoola, Figueroa & Worthy, 1992).

No final da década de 80, as calicreínas KLK2 e KLK3 foram descritas como serino-peptidases prostáticas, sem relação evolucionária com a KLK1, mesmo estando os genes das três localizados em *cluster* na região cromossômica 19q13.3-4 (Riegman *et al.*, 1992). Com o rascunho da sequência do genoma humano, na década de 90, tornou-se claro que o *locus* (FIG. 1) contém pelo menos 15 genes, estruturalmente homólogos, responsáveis por codificar as KLK1-3 e as então recentemente identificadas KLK4-15 (Emami & Diamandis, 2008; Band *et al.*, 2006) nomeadas segundo a ordem cronológica de descoberta (Debela *et al.*, 2008).



FIGURA 1 – Representação esquemática do locus *KLK*, região cromossômica 19q13.4.
Fonte: Diamandis e Emami. 2008.

Os genes *KLK* (em itálico para gene) constituem o maior cluster ininterrupto de enzimas do genoma. Eles compartilham a organização éxon/ intron, as fases dos íntrons, sítios de início e parada transcricionais conservados e os códons da tríade catalítica (Emami & Diamandis, 2008). São compostos de 5 éxons codificantes, um ou dois (*KLK6* e *KLK14*) éxons 5' não codificantes e 4 íntrons (Yousef *et al.*, 2000).

1.2.1.2 Relações filogenéticas entre as calicreínas teciduais e a calicreína plasmática

Secretada pelo fígado na corrente sanguínea, a calicreína plasmática (*KLKB1*) também é uma serino protease da família S1 envolvida na coagulação sanguínea, fibrinólise e reações inflamatórias (revisado por Sainz, Pixley & Colman, 2007). Seu gene não pertence a uma família multigênica (Beaubien *et al.*, 1991). As calicreínas teciduais são pouco relacionadas à calicreína plasmática (Yousef *et al.*, 2000), que compartilha 38% de resíduos com a *KLK1* no domínio catalítico, enquanto que a *KLK1* e a tripsina apresentam 46% de identidade (Goettig *et al.*, 2010; Saxena *et al.*, 2011). As calicreínas teciduais maduras não possuem domínios, como o fator de crescimento símile e do tipo *kringle*, encontrados em serino-proteases da coagulação/ fibrinólise (Debela *et al.*, 2008).

Importante destacar que a atividade cininogénica foi inicialmente utilizada na definição das características das calicreínas, que compreendiam apenas a calicreína tissular ou glandular (*KLK1*) e a calicreína plasmática (Werle & Fiedler, 1969). Porém, deixando de ser comum àquelas posteriormente descritas, as *KLK2-15* foram agrupadas como serino-peptidases relacionadas à calicreína, com o objetivo de formalizar tal diferença (Band *et al.*, 2006).

A análise detalhada da porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos das calicreínas tissulares permitiu a construção de uma árvore filogenética com quatro ramos principais (FIG. 2). O primeiro contém as *KLK1-3*, o segundo, as *KLK4*, *KLK5* e *KLK7*, o terceiro, as *KLK10* e *KLK12* e o quarto, as *KLK9* e *KLK11*. As remanescentes *KLK6*, *KLK8*, *KLK13* e *KLK14* não são agrupadas em nenhum ramo (Harvey *et al.*, 2000).

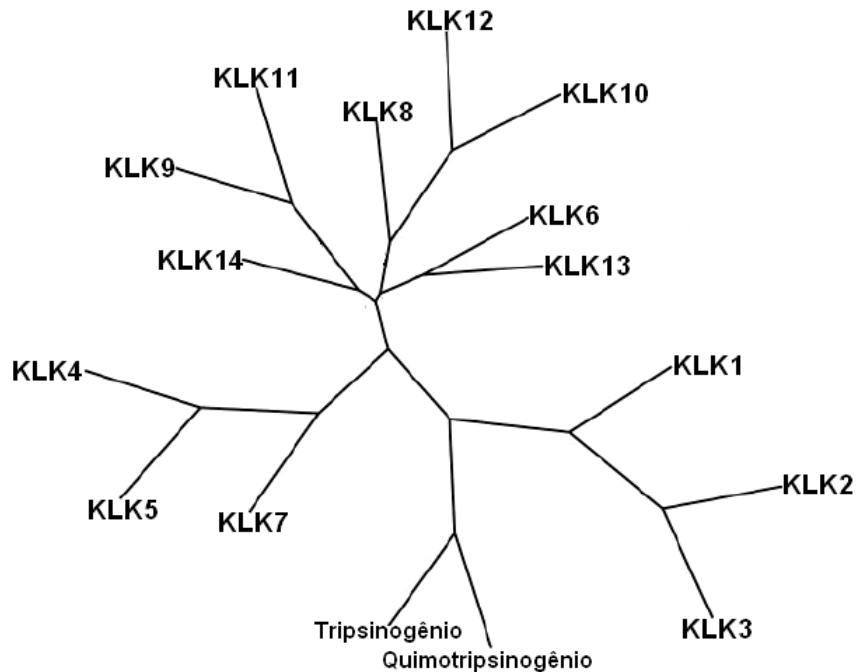


FIGURA 2: Árvore filogenética das caliceínas teciduais humanas. O gene da KLK15 não havia sido descoberto (Yousef & Diamandis, 2001). Presentes também o tripsinogênio e o quimotripsinogênio, formas inativas da tripsina e quimotripsina, respectivamente. Adaptado de Harvey *et al.*, 2000.

1.2.1.3 Expressão, processamento bioquímico e especificidade

A expressão das caliceínas é excepcionalmente responsiva a múltiplos hormônios, como andrógenos, progestinas, glicocorticóides, mineralocorticóides, estrógenos, entre outros (Lawrence, Lai, & Clements, 2010). São sintetizadas como precursores contendo um peptídeo sinal de 15 a 34 aminoácidos, que é clivado no retículo endoplasmático. A pró-forma ou zimogênio é extracelularmente ativada pela remoção de um pró-peptídeo N-terminal de 3 a 37 aminoácidos, resultando em proteases ativas com 223 a 238 resíduos e de até 50 kDa (incluindo a pesada glicosilação) (Goettig *et al.*, 2010).

Porém a atividade das KLKs não é restrita à regulação por expressão dependente de esteróide ou pela ativação do zimogênio em sintonia fina. O processo de ativação de KLKs pode envolver autoativação, cascatas de ativação, outras serino-proteases (como plasmina, caliceína plasmática e fator Xa), ou outras proteases, tais como o ativador de plasminogênio tipo uroquinase, metaloproteinases de matriz, e a dipeptidil peptidase I (Goettig *et al.*, 2010).

A ativação das caliceínas é provável de ser realizada por proteases com atividade do tipo tripsina, pois os sítios de clivagem contêm uma arginina ou lisina em P1. Os substratos naturais das KLKs foram extensivamente analisados, o que permitiu determinar a

especificidade das mesmas em símiles à tripsina (1, 2, 4, 5, 6, 8,10-15) e à quimotripsina (3, 7 e, presumivelmente, 9) (Goettig *et al.*, 2010). Por essa e outras evidências, KLK4 e 5 são considerados ativadores gerais das KLKs (Debela *et al.*, 2008).

1.2.1.4 Estrutura molecular

O enovelamento comum básico dos membros da família das calicreínas tem sido extensivamente modificado através da evolução para produzir novas proteases (Fernández *et al.*, 2008). As KLKs 1, 2 e 3 dispõem de um "99-loop" ("loop de calicreína") alargado com 11 resíduos a mais, inseridos com relação à quimotripsina. As KLKs 8 a 13 possuem inserções de dois a oito resíduos, e as demais não possuem inserções nesse loop (Goettig *et al.*, 2010).

Similarmente a outras serino-proteases trípticas e quimotrípticas, KLK1, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6 e KLK7, já obtidas cristalizadas, evidenciam dois conjuntos (domínios) de seis barris (motivos) β "contíguos" enlaçados por três segmentos transdomínio, duas α -hélices e vários loops superficialmente localizados (FIG. 3) (Debela *et al.*, 2007).

A tríade catalítica fica na junção dos barris e, de acordo com a numeração da estrutura primária do quimotripsinogênio (Debela, *et al.*, 2007), consiste em His57 e Asp102, ambos no barril N-terminal, e Ser195, no barril C-terminal (FIG. 3) (Emami & Diamandis, 2008). Os subsítios (de S1 à S4) também estão na interface entre os barris (Fernández *et al.*, 2008).

O resíduo S1 de todas as calicreínas é o que está na posição 189. Basicamente, pode-se afirmar que o resíduo ácido Asp189 confere às KLKs atividade semelhante à tripsina (exceto na KLK15, que contém um Glu189) e o resíduo Ser189 confere atividade semelhante à quimotripsina (exceto na KLK7 e KLK9, que contém uma Asn189 e Gly189 respectivamente) (Goettig *et al.*, 2010). Pode-se observar que as calicreínas teciduais quimotrípticas não possuem resíduo ácido no fundo de S1 (Fernández *et al.*, 2008). A substituição dos aminoácidos ao longo da relativamente extensa plataforma que constitui o sítio ativo é responsável por originar diversas topografias e superfícies eletrostáticas, que reconhecem conjuntos diversos de seqüências de substratos (Fernández *et al.*, 2008).

1.2.1.5 Papel fisiopatológico

As KLKs humanas podem ser subdivididas em vários grupos tecido-específicos, visto que um ou mais genes *KLK* são expressos em quase todos os tecidos e fluidos do corpo humano. Eles cumprem uma vasta gama de tarefas, ao longo da vida (Goettig *et al.*, 2010).

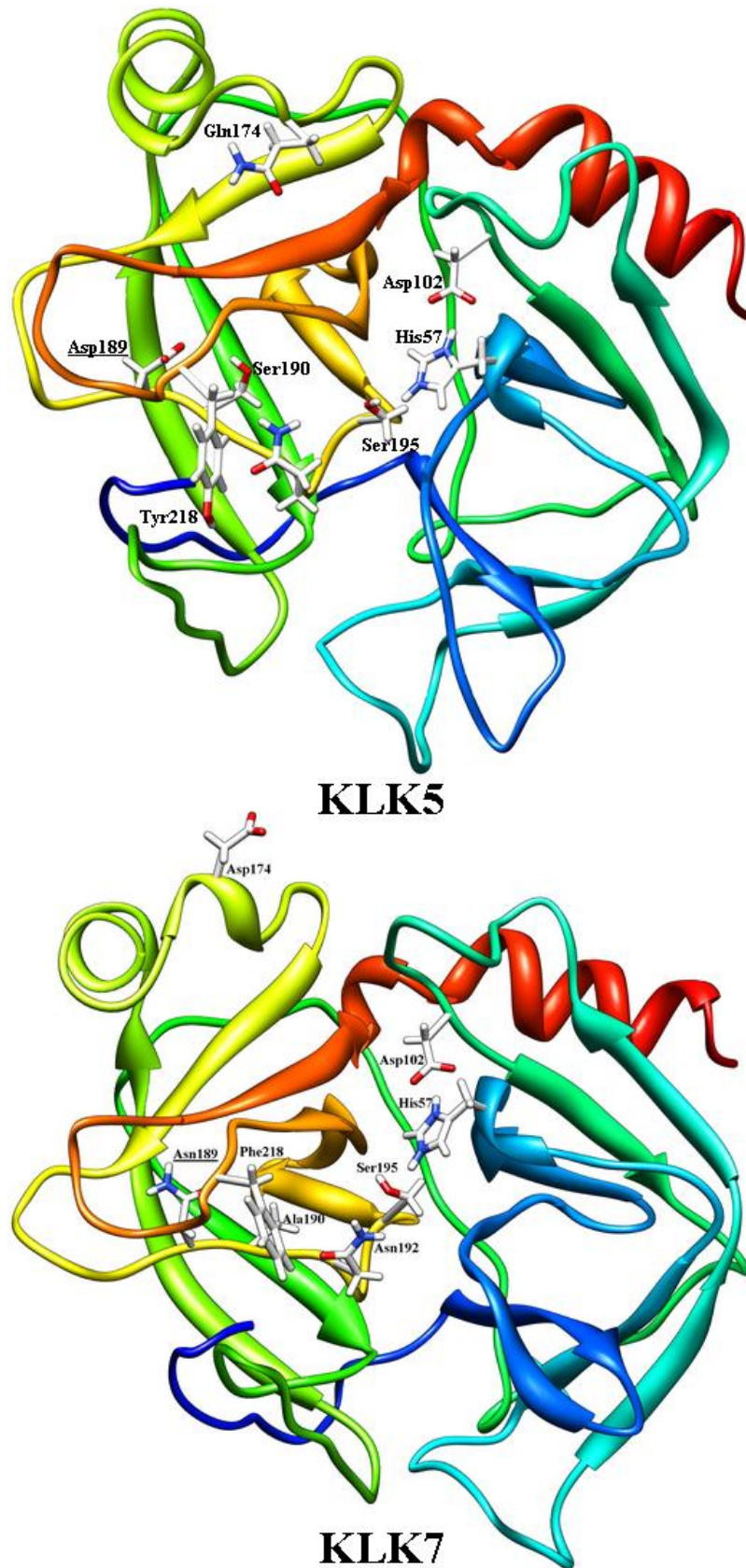


FIGURA 3 – Estruturas terciárias comparadas da KLK5 e KLK7. As cadeias laterais da tríade catalítica e dos principais resíduos de interesse que distinguem as enzimas estão explicitas. Os dois conjuntos de seis barris β “contíguos”, separados pela fenda catalítica, as duas α -hélices e os *loops* característicos também estão evidentes para cada estrutura.

Na próstata, KLKs 2, 3, 4, 11, 14 e 15, são produzidas para secreção no plasma seminal, onde provavelmente ativam uma a outra em forma de cascata, resultando na degradação das semenogelinas e fibronectina, principalmente por KLK3 e KLK14, importantes então para a liquefação do sêmen. A KLK4 é essencial para o desenvolvimento dos dentes e sua alteração está envolvida na doença hereditária amelogenese imperfeita (Talieri *et al.*, 2011; Kontos *et al.*, 2013). KLK6 e KLK8 são expressas em níveis superiores no cérebro humano. KLK6 relaciona-se à mielinização de células da glia e sua atividade exacerbada promove esclerose múltipla, enquanto que a KLK8, que ocorre principalmente no hipocampo, é envolvida na reestruturação de sinapses e sua superexpressão relaciona-se à doença de Alzheimer (Goettig *et al.*, 2010). A KLK12 pode estar envolvida na regulação da angiogênese (Patsis *et al.*, 2012) e a KLK13 na remodelação do tecido do ovário (Lose *et al.*, 2011). As funções das KLKs 9 e 10 ainda são pouco definidas, apesar de sua utilidade como marcadores de cânceres (White *et al.*, 2010; Debela *et al.*, 2008).

As KLKs são conhecidas por seu valor conjunto (pois individualmente têm baixa especificidade ou sensibilidade) de biomarcador em cânceres de próstata, de ovário, de mama, assim como em malignidades gastrintestinais, de cabeça e pescoço, pulmão e cérebro. Tem potencial de uso para triagem, diagnóstico, prognóstico, estadiamento, monitoramento da resposta farmacológica e estabelecimento de recorrência ou remissão da doença, e também como prováveis alvos terapêuticos (Emami & Diamandis, 2008).

1.2.2 As calicreínas teciduais humanas 5 e 7

A KLK5 e 7 são normalmente expressas em vários tecidos. A KLK5 se encontra majoritariamente na mama, sistema nervoso central, próstata, testículos e traquéia, enquanto a KLK7 predomina no esôfago, rim, fígado e glândula salivar. Porém ambas são especificamente abundantes nas camadas granular e espinhosa da epiderme, onde queratinócitos sofrem diferenciação terminal em corneócitos, formando o estrato córneo (Debela *et al.*, 2007).

O maior subconjunto de peptidases relacionadas à calicreína tecidual se encontra nessa camada e é constituído pelas KLKs 5, 7, 11 e 14 (Goettig *et al.*, 2010). As KLKs 6, 8, 10 e 13 também são encontradas, porém em níveis médios de expressão. A KLK5 realiza autoativação na altura do sítio de clivagem Ser-Ser-Ser-Arg-↓-Ile-Ile. KLK5 ativa também a KLK7 e KLK14, as quais, juntamente à KLK8 e KLK6, podem interagir em uma cascata proteolítica do estrato córneo da epiderme, auxiliando a descamação da pele e o sistema imune. KLKs 5, 7

e 14 são capazes de degradar as proteínas do corneodesmosomas, levando à descamação, isto é, a queda de células epiteliais queratinizadas (Goettig *et al.*, 2010; Debela *et al.*, 2008).

1.2.2.1 Aspectos físico-químicos e estrutura tridimensional

A molécula de KLK5 se assemelha a um elipsóide achatado nos pólos com diâmetros de 35 Å e 50 Å. De acordo com rms de C α equivalentes, a KLK5 é topologicamente mais similar à KLK4, 6 e, em menor grau à KLK7. Baseando-se na sua estrutura primária, a KLK5 é uma proteína altamente básica (31:14 aa básicos pra ácidos), cujo ponto isoelétrico é 9,2 (Debela, *et al.*, 2007). A fenda S1 é formada pelos resíduos Asp189, Ser190, Cys191, Gln192, Gly193, Asp194, Ser195, Val213, Ser214, Trp215, Gly216, Asp217, Tyr218, Pro219, Cys220, Gly226, Val227 e Tyr228. A presença da Tyr218 provê uma barreira hidrofóbica e a presença da Gly216 e Gly226 numa das bordas permite a acomodação de grandes cadeias laterais. O grupo carboxilato do Asp189, o O γ da Ser190 e o grupo carbonil do Asp217 contribuem para a formação de ligações de hidrogênio que estabilizam a carga do resíduo P1 para catálise (Teixeira *et al.*, 2011). O subsítio S2 é lateralmente confinado pelas cadeias laterais imidazólicas da His57 e His99 e delimitado acima pelo grupo OH fenólico da Tyr94 e ao fundo pelo Trp215 (Goettig *et al.*, 2010; Debela *et al.*, 2007). O tamanho relativamente pequeno e a ponta polar são consistentes com a preferência da KLK5 por pequenos e médios resíduos em P2 (Leu, Ser, Thr, Asn, Ala) (Debela *et al.*, 2007).

A molécula de KLK7 possui forma côncava elipsóide com diâmetros aproximados de 48Å e 35Å. Na KLK7, a cavidade S1 é funda e estreita, parcialmente carregada por resíduos positivos, e possui uma Ala190 ao invés da Ser190 e no fundo, que o tornam mais hidrofóbico em relação às trípticas KLK4, 5 e 6 (Teixeira *et al.*, 2011). Distingue-se das demais KLKs pelos resíduos Phe218, Asn192 e especialmente Asn189, que formam, junto ao altamente conservado Trp215, a entrada do subsítio (Fernández *et al.*, 2008). Assim como na KLK5, grupo α -amônio da Ile16 forma uma ponte salina com Asp194, o que confere estabilidade adicional à fenda do oxianion (formado pelos grupos amina do esqueleto carbônico da Ser195 e Gly193), mantendo o bolso S1 na conformação propícia para estabilização dos estados de transição do substrato. A cavidade S2 da KLK7 é estreita, formada pela cadeia lateral dos resíduos His57, His99, Ser214 e Trp215 (Debela *et al.*, 2007).

O subsítio S3 de serino-proteases (quimo)tripsina-símile interage amplamente, via esqueleto carbônico do resíduo P3 e da Gly216 (Debela *et al.*, 2007). KLK4, 5, 6 e 7 mostraram baixa especificidade em P3 e uma tendência hidrofóbica em P4 (Debela *et al.*,

2008). O subsítio S4 da KLK5 é uma cavidade rasa, com a cadeia lateral do Trp215 formando a base e as cadeias polares da His99 e Gln174 (substituído por Asp174 na KLK7) formando os lados (Teixeira *et al.*, 2011). Os subsítios S1', S2' e posteriores não foram caracterizados sistematicamente para as calicreínas (Debela *et al.*, 2008).

KLK4, 5 e 7 mostraram grandes superfícies carregadas, que provavelmente servem como exossítios para substratos fisiológicos polianiônicos. Tanto na KLK5 quanto na KLK7, esses exossítios são similares e carregados positivamente, se estendendo para a hélice C-terminal (Debela *et al.*, 2008). A maioria dos resíduos básicos da KLK5 estão agrupados, mas não compensados eletricamente por resíduos negativamente carregados, originando um grande trecho positivamente carregado de sua superfície (Debela *et al.*, 2007).

TABELA 1 – Padrões estatísticos de especificidade dos sítios de clivagem da KLK5 e KLK7 para as posições de P4 a P4' em substratos peptídicos.

| | P4 | P3 | P2 | P1 | P1' | P2' | P3' | P4' |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| KLK5 | G/P | G | P | R | I | I | G/P/S | G |
| KLK7 | G | G/A/K/R | F | F | L | R | S/K | K |

Fonte: Goettig *et al.*, 2010.

A frequência está de acordo com as matrizes de especificidade do banco de dados MEROPS, baseado em 73 ensaios de clivagem com a KLK5 e 16 com a KLK7.

Contrastando estudos anteriores, segundo Debela e colaboradores (2008), o resíduo P1 preferido pela KLK7 é a Tyr, seguido pela Ala e Met, enquanto que Phe, Arg e Lys são muito pouco preferíveis. Interessantemente, Tyr é favorita em S2 em detrimento dos resíduos hidrófobos de tamanho médio, como Leu, Thr, Met e Phe.

A predileção por Tyr invés de Phe pode ser explicada pelo potencial da carboxamida da Asn189 de formar ligação de H com a OH fenólica, mediada por uma água e também pelo relativo estreitamento de S1.

O subsítio S2 é menos separado do S4 em relação as KLK4, 5 e 6 e menos limitado em tamanho, próprio para uma posição diferente da cadeia lateral imidazólica da His99, o que pode também contribuir para a capacidade de adaptação de cadeias laterais de P2 de vários tamanhos (Debela *et al.*, 2007). Todavia, S2 exhibe alguma especificidade por resíduos polares de tamanho médio e hidrofóbicos (Debela *et al.*, 2008). Tem se demonstrado que ao substituir a Ser190 por Ala190 a preferência P1 em proteinases tripsina-símile muda de Arg para Lys (Debela *et al.*, 2007).

Baseado no cálculo das superfícies potenciais, os principais loops característicos da estrutura prototípica das calicreínas KLK4, KLK5, KLK6 e KLK7 puderam ser superpostos usando os mesmos parâmetros para permitir comparação (Fernández *et al.*, 2008). A presença de uma cis-Pro219 (deletada na tripsina, trombina e triptases humanas), Pro225, que evita a ligação de sódio ao loop 222, e o número de seis pontes dissulfídicas são características comuns notáveis das calicreínas teciduais humanas (Debela *et al.*, 2008).

TABELA 2 – Características comparativas gerais das KLK5 e 7.

| Características | KLK5 | KLK7 |
|------------------------------------|-------------------|-------------------------|
| Comprimento (aa)* | 293 | 253 |
| Sítios de N-glicosilação | 4 | 1 |
| Comprimento do peptídeo sinal (aa) | 30 | 22 |
| Comprimento do pró-peptídeo (aa) | 37 | 7 |
| Sítio de clivagem de ativação | SSSR-IING | QGDK-IIDG |
| Loop-37 | + 1 resíduo | - |
| Loop-70-80 | + 1 resíduo | - 2 resíduos |
| Bolsão S1 | Menor, mais polar | Maior, mais hidrofóbico |

*Aminoácidos (aa)

Fonte: Debela, *et al.*, 2008.

1.2.2.2 Aspectos fisiopatológicos

Não se sabe ao certo se a KLK5 é capaz de degradar a desmocolina 1 e desmogleína 1 – caderinas adesivas da parte extracelular dos corneodesmosomos – diretamente ou por ativação de outras proteases. Mas sabe-se que o segundo mecanismo é mais o provável na sua ação de clivagem da corneodesmosina, glicoproteína também presente nos desmosomos. A KLK7 tem ação direta de clivagem sobre a corneodesmosina e a desmocolina 1. A persistência da não-clivagem da corneodesmosina e desmogleína 1 é uma característica da hiperqueratose. Proteólise reduzida da corneodesmosina também é observada na xerose. A ação combinada das calicreínas 5 e 7 pode degradar moléculas essenciais para a coesão dos corneócitos (Caubet *et al.*, 2004).

A KLK7 também degrada enzimas do processamento lipídico, como a β -glicosidase e a esfingomielinase ácida, que produzem lipídeos do tipo ceramida depositados no estrato córneo (Debela *et al.*, 2008).

Devido à KLK5 ser capaz de ativar pró-KLK7 e outras pró-KLKs, seu papel na descamação pode ser essencial e ambas podem desempenhar papéis em desordens da pele como dermatite atópica, psoríase e síndrome de Netherton (ligada a mutações no inibidor de serino-protease linfoepitelial tipo Kazal 5, que se localiza junto a ambas na pele e mostrou inibir cada uma) (Debela, *et al.*, 2007; Caubet *et al.*, 2004). Também podem contribuir para a disseminação metastática com a dissolução de outros complexos juncionais em células tumorais (Avgeris *et al.*, 2011; Michael *et al.*, 2005).

Além disso, KLK5 e 7 exibem vários efeitos proinflamatórios, incluindo ativação de citocinas (como a interleucina-1 β), atração de leucócitos, e a indução da ativação de cascatas proinflamatórias, tais como as do sistema cinina-caliceína e complemento (Termini *et al.*, 2010).

As KLKs 2, 4, 5, 6 e 14 são capazes de ativar de receptores acoplados a protease G, tais como PARs 1, 2 e 4, resultando em inflamação ou em proliferação e migração de células tumorais (Goettig *et al.*, 2010). A KLK5 induz eventos de sinalização celular via PAR-2, presente na membrana de queratinócitos, entre vários outros tipos celulares (Briot *et al.*, 2009). KLK5 também é capaz de ativar a pró-KLK2, 3 e 12 (Debela *et al.*, 2008).

As KLK5 e 7 têm mostrado ser capaz de digerir vários componentes e proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina (Ramani & Haun, 2008). Há crescente evidência de que a superexpressão da KLK5 ocorre em malignidades endócrino-relacionadas incluindo cânceres de ovário, testículo e mama (Avgeris *et al.*, 2011; Korbakis *et al.*, 2009). A clivagem das proteínas ligadoras do fator de crescimento insulina-símile pela KLK5 resulta em regulação alterada da sobrevivência e proliferação celular no câncer de próstata (Stack, *et al.* 2010, Michael *et al.*, 2006). A KLK7 também se relaciona ao crescimento tumoral e metástase, como no câncer de mama, adenocarcinoma cervical (Emami & Diamandis, 2008), glioblastoma, mas especialmente no carcinoma ovariano epitelial e pancreático (por clivar a caderina E, diminuindo a adesão das células do pâncreas) (Johnson *et al.*, 2007).

Ambas as caliceínas, KLK5 e 7, assim como KLK8 e 10, estão superexpressas no carcinoma oral de células escamosas. A superexpressão das KLKs 5, 7 e 10 também tem sido relatada em tumores da glândula salivar, cérvix e útero (Teixeira *et al.*, 2011). KLK5 e 10 apresentam níveis transcricionais elevados no carcinoma pulmonar de células escamosas (Diamandis & Emami, 2008).

Interessantemente, a expressão da KLK7 é vista diminuída no adenocarcinoma pulmonar, assim como a KLK5, 10, 13 e 14, no câncer testicular (Diamandis *et al.*, 2003).

1.3 INIBIDORES DAS CALICREÍNAS TECIDUAIS HUMANAS

O tempo de atividade das proteases começa com o controle da expressão do gene, transcrição, tradução e continua com o destino e ativação do zimogênio. Uma vez ativadas, as KLK são muitas vezes mantidas inibidas por uma grande variedade de inibidores endógenos com significância fisiológica e fisiopatológica (Goettig *et al.*, 2010).

Muitos desses inibidores estão presentes nos espaços extracelulares do estrato córneo. Os níveis dessas moléculas endógenas em equilíbrio fino com a ativação de serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartato-proteases, catepsinas, entre outras enzimas, é essencial para a homeostase epitelial (Goettig *et al.*, 2010).

Notavelmente, os organismos superiores utilizam exclusivamente íons ou polipeptídeos como atenuadores ou inibidores da atividade proteolítica. Sabe-se que a KLK5 pode ser inibida por α 2-antiplasmina (que também inibe moderadamente a KLK7), antitrombina III, α 2-macroglobulina, domínio tipo I do inibidor ativador do fator de crescimento do hepatócito, Zn^{+2} e outros cátions divalentes endógenos que regulam a atividade de várias proteases (Debela *et al.*, 2007). O Zn^{+2} é mineral essencial na dieta para a função de 70 – 80 enzimas e está presente em cerca de 300 dessas, no total. Também atua como atenuador reversível das KLKs 2, 3, 4, 7, 8, 12 e 14, em pequena faixa de micromoles (Goettig *et al.*, 2010). Acredita-se que o Zn^{+2} tenha papel na descamação e maturação da epiderme (por ser de 5 a 10 vezes mais abundante que na derme). Sua concentração é baixa na camada granular e ainda menor em direção à camada basal (Debela, *et al.*, 2007).

O cobre (Cu^{+2}) revelou uma inibição mais forte da KLK7 em relação à KLK5, mas a regulação de proteases por esse metal ainda não está totalmente esclarecida. A antileucoproteínase e a elafina se mostraram inibidores eficientes da KLK7 reduzindo o desprendimento de corneócitos *in vitro*. Dentre as serpinas (*SERine Protease INhibitor*), a calistatina, a α 1-antitripsina e a α 1-quimotripsina inibem fortemente a KLK7 e o inibidor da proteinase C é inibidor tanto da KLK5 quanto da KLK7 (Goettig *et al.*, 2010).

Muitos inibidores naturais exógenos são amplamente usados em estudos científicos e farmacêuticos (Goettig *et al.*, 2010). O diisopropilfluorofosfato, o fluoreto de fenilmetil sulfonil, o tosil fenil clorometil cetona e a quimostatina são conhecidos inibidores de serino-

proteases quimotrípticas, enquanto que o tosil lisilclorometil cetona, a leupeptina, a antipaína, o inibidor da tripsina de soja e aprotinina inibem as enzimas trípticas.

Como em um substrato ideal, a leupeptina possui uma Arg-P1, que alcança o fundo de S1 e forma uma ponte salina estabilizadora entre seu grupo guanidil positivamente carregado e o carboxilato do Asp189 (Debela *et al.*, 2008). A função aldeído da leupeptina é capaz de ser atacada pelo resíduo nucleófilo efetor (Ser195, no caso) do sítio catalítico, direcionando a um estado de transição símile em complexo com a protease reversivelmente inibida. Mecanismo semelhante ocorre para as clorometil cetonas (CMKs) (Goettig *et al.*, 2010).

Apesar de haver diversos compostos, como os supramencionados, com mecanismos inibitórios já descritos, é importante destacar que muitos potenciais inibidores ainda não foram atribuídos a certas KLKs (Goettig *et al.*, 2010). Além de elucidar tais atribuições, justificam-se os estudos objetivando principalmente aumentar a especificidade sem diminuição da sensibilidade desses inibidores, visto a variedade de doenças nas quais as calicreínas estão envolvidas em suas diferentes localizações nos tecidos e fluidos do corpo.

1.3.1 Compostos derivados de isomanídeos como peptidomiméticos

Estratégias para obter drogas ideais geralmente visam o *design* de inibidores de ligação extremamente forte à enzima. Características comuns de inibidores peptidomiméticos de serino-proteases são grupos que se ligam aos subsítios de especificidade e uma ligação lábil capaz de reagir ou interagir com a serina catalítica (Goettig *et al.*, 2010).

Este trabalho faz parte de um projeto maior de desenvolvimento de novos inibidores peptidomiméticos para serino-proteases derivados de isomanídeos. A síntese dos compostos foi realizada pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal Fluminense (UFF) liderado pelo Prof. Dr. Octavio Augusto Ceva Antunes (*in memoriam*) e pela Profa. Dra. Estela Muri (Barros *et al.*, 2010; Muri *et al.*, 2004). A KLK5 e a KLK7 foram clonadas, expressadas, purificadas e ativadas pelo prof. Dr. Michael Blaber da *Florida State University* (FSU, EUA), que gentilmente cedeu ao programa amostras de ambas as enzimas. Os estudos cinéticos de inibição enzimática foram todos realizados pelo Prof. Dr. Luciano Puzer e equipe do Laboratório de Biologia Química, na Universidade Federal do ABC (UFABC).

Isomanídeos são compostos originados da desidratação do D-manitol em 1,4:3,6-dianidro-D-manitol (Kurochkina *et al.*, 2003; Kuszmann & Medgyes, 1978) (FIG. 4), que por sua vez é um produto da redução da D-frutose (Bruice, 2004).

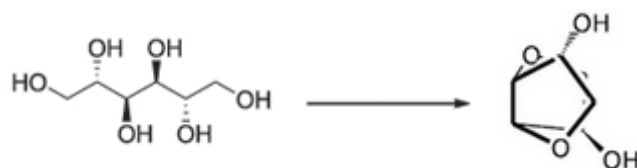


FIGURA 4: Manitol (à esquerda) e isomanídeo (à direita).
Adaptado de Kurochkina *et al.*, 2003.

Seus derivados apresentam uma estrutura bicíclica característica (Nielsen, 2004) e são análogos dipeptídicos rígidos (Barros *et al.*, 2010; Muri *et al.*, 2005) isentos de desvantagens que outras drogas peptídicas apresentam, como baixa permeabilidade e absorção, metabolismo rápido, alto *clearance* e baixa disponibilidade oral (Teixeira *et al.*, 2011). O antiviral bis-tetraidrofuranil (Darunavir, TMC114), (FIG. 5), que age na aspartil-protease do HIV, foi baseado no arcabouço rígido desses compostos (Barros *et al.*, 2010).

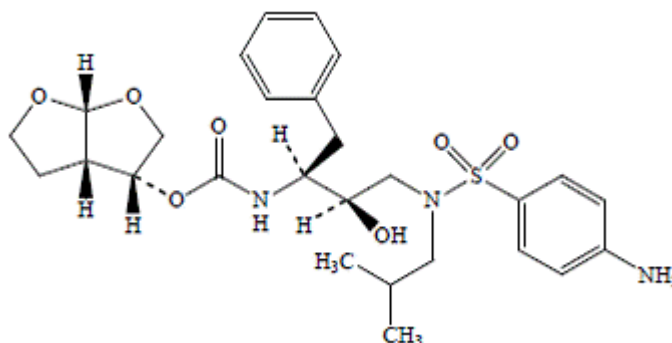


FIGURA 5: Estrutura molecular do Darunavir, um derivado de isomanídeo.

1.3.1.1 Amidas e ésteres derivados de isomanídeos

Os derivados isomanídeos deste estudo podem ser separados em duas séries de acordo com as funções orgânicas presentes em suas moléculas que os distinguem: amidas e ésteres (FIG. 6).

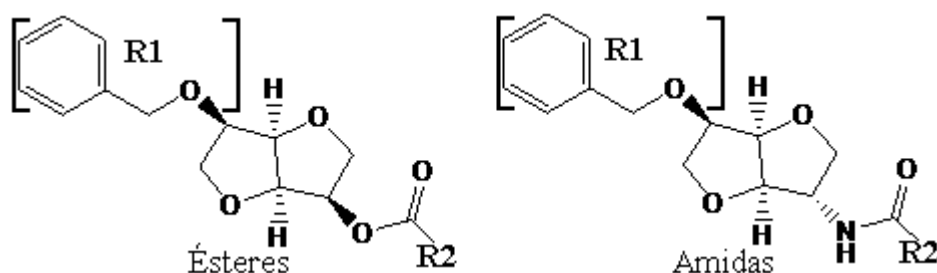


FIGURA 6: Arcabouços das duas séries de derivados isomanídeos. Note que o substituinte R2 é o que diferencia cada composto, enquanto que o substituinte R1 não varia.

As fórmulas estruturais de cada substituinte R2 são mostradas nas FIG. 7, 8 e 9. Cinco dos dezenove derivados de isomanídeo apresentaram um fator de seletividade considerado significativo. A esses inibidores – AM04, AM05, AM07, ES01 e ES04 –, referidos neste estudo teórico como subconjunto alvo, foi voltado interesse acerca das suas propriedades e características estruturais e físico-químicas de seus sítios de interação, que pudessem fornecer mais informações sobre o observado.

TABELA 3: Valores do IC₅₀ e fator de seletividade para os 19 derivados de isomanídeos testados in vitro contra as calicreínas teciduais humanas 5 e 7.

| Inibidor | KLK5 IC ₅₀ (µM) | KLK7 IC ₅₀ (µM) | Fator de seletividade IC ₅₀ -KLK5/IC ₅₀ -KLK7 |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| ES01 | 520,7 | 24,4 | 21,34 |
| ES02 | 222,9 | 239 | 0,93 |
| ES03 | 15,5 | 16 | 0,97 |
| ES04 | 356,6 | 28,7 | 12,43 |
| ES05 | 376,6 | 59,2 | 6,36 |
| ES06 | 3,9 | 19,6 | 0,20 |
| ES07 | 3,7 | 16,6 | 0,22 |
| ES08 | 9,0 | 13,7 | 0,66 |
| ES10 | 4,7 | 10,2 | 0,46 |
| AM02 | 479,8 | N/A | - |
| AM03 | 53,9 | 84,5 | 0,64 |
| AM04 | 37,0 | 456,8 | 0,08 |
| AM05 | 39,2 | 418,3 | 0,09 |
| AM06 | 157,4 | 249,3 | 0,63 |
| AM07 | 320,6 | 23,6 | 13,58 |
| AM08 | 13,3 | 23,6 | 0,56 |
| AM09 | 156,9 | 27,8 | 5,64 |
| AM10 | 21,7 | 56,6 | 0,38 |
| AM14 | 11,8 | 16,9 | 0,70 |

Fonte: cortesia do professor Luciano Puzer e equipe (UFABC).

Foram considerados fatores de seletividade significativos, aqueles com valor maior que 10 ou menor que 0,1.

N/A = Não avaliado (o composto se mostrou insolúvel).

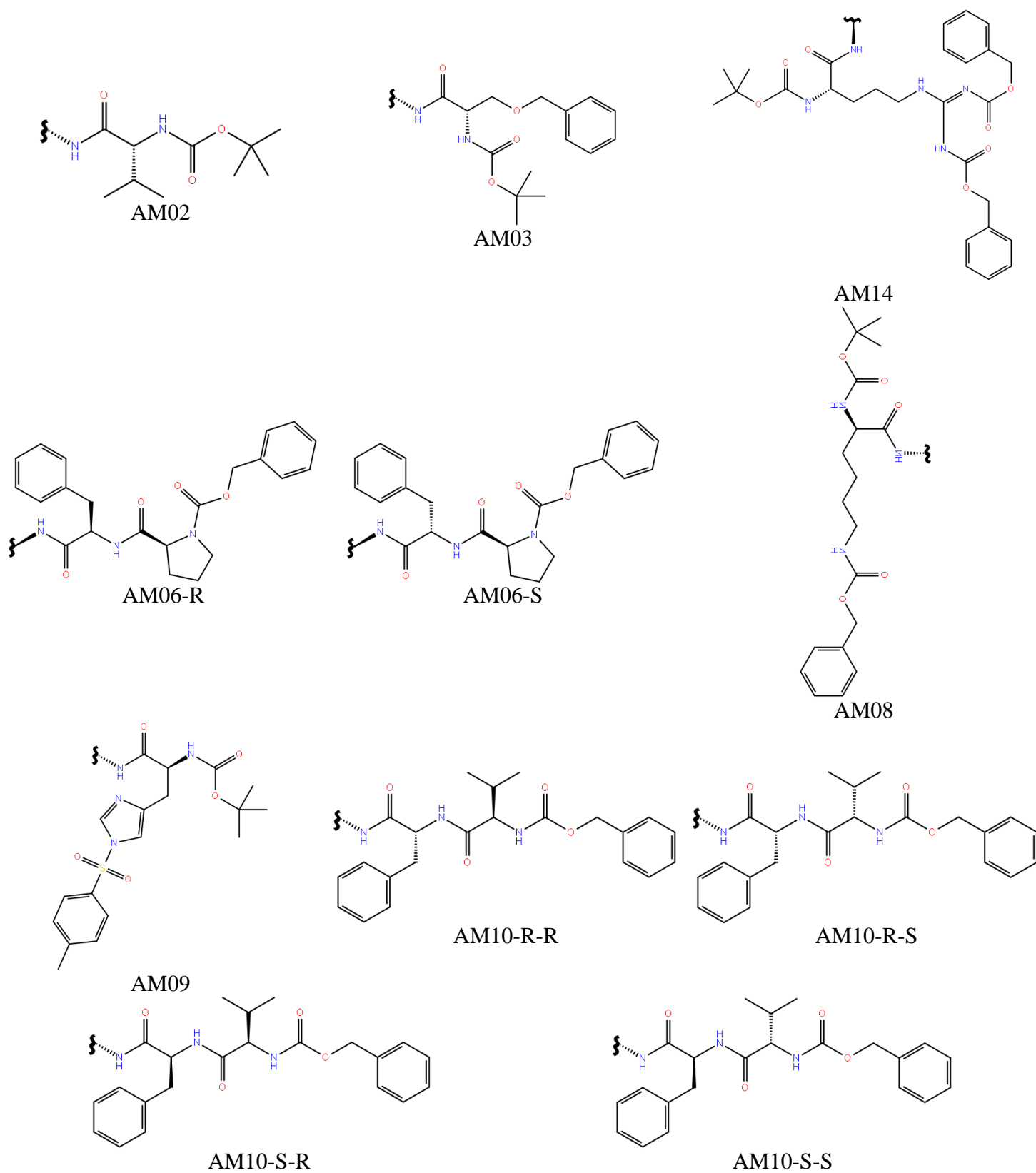


FIGURA 7: Substituintes R2 da série das amidas. AM04 e AM05 não incluídos.

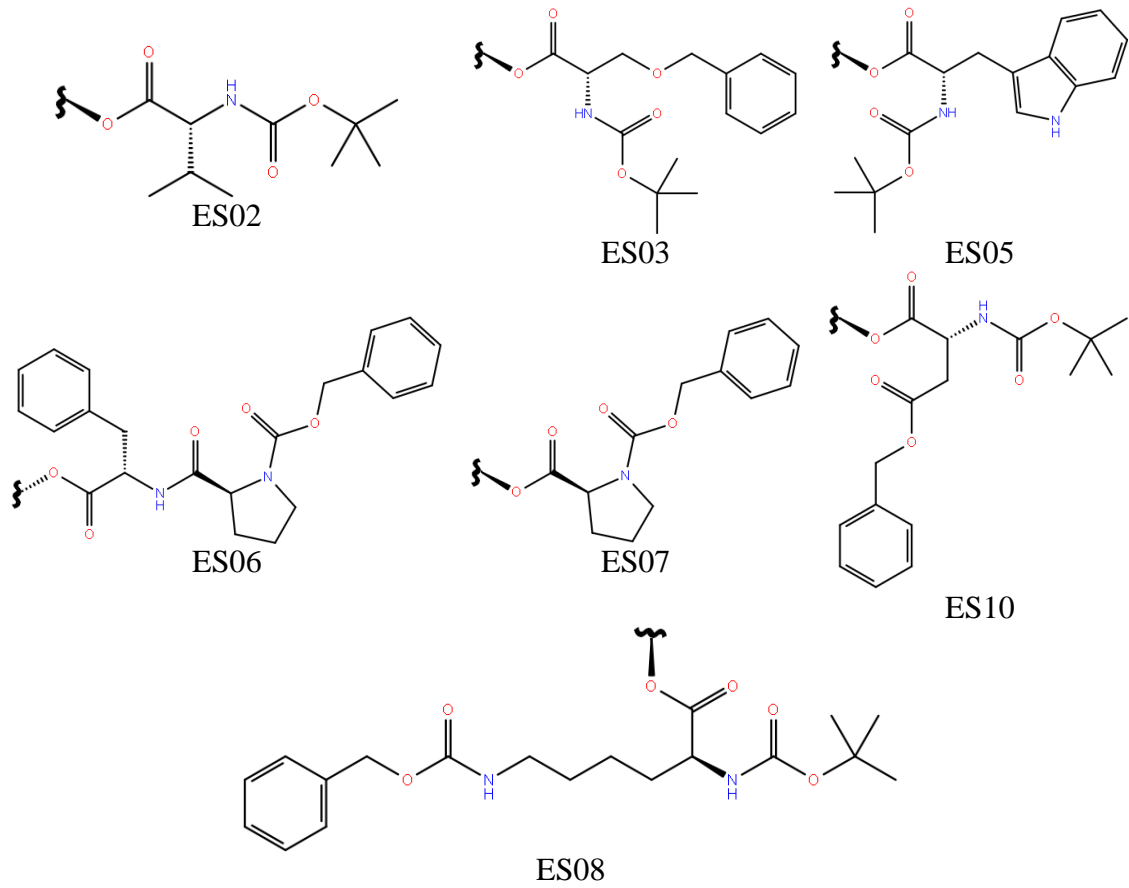


FIGURA 8: Substituintes R2 da série dos ésteres. ES01-R, ES01-S e ES04 não incluídos.

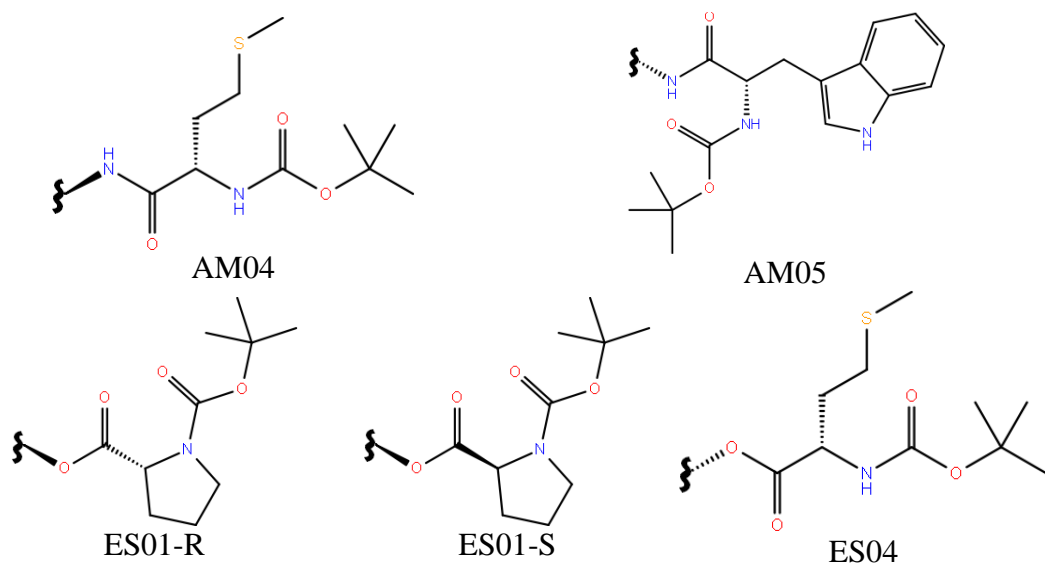


FIGURA 9: Substituintes R2 do subconjunto alvo de ambas as séries.

Os compostos AM04 e AM05 se mostraram notavelmente mais potentes que os demais na inibição da KLK5, enquanto que na inibição da KLK7 o contrário é observado, AM07, ES01 e ES04 foram os mais potentes.

Todos os cinco componentes do subconjunto alvo apresentaram inibição reversível não-competitiva quando confrontados com a KLK7. Porém, interessantemente, na KLK5, o mesmo foi observado apenas para os compostos de maior potência, AM04 e AM05, enquanto os demais, AM07, ES01 e ES04 apresentaram inibição do tipo reversível competitiva. Como os valores da concentração inibitória de 50% da atividade (IC_{50}) podem variar com a concentração de substratos competitivos, a constante de dissociação da enzima (K_i) representa um melhor caminho para comparar potenciais arcabouços inibidores (Teixeira *et al.*, 2011) (TABELA 4).

TABELA 4: Comparação entre as constantes de dissociação (K_i) dos compostos do subconjunto alvo e seus respectivos mecanismos de inibição enzimática.

| Inibidor | KLK5 | | KLK7 | |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | K_i (μ M) | Tipo de inibição | K_i (μ M) | Tipo de inibição |
| ES01 | 375,0 | Competitiva | 15,6 | |
| ES04 | 256,8 | Competitiva | 18,4 | |
| AM04 | 26,6 | Não-competitiva | 292,6 | Não-competitiva |
| AM05 | 28,2 | Não-competitiva | 267,9 | |
| AM07 | 230,9 | Competitiva | 15,1 | |

Fonte: cortesia do professor Dr. Luciano Puzer e equipe (UFABC).

1.4 MODELO FARMACOFÓRICO E *DOCKING* MOLECULAR NO ESTUDO DE FÁRMACOS

A modelagem molecular surgiu da necessidade e possibilidade de prever a estrutura e as propriedades físico-químicas dos compostos, a nível molecular, correlacionando-as através das leis físicas. A química computacional e estudos experimentais caminham juntos, fornecendo respostas e alternativas para a indústria farmacêutica, indústria de materiais, ecologia, ciências biomédicas, além de promissoras perspectivas para as mais variadas áreas da ciência e tecnologia (Cramer, 2006).

1.4.1 Conceito e aplicação do modelo farmacofórico

Um farmacóforo representa a posição tridimensional relativa de importantes grupos na ligação, que deve ser comum a todos os ligantes para um sítio particular. Se o composto é capaz de adotar uma conformação estável, contendo o farmacóforo, isenta de choques estéricos, ele pode se ativo (Langer, 2010).

A abordagem do conceito de farmacóforo tem provado ser extremamente útil como interface entre a química medicinal e computacional. Embora sua primeira definição tenha sido atribuída a Ehrlich, sua introdução foi feita por Kier ao descrever características moleculares comuns de ligantes de importantes receptores do sistema nervoso central, seguido por Höltje em 1974 (revisado por Langer, 2010; Kier, 1967).

O centro para um doador de ligação de hidrogênio deveria ser o próprio H, mas devido à grande incerteza de onde esse átomo está, em função da rotação, o heteroátomo é definido como o centro de um ‘volume disponível’, no qual o H é incluído. Centros hidrofóbicos são calculados como o ponto médio de um esqueleto carbônico envolvendo 3 ou mais átomos de carbono. Além de centros doadores e receptores de ligação de hidrogênio, outras interações, bastante gerais, são as do tipo eletrostática e metal-íon (Langer, 2010; Nielsen, 2004).

Um bom modelo pode então ser utilizado para prever com sucesso a atividade de uma grande variedade de armações químicas, através da consulta 3D num banco de dados e para avaliar compostos recém-desenhados antes de realizar qualquer pesquisa experimental, inclusive síntese (Lu *et al.*, 2011).

1.4.2 Fundamentação teórica do *docking* molecular

Um dos mais freqüentes problemas encontrados no projeto de novos fármacos é ‘decidir’ a conformação ativa do ligante, que, na ausência das interações compensadoras com o seu receptor, pode ser a menos estável. A maneira mais fácil de identificá-la é evidenciá-la no sítio, pelo estudo do cristal pela conhecida técnica de difração de raio-X (Patrick, 2009).

Cálculos baseados na Mecânica Clássica (métodos de campo de força) assumem as moléculas como uma coleção de átomos unidos por forças harmônicas ou elásticas (Cramer, 2006). Modelos são construídos para simular as forças de pequenos estiramentos entre átomos das ligações covalentes, rotações em torno das mesmas e interações não lineares (como ligações de hidrogênio). Distâncias randômicas entre os átomos são variadas, fornecendo um conjunto de energias cinéticas (vibracionais) e potenciais. A minimização da energia total do

sistema rende então a estrutura otimizada, que pode ser submetida a diversos outros métodos e abordagens para avaliação da propriedade desejada (Lindsay, 2010).

Um desses métodos é o processo que faz uso da química computacional para avaliar a energia livre de Gibbs de interação (ΔG_i) entre duas espécies químicas complexadas, em vários posicionamentos diferentes de uma ou ambas as estruturas, denominado *docking* molecular. O valor dessa energia liberada é o somatório total das energias das forças intermoleculares fracas, que refletem num acréscimo de estabilidade tornando a interação termodinamicamente favorável. Logo, quanto menor seu valor, melhor é o escore de ligação associado (Friesner, 2006).

Várias sondas (tais como um próton ou um carbocátion hibridizado sp^3) são usadas para pontuar as interações com os aminoácidos que compõem a superfície do sítio. Após armazenar os valores de diversas forças de ligação, o *docking* pode ser rapidamente executado, por identificar quais átomos ou grupos coincidem nos pontos de grade específicos (Patrick, 2009).

Em geral, o *docking* rígido permite a conformação de *input* do ligante a ser transladada e rigidamente girada em relação ao sítio de ligação do receptor, mas não gera conformações variando-se os ângulos de torção, como ocorre no *docking* flexível (Friesner, 2006). A macromolécula, uma enzima, por exemplo, tem a geometria fixada e uma caixa contendo parte de sua estrutura, como sítios de ligação de enzimas ou receptores, é construída. A caixa é dividida em várias outras menores, constituindo a grade (*grid*). Os *grids* têm sido extensivamente utilizados no estudo de propriedades moleculares. Um exemplo de fármaco, em cujo desenvolvimento o uso do *grid* foi importante, é o antigripal zanamivir (Nielsen, 2004).

1.4.3 Glide – *Grid-based ligand docking with energetics*

O programa Glide (*Grid-based ligand docking with energetics*) (Friesner *et al.*, 2004) foi desenvolvido para fazer uma busca exaustiva da posição, orientação e, no caso do *docking* flexível, conformação espaciais do ligante (conjuntamente denominadas pose do ligante) no interior do sítio do receptor, através de uma série de filtros (FIG. 10) (Friesner *et al.*, 2006).

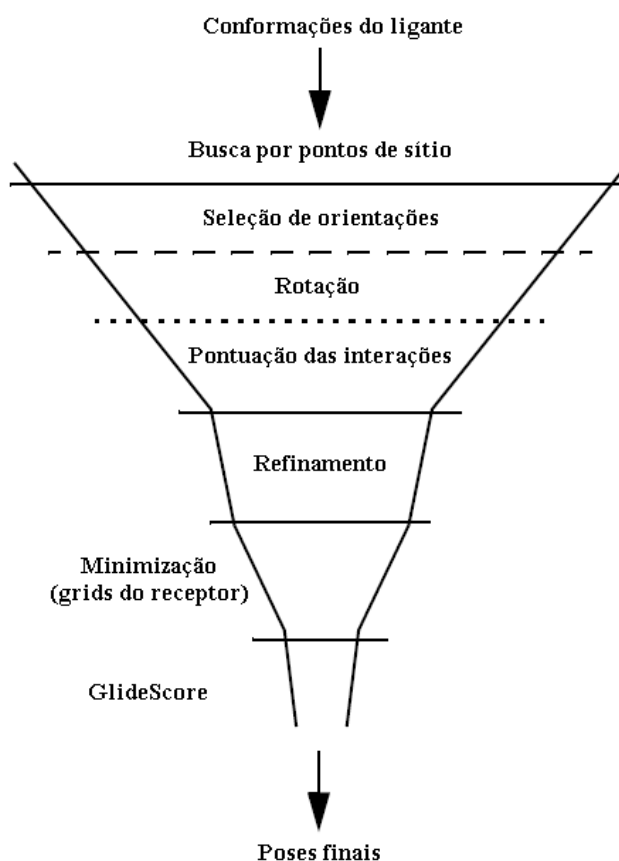


FIGURA 10: A busca hierárquica do Glide. Pontos de sítio dentro de um *grid* dividido em caixas de 2 Å de aresta são selecionados. O centro das diferentes conformações do ligante são colocadas em diferentes orientações em determinado ponto de sítio, e são descartadas se há muitos choques estéricos com o receptor (passos 1-3). A partir da rotação do ligante, as ligações de hidrogênio e ligante-metal são pontuadas e se o valor for alto, as demais interações (passos 4-5). O número de poses é então diminuído via um refinamento, no qual o ligante move rigidamente 1 Å nas direções cartesianas. Um número bastante reduzido de poses é passado para os dois últimos estágios, minimização e GlideScore.

Adaptado de Friesner *et al.*, 2004

A energia das interações é inicialmente calculada usando uma versão discretizada da função empírica do ChemEscore (Friesner & Murphy, 2006; Eldridge *et al.*, 1997), cuja forma original é mostrada na Equação (1),

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{hbond}} \sum_i g_1(\Delta r) g_2(\Delta \alpha) + \Delta G_{\text{metal}} \sum_{\text{aM}} f(r_{\text{aM}}) + \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{\text{IL}} f(r_{\text{IL}}) + \Delta G_{\text{rot}} \quad (1)$$

ΔG_{hbond} é o termo para ligação de hidrogênio, onde i representa os átomos do ligante, I , os átomos do receptor. A função $g_1(\Delta r)$ pode assumir três diferentes valores, sendo eles: 1, se $\Delta r \leq 0,25$ Å; $1 - (\Delta r - 0,25)/0,4$, se $0,25$ Å $< \Delta r \leq 0,65$ Å; 0, se $\Delta r > 0,65$ Å. Analogamente, a função $g_2(\Delta \alpha)$ também pode assumir três diferentes valores: 1, se $\Delta \alpha \leq 30^\circ$; $1 - (\Delta \alpha - 30)/50$,

se $30^\circ < \Delta\alpha \leq 80^\circ$; 0, se $\Delta\alpha > 80^\circ$. Δr é o desvio do comprimento da ligação de hidrogênio H--O/N de 1.85 Å, e $\Delta\alpha$ é o desvio do ângulo de ligação de hidrogênio N/O-H---O/N de seu valor ideal de 180° .

O termo ΔG_{metal} é calculado através da função $f(r)$, um termo de contato simples, onde r_{aM} é a distância entre qualquer átomo aceptor e aceptor/doador, a , no ligante e qualquer átomo de metal, M , no receptor. A forma de $f(r)$ é mostrada no gráfico (FIG. 11).

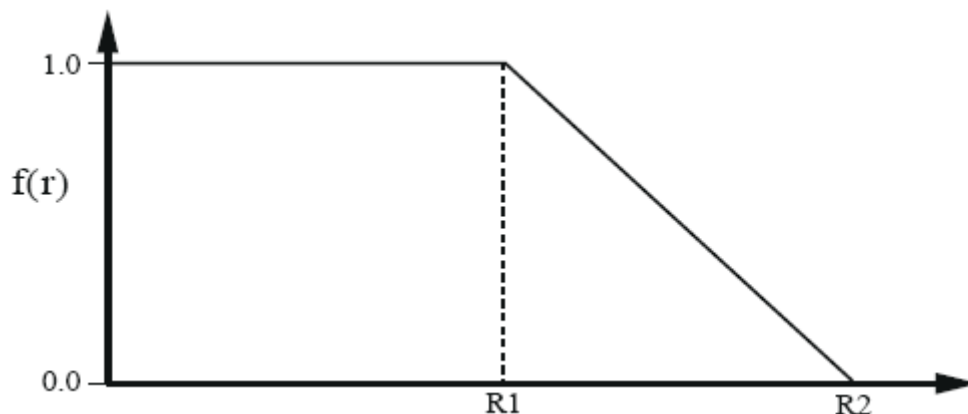


FIGURA 11: Forma funcional de $f(r)$.

Fonte: Eldridge *et al.*, 1997.

Para o termo metálico, os parâmetros R1 e R2 valem 2,2 e 2,6 Å, respectivamente.

ΔG_{lipo} , o termo lipofílico, é calculado para os átomos lipofílicos do ligante, l , e do receptor, L . Os parâmetros R1 e R2 são $r_l^{\text{vw}} + r_L^{\text{vw}} + 0,5$ e $R1 + 3,0$ respectivamente, onde r^{vw} representa o raio de van der Waals, medido em Å.

O termo final, ΔG_{rot} , penaliza ligações giratórias (sp^3-sp^3 , sp^2-sp^3) congeladas, ou seja, quando ambos os lados estão em “contato” com o receptor (distância menor do que soma dos dois raios de van der Waals mais 0,5 Å) (Eldridge *et al.*, 1997).

Através de rotações, translações e movimentação torcional (esta quando conformações são geradas internamente – docking flexível), a energia é minimizada por uso de um *grid* de campos de van der Waals e eletrostáticos do OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) (Jorgensen *et al.*, 1996), pré-computados para o receptor, em conjunto com o modelo dielétrico dependente da distância *Generalized Born* (GB) (Jorgensen, Ulmschneider, & Tirado-rives, 2004; Still *et al.*, 1990) detalhado mais adiante (Friesner *et al.*, 2004).

As poses minimizadas são repontuadas através da função de escore do Glide, de propriedade da Schrödinger e originada da modificação de termos do ChemScore, (Friesner *et al.*, 2004). A equação (2) mostra os novos termos do GlideScore, os quais são detalhados a seguir.

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{Coul}} + \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{lipo}} \sum f(r_{\text{lr}}) + \Delta G_{\text{hbond-neut-neut}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + \\ + \Delta G_{\text{hbond-charged-charged}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + \Delta G_{\text{metal}} \sum f(r_{\text{lm}}) + \Delta G_{\text{rotb}} + \text{penalidades} \quad (2)$$

As energias da interação eletrostática, ΔG_{Coul} , e relacionada às forças de van der Waals, ΔG_{vdW} , são descritas pelos termos derivados da lei de Coulomb e do potencial de Lennard-Jones, respectivamente. Justificando que suas formas funcionais e parametrizações já estão extensivamente difundidas na literatura (Jorgensen & Tirado-rives, 1988; Lennard-Jones, 1931), as mesmas não foram apresentadas por Friesner e colaboradores (2004).

As ligações de hidrogênio entre motivos carregado–carregado ($\Delta G_{\text{hbond-charged-charged}}$) e neutro–neutro ($\Delta G_{\text{hbond-neut-neut}}$) contribuem excepcionalmente para a afinidade da interação, sendo este último caso considerado chave do reconhecimento molecular encontrados em muitos, se não da maioria, dos alvos farmacêuticos (Friesner & Murphy, 2006). Os valores variam de acordo com o desvio da geometria ideal, baseada na função do ChemScore, que é aplicada ao termo $\Delta G_{\text{hbond-charged-charged}}$. Porém, através de exaustiva análise de resultados de experimentos computacionais e empíricos, quanto ao termo $\Delta G_{\text{hbond-neut-neut}}$ utilizam-se funções lineares dos parâmetros $S(\theta)$ para o desvio da angulação ideal de 180° da ligação N/O-H---O/N e de $S(r_{\text{O---H}})$ para o desvio da distância ideal ($r_0 = 1,8 \text{ \AA}$), de forma que:

$$\Delta G_{\text{hbond-neut-neut}} = A * S(\theta) * S(r_{\text{O---H}}) \quad (3)$$

Onde A é constante na equação (3). $S(r_{\text{O---H}})$ pode assumir os valores: 1,0, se $r_{\text{O---H}} = r_0$; $(r_{\text{O---H}} - r_0)/(r_m - r_0)$, se $r_0 < r_{\text{O---H}} < r_m$; 0, se $r_{\text{O---H}} = r_m$. O valor r_m é a distância máxima permitida. Analogamente, $S(\theta)$ pode assumir os valores: 1, se $\theta = \theta_0$; $(\theta - \theta_m) / (\theta_0 - \theta_m)$, se $\theta_m < \theta < \theta_0$; 0, se $\theta < \theta_m$. Os valores θ_0 e θ_m são os ângulos máximo e mínimo permitidos, respectivamente.

O termo ΔG_{metal} é modificado para considerar apenas aceptores aniônicos, favorecendo a forte preferência deste tipo de interação em metaloproteases. A forma funcional do ChemScore é mantida (Friesner *et al.*, 2004).

1.4.3.1 Glide XP e o contribuinte lipofílico

O algoritmo *Extra Precision Mode* (XP) do Glide contém funções revisadas das originais encontradas no Glide (Friesner & Murphy, 2006). O termo ($E_{\text{phobic_pair}}$) possui a forma original para a interação entre dois átomos lipofílicos detalhada para o ChemScore.

Entretanto esse termo é potencialmente pouco sensível à geometria local em questão, o que levou a vários experimentos computacionais a fim de discriminar entre diferentes geometrias do entorno. O critério de sucesso é a habilidade de se ajustar a uma ampla faixa de dados experimentais. Quando um grupo de átomos lipofílicos do ligante é envolto por átomos lipofílicos da proteína, a certo ângulo α , tem-se o invólucro hidrofóbico (referido pelo termo $E_{\text{hyd_enclosure}}$), cuja contribuição para a energia livre de ligação é maior que aquela encontrada unicamente pelo termo $E_{\text{phobic_pair}}$ (Friesner & Murphy, 2006).

A cada átomo j do ligante, a uma distância r de um átomo k do receptor pertencente a um grupo hidrofóbico (carbonos conectados ininterruptamente) é atribuído um grupo hidrofóbico. O número de contatos é calculado dentro da distância r definida por:

$$r = vdW_j + vdW_k + 3 \text{ \AA} \quad (4)$$

O escore total é dado pelo somatório negativo dos escores de cada grupo, S_g .

$$S_g = \sum_j S_j(r) S_j(\alpha) \quad (5)$$

Onde $S_j(r)$ é o escore de contato em função de r e $S_j(\alpha)$ é o escore em função de α .

O Glide XP ainda acrescenta outros termos. O empilhamento π -aromático e interações π -cátion são avaliados pelo termo E_{PI} . Correções empíricas favorecendo a energia de afinidade de ligantes menores em relação aos maiores também estão presentes. Porém, devido às parametrizações terem sido realizadas utilizando-se dados limitados, mais detalhes não foram apresentados por Friesner e colaboradores (2006).

1.4.3.2 Glide XP e os termos de penalidade

Poses de escore altamente favorável podem estar violando princípios físico-químicos chave, o que levou à necessidade da aplicação dos termos de penalidade ($\Delta G > 0$), presentes

no Glide XP, objetivando diminuir a formação de poses “falsos positivos” (Friesner & Murphy, 2006). As penalidades (definidas pelo termo E_{penalty}) são aplicadas ao componente estérico, à perda da entropia e à dessolvatação, tanto do ligante quanto do receptor:

$$E_{\text{penalty}} = E_{\text{desolv}} + E_{\text{ligand_strain}} \quad (6)$$

Modelos de solvatação contínuos podem oferecer resultados pobres visto que o papel de moléculas individuais podem ser críticos na avaliação da energia de afinidade. O termo E_{desolv} , adiciona esferas de 2,8 Å, representativas das moléculas de água, às poses emergentes. Estatísticas são tabuladas em relação ao número de águas ao redor de cada grupo hidrofóbico, polar e carregado do ligante e do sítio ativo. Quando um grupo é julgado ser inadequadamente solvatado, uma penalidade é atribuída.

A função $E_{\text{lig_strain}}$ elimina as poses que apresentam três ou mais contatos n intramoleculares (distância < 2,2 Å) entre átomos pesados (não hidrogênio) do ligante. Se $n \leq 3$, penalidades são aplicadas de acordo com o tamanho dos grupos em contato. Tal termo é bastante tolerante visto o fato de que no encaixe o ligante tem que se ajustar a uma cavidade rígida e “imperfeita” de seu ponto de vista.

1.4.4 Princípios de mecânica quântica

A mecânica quântica é o campo da Física que recorre à teoria dos orbitais moleculares (resoluções matemáticas de equações de onda), objetivando colocar previsões solidamente fundamentadas, com uma descrição probabilística, sobre onde uma partícula deve ser encontrada (Lindsay, 2010; Cramer, 2006).

Em 1924 Louis de Broglie aprofundou no princípio da propriedade onda-símile da matéria, estabelecendo a dicotomia chave da química quântica. Pela teoria de deBroglie, $\upsilon\Psi = e\Psi$, onde o objetivo matemático do operador, υ , pode ser filosoficamente entendido como um oráculo que questiona à função de onda (autofunção), Ψ , a propriedade de interesse fisicamente observável. Como postulado por Erwin Schrödinger, se o operador fornece a energia (E) como um autovalor, é denominado operador Hamiltoniano (H) (Cramer, 2006).

$$H \Psi = E \Psi \quad (7)$$

A função de onda contém o sistema de coordenadas do sistema, o que leigamente seria um “mapa da estrada”. A unidade de medida do quadrado do módulo de Ψ , ou seja, $|\Psi|^2$ está em densidade de probabilidade para uma região multidimensional, isto é, há integração sobre toda aquela região do espaço (Cramer, 2006).

O operador Hamiltoniano contendo os termos cinéticos e de atração eletrostática para um sistema monoelétrônico, pode ser separado para a construção de um sistema multieletrônico através da multiplicação das funções de onda para um elétron. A primeira iniciativa para tal foi feita por Hartree. Aproximações, somadas por Fock, originaram o método quântico de Hartree-Fock (Cramer, 2006).

A justificativa de se utilizar a mecânica quântica no estudo de um conjunto de fármacos, com a premissa de possuir a mesma atividade biológica sobre uma enzima, está em descrever se as características comuns de suas estruturas eletrônicas constituem-se propriedades farmacofóricas específicas. Um das maneiras mais difundidas que possibilita tal abordagem é a Teoria do Funcional de Densidade, que será mais bem destrinchada na sessão a seguir.

1.4.4.1 Cálculos baseados na Teoria do Funcional de Densidade

A função de onda eletrônica é dependente de $3n$ variáveis: as três coordenadas x , y e z para n elétrons, assim como a função da densidade eletrônica total depende das coordenadas espaciais x , y e z , também sendo um observável físico (Bachrach, 2007). A dependência do total do número de elétrons imediatamente sugere que a densidade eletrônica, desde que integrada sobre todo o espaço, fornece esse total (Cramer, 2006). A partir desse pensamento, um caminho mais direto de se obter a energia molecular pode ser seguido utilizando a densidade total, mais simples que a função de onda em si (Hohenberg & Kohn, 1964).

Na Teoria do Funcional de Densidade (DFT), o potencial efetivo é *definido* como aquele que torna a densidade para uma partícula, a *exata* densidade para o sistema (Hohenberg & Kohn, 1964). A densidade eletrônica, $\rho(r)$, é a soma dos quadrados das funções de onda em r . O *output* fornece a distribuição $\rho(r)$ da densidade eletrônica que minimiza a energia do estado fundamental do sistema, $E[\rho(r)]$, que também é encontrada (Lindsay, 2010).

Baseando-se no teorema de Hohenberg-Kohn, temos:

$$E[\rho(r)] = T_S + U + V_{\text{nuc}} + XC \quad (8)$$

Onde o termo T_S é a energia cinética dos elétrons nos orbitais, U e V_{nuc} são as energias de Coulomb proporcional à distância entre dois elétrons e entre os elétrons e os núcleos, respectivamente (Burke, 2012; Lindsay, 2010). O termo XC é a pequena aproximação em função de ρ (densidade de um elétron no estado fundamental), que torna a equação exata, a energia de troca-correlação (Burke, 2012). A troca implica na necessidade de manter a função de onda geral antissimétrica sob a troca dos rótulos das partículas, e a correlação é um artefato que trata os elétrons interagindo como partículas únicas com um ambiente efetivo (Lindsay, 2010).

Uma série de funcionais tem sido proposta, levando a muitos diferentes métodos DFT. Um exemplo é o BLYP, baseado no funcional de Becke e no de Lee, Yang e Parr. Ao acrescentar o termo de troca original da teoria Hartree-Fock, se torna o híbrido B3LYP (Frisch *et al.*, 2009; Becke, 1993).

Espera-se por meio deste estudo teórico computacional, observar nesses inibidores, características tanto estruturais (ângulos de torção preferenciais e interações intermoleculares importantes) quanto eletrônicas (orbitais moleculares de fronteira) que forneçam respostas condizentes com os achados experimentais disponíveis, essencialmente as potências comparadas (valores de IC_{50} e K_i) e os mecanismos inibitórios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS.

Elucidar a relação entre as estruturas químicas e resultados experimentais de um conjunto de isomanídeos peptidomiméticos, como inibidores das calicreínas teciduais humanas 5 e 7.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as interações predominantes entre um conjunto de isomanídeos peptidomiméticos com a KLK5 com Docking Molecular.
- Estudar as interações entre um conjunto de isomanídeos peptidomiméticos com a KLK7 com Docking Molecular.
- Investigar a similaridade molecular e eletrônica dos compostos estudados a partir de cálculos quânticos DFT.
- Comparar as diferentes interações e dados experimentais investigados sobre as duas proteases.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DOCKING MOLECULAR

Os arquivos contendo as informações estruturais cristalográficas das calicreínas 5 e 7 foram obtidos do *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>), sendo 2PSX e 2QXH seus respectivos códigos de identificação. A estrutura cristalina da KLK5, complexada com o inibidor leupeptina (Debela, *et al.*, 2007), apresenta resolução de 2,30Å, enquanto a KLK7, complexada com Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-clorometilcetona (K7J) (Debela *et al.*, 2007b), apresenta resolução de 2,00 Å. Os ligantes, íons e moléculas de solvente de ambas foram removidos. A KLK5 contém quatro sítios para carboidratos N-ligados. Adjacente ao segmento Asn159-Ile160-Ser161, ou seja, oposto à fenda do sítio ativo, a densidade eletrônica claramente indica a presença de uma cadeia de carboidrato N-ligada à Asn159 (Debela, *et al.*, 2007). Essa densidade “corresponde bem” uma 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glicopiranosose (GluNAC) proximal, β-1,4-ligada a uma segunda GlucNAc (Teixeira *et al.*, 2011). A KLK7 possui um sítio para ligação de carboidrato, como visto na TABELA 2, mas não apresenta glicosilação (o que pode ser devido à sua expressão em célula de inseto) (Debela *et al.*, 2007b). As estruturas protéicas foram então preparadas através do programa *Protein Preparation Wizard* (Schrödinger, 2011), pela qual os resíduos ionizáveis foram devidamente protonados ou desprotonados, os grupos amidas terminais desalinhados foram otimizados, assim como ângulos e ordens de ligação que favoreciam confrontos estéricos. As moléculas de água foram eliminadas. Possíveis selenometioninas – aminoácido natural encontrado em vários alimentos e incorporado no lugar da metionina durante a tradução (Schrauzer, 2000) – foram convertidas em metioninas. Minimização da energia foi selecionada e o OPLS_2005 escolhido como campo de força. O OPLS_2005 é uma versão melhorada desenvolvida pela Schrödinger do campo de força OPLS_2001 (Jorgensen, Ulmschneider & Tirado-rives, 2004; Watkins & Jorgensen, 2001; Kaminski *et al.*, 2001), para maior abrangência das funcionalidades orgânicas. Os parâmetros para proteínas também foram atualizados para aqueles publicados mais recentemente (Schrödinger, 2009). O OPLS_2001, por sua vez, é o melhor disponível no MacroModel (LLC Schrödinger, 2009) para simulações de peptídeos em fase condensada.

Como os testes cinéticos mostraram que a KLK5 apresenta inibição competitiva e não-competitiva e a KLK7 apenas inibição não-competitiva pelos 5 inibidores do subconjunto alvo, a busca por prováveis sítios alostéricos se fez necessária. O servidor online *Computed*

Atlas of Surface proteins (CASTp) (Dundas *et al.*, 2006) foi utilizado para localizar as cavidades (ou indentações com mais de uma abertura externa) na KLK5 e KLK7. Seus tamanhos foram então quantificados através do método geométrico α -shape (Liang, Edelsbrunner & Woodward, 1998), cujos detalhes matemáticos fogem do escopo deste trabalho.

Os grids foram calculados através do programa Glide (Friesner *et al.*, 2004), que usa um campo de força *all-atom* para avaliação da energia exata. Para o sítio catalítico, a caixa do grid foi projetada de forma que a tríade catalítica ocupasse posição central. Para os candidatos a sítios alostéricos, foi escolhida a tríade de resíduos que mais apropriadamente constituíam o fundo da fenda.

Os 25 ligantes foram desenhados com auxílio das ferramentas da interface gráfica Maestro (Schrödinger, 2012b) e do programa ChemSketch (Advanced Chemistry Development, 2013), e salvos no formato pdb. Diferentes configurações estereoquímicas foram consideradas para os quatro compostos – AM06, AM07, AM10 e ES01 – para os quais não foram especificadas, perfazendo 25 estruturas de input. Cada estrutura teve a energia minimizada e a geometria otimizada. A opção de docking flexível e de amostragem de conformações de anéis foram selecionadas para gerar conformações internamente durante o processo, não limitadas à rotação de ligações acíclicas. A aplicação de funções de penalidade para grupamentos amida não *cis* ou não *trans* também foi selecionada. A flexibilidade molecular foi modelada através de um máximo de 250 confôrmeros para cada composto. O limiar energético de 100 kcal/mol a partir do nível mais baixo de energia foi mantido. Ambos os valores são físico-quimicamente coerentes, visto que energia necessária para vencer as atrações intermoleculares entre as moléculas de HCl líquido para vaporizá-lo é 16 kJ/mol (~3,8 kcal/mol) e a maior contribuição para a interação destes compostos com as enzimas é do tipo lipofílica, mais fraca que as interações dipolo-dipolo (Brown *et al.*, 2005). Peptídeos lipofílicos também são prováveis de se dobrar em uma conformação de baixa energia em solução e, portanto, o número efetivo de ligações giratórias livres é reduzido (Eldridge *et al.*, 1997).

Para o modelo contínuo dielétrico dependente da distância baseado na equação generalizada de Born (GB) (Still *et al.*, 1990), utilizada pelo Glide, foi mantido o valor da constante dielétrica em 2,0, cuja alteração não é recomendada.

A constante dielétrica efetiva (D_{eff}) utilizada pelo modelo é dada por:

$$1/D_{\text{eff}} = 1 - (1 - 1/\epsilon) r_{ij}/f_{\text{GB}} \quad (9)$$

Onde ϵ é a constante dielétrica, r é a distancia entre as cargas i e j , e a função f_{GB} , que contém os valores dos raios de Born, α_i e α_j , calculados implicitamente, é definida como segue:

$$f_{\text{GB}} = \sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_i \alpha_j \exp\left(\frac{-r_{ij}^2}{4\alpha_i \alpha_j}\right)} \quad (10)$$

Em modelos contínuos, utilizados para aproximar a representação de todas as cargas pontuais do sistema, o valor da constante dielétrica varia de 2 a 20 para a proteína e aproximadamente 80 para o solvente (Kukic & Nielsen, 2010; Mallik *et al.*, 2002). Uma terceira minimização, pós-docagem e de campo de força completo, também foi selecionada para penalizar poses com geometrias altamente tensas e eliminar aquelas com conformações eclipsadas, além de otimizar comprimentos de ligação, ângulos e torções. As poses de melhor escore dos compostos AM04, AM05, AM07-R, AM07-S, ES01-R, ES01-S e ES04 foram salvas em formato *gif* para cálculos quânticos.

3.2 ESTUDO QUÂNTICO – DFT

As poses foram salvas em formato *gif* e submetidas a cálculos para investigação da estrutura eletrônica baseados na Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (Kohn & Sham, 1965; Hohenberg & Kohn, 1964), sob o conjunto de bases 6-31G(d,p) no vácuo e com solvatação implícita através do Modelo Contínuo Polarizável no formalismo da equação integral (IEFPCM) (Tomasi *et al.*, 2005).

Depois de realizados os cálculos DFT, ângulos de torção (diedros) principais dos confôrmeros obtidos foram comparados aos dos sítios ativos e alostéricos de cada composto do subconjunto alvo. As configurações dos orbitais moleculares ocupados de mais alta energia (HOMO) e dos orbitais moleculares desocupados de mais baixa energia (LUMO) foram analisadas no programa Gaussian09 (Frisch *et al.*, 2009) e correlacionadas ao *docking*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS EXOSSÍTIOS NAS SUPERFÍCIES DA KLK5 E KLK7

A busca por sítios alostéricos através do software CASTp resultou em dezenas de candidatos. Foram escolhidos cinco bolsos na KLK5 e mais cinco na KLK7. Objetivando uma padronização das características dimensionais das cavidades serem submetidas ao estudo de docking, o critério de escolha levou em conta se suas áreas e volumes eram maiores ou iguais a 90 \AA^2 e 90 \AA^3 , respectivamente, visto que os demais apresentaram valores inferiores e discrepantes. Por razões didáticas, uma nova nomenclatura para esses sítios foi convencionada, como mostrado na TABELA 5.

TABELA 5: Possíveis sítios alostéricos da KLK5 e KLK7 obtidos da busca pelo CASTp.

| Enzima | Nomenclatura original | Nomenclatura adaptada |
|--------|-----------------------|-----------------------|
| KLK5 | 32 | Alo5a |
| | 31 | Alo5b |
| | 30 | Alo5c |
| | 29 | Alo5d |
| | 28 | Alo5e |
| KLK7 | 31 | Alo7a |
| | 30 | Alo7b |
| | 29 | Alo7c |
| | 28 | Alo7d |
| | 27 | Alo7e |

A partir de suas sequências de aminoácidos, a tríade para construção das grades para o docking foi escolhida baseando-se nos resíduos que melhor constituem o fundo de cada bolsão. Além das sequências, as medidas da área, o volume e a área de abertura ou soma total das áreas de aberturas são na TABELA 6.

TABELA 6: Área, volume, área de abertura e sequência de resíduos dos sítios alostéricos da KLK5 e KLK7.

| Sítio | Área (Å ²) | Volume (Å ³) | Abertura (Å ²) | Resíduos | |
|-------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------|---|
| KLK5 | Alo5a | 171,7 | 198,1 | 29,3 | Asp189*, Ser190*, Cys191, Gln192, Ser195, Val213, Ser214, Trp215*, Gly216, Asp216, Cys220 e Gly226. Ile160, Ala183, Gly184*, Asp185, Lys186, Gly187, Arg188, Asp189*, Ala221, Arg221, Arg224, Pro225* e Gly226. |
| | Alo5b | 209,9 | 209,5 | 40,7 | Lys60, Phe63*, Gly85*, Val86*, Lys87, Ser88 e Ile106. |
| | Alo5c | 90,5 | 110,9 | 58,2 | Val47*, Asn122, Val123*, Thr235 e Ile238*. |
| | Alo5d | 102,3 | 134,9 | 51,4 | Asn159*, Ile160*, Ser161*, Gly184, Asp185 e Arg188. |
| | Alo5e | 114,6 | 121,2 | 47,2 | Asn189*, Ala190, Cys191, Asn192, Ser195, Val213, Trp215, Gly216, Thr217, Cys220, Gly220, Gln222, Tyr228*, Val227, Gly226*. |
| KLK7 | Alo7a | 317,3 | 335,9 | 50,7 | Gly25, His27, Pro28, Gln30*, His66, Leu67, Gly69*, Ser70, Asp71, Met117, Trp141*, Leu155. |
| | Alo7b | 186,4 | 175,9 | 7 | Gly69*, Asp75, Arg77, Ala78, Gln79*, Arg113, Ser115, Met117, Val118*. |
| | Alo7c | 142,4 | 203,6 | 99,2 | Gly184, Ile185, Ser186, Lys187*, Lys188, Asn189*, Gly220*, Gln221, Asn223, Asp224, Pro225. |
| | Alo7d | 142,1 | 139,3 | 20,6 | Pro165, Cys168, Leu176*, Met180, Leu181*, Cys182* e Gln230. |
| | Alo7e | 122,1 | 137,1 | 51,4 | |

* Resíduos utilizados como tríade de construção do *grid* para o docking em cada sítio.

Na KLK5, o bolso Alo5a apresenta alta correspondência de resíduos com o subsítio S1 do sítio ativo. Alo5b compartilha os resíduos Asp189 e Gly226 com o subsítio S1, e os resíduos Ile160, Gly184, Asp185 e Arg188 com o sítio Alo5e (FIG. 12).

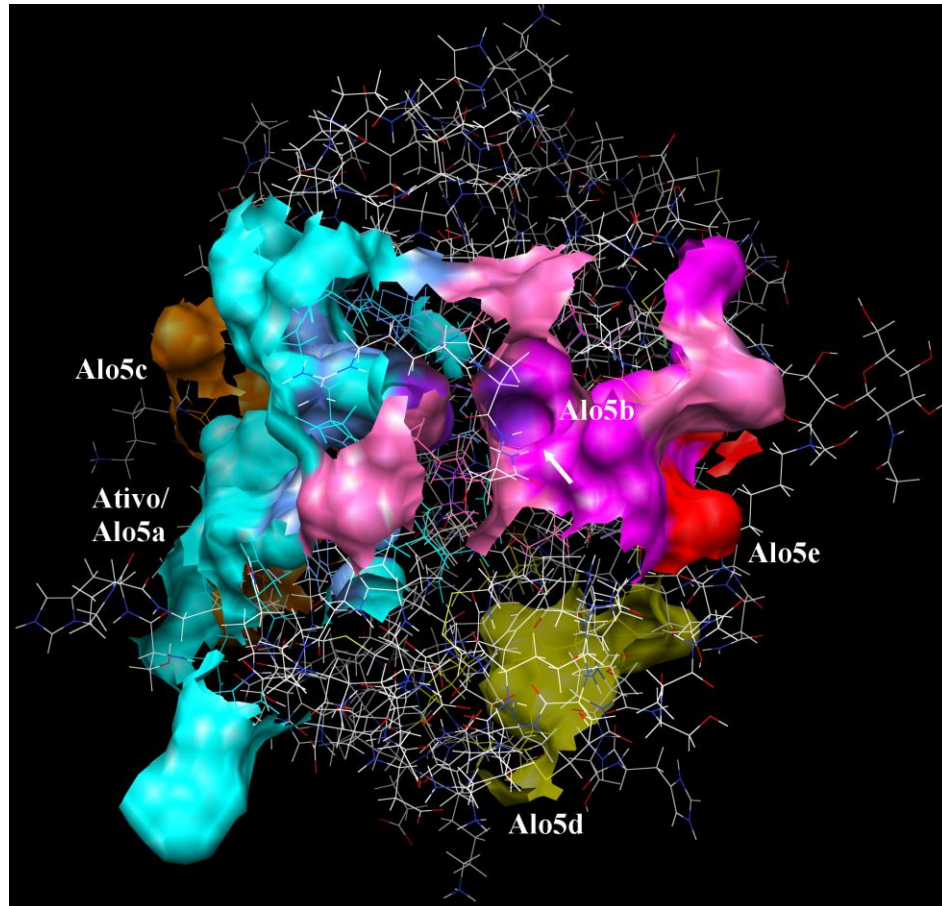


FIGURA 12: Sítio ativo e principais sítios candidatos a alostéricos da KLK5. A região em ciano indica os resíduos compartilhados entre o sítio ativo (em azul) e Alo5a. A região em roxo indica os resíduos compartilhados entre o sítio ativo e Alo5b, e a região violeta mais escura indica os resíduos compartilhados entre Alo5b e Alo5e. Note a proximidade topográfica da abertura (seta) do bolsão Alo5b com o fundo do sítio ativo/Alo5a.

Analogamente, na KLK7, Alo7a também apresenta alta correspondência ao subsítio S1 do sítio ativo. O bolso Alo7d compartilha os resíduos Asn189 e Gly220 com S1, e Alo7b e Alo7c compartilham entre si os resíduos Gly69 e Met117, cuja cadeia lateral separa os dois bolsões (FIG. 13).

É possível inferir, a partir dessas observações, os candidatos a alostéricos Alo5b e Alo5e são os mais próximos e mais prováveis de influenciar conformacionalmente a disposição dos resíduos no sítio ativo da KLK5, assim como Alo7d para com o a KLK7. Entender a estrutura e explorar a função de possíveis sítios de ligação a proteínas é a base para o projeto de novos fármacos. Em alguns casos, sabe-se que o local de um sítio, tanto para ligação direta ou alostérica de um ligante à proteína é desconhecido (Halgren, 2009).

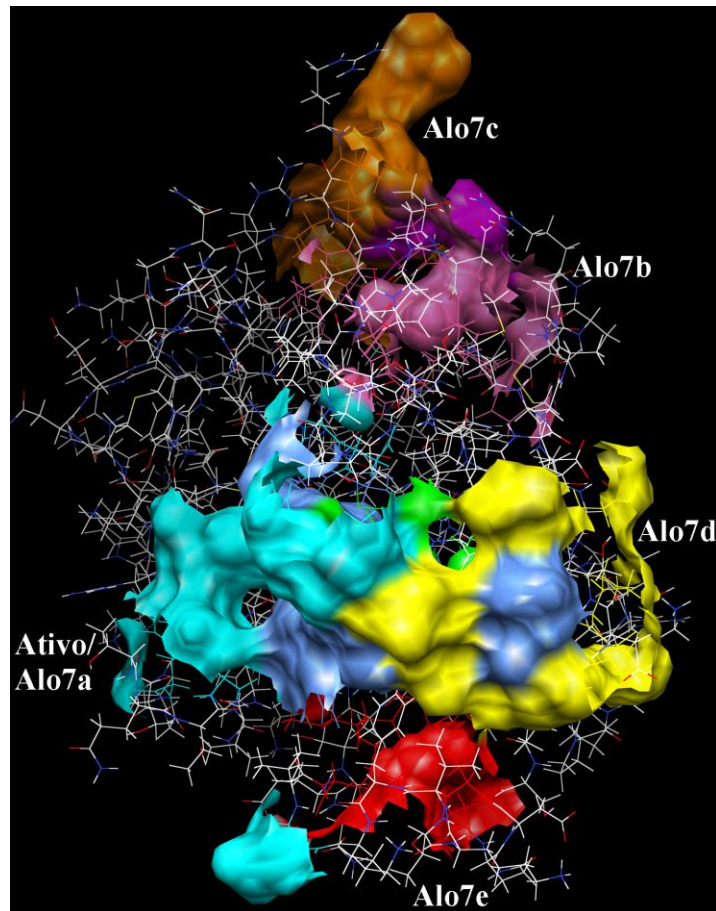


FIGURA 13: Sítio ativo e principais sítios candidatos a alostéricos da KLK7. A região em ciano indica os resíduos compartilhados entre o sítio ativo (em azul) e Alo7a. A região em verde indica os resíduos compartilhados entre o sítio ativo e Alo7d. A região em violeta mais escura indica os resíduos compartilhados entre Alo7b e Alo7c.

Os demais candidatos alostéricos não compartilham nenhum resíduo entre si ou com os sítios ativos da KLK5 ou KLK7.

4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS INIBIDORES POR AFINIDADE SEGUNDO O *DOCKING* MOLECULAR

Considerando os inibidores competitivos AM07-R, ES01-R e ES04, os resultados do docking mostraram a mesma ordem da potência observada nos testes *in vitro* com a KLK5 (TABELA 7). Porém, o mesmo não ocorre ao considerar alternativamente os compostos AM07-S e ES01-S, pela qual se observaria uma classificação diferente daquela dos testes cinéticos. Os compostos AM07-R, ES01-R e ES04 também apresentaram a mesma ordem de

afinidade pelo sítio ativo da KLK7 (TABELA 8) vista no sítio ativo da KLK5, embora as posições relativas entre si e os demais inibidores sejam diferentes para as duas enzimas.

TABELA 7: Contribuição dos principais termos de afinidade e de penalidade – exposição de resíduos hidrófobos – do *docking* molecular dos 25 compostos no sítio ativo da KLK5, ordenados pelo escore total individual – afinidade pelo sítio, em *kcal/mol*.

| Composto | Interação hidrofóbica | Ligação de hidrogênio | Interação eletrostática | Exposição de resíduos hidrófobos | Escore Total |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|---------------------|
| ES06 | -5,14 | -2,23 | -1,04 | 0,37 | -7,94 |
| AM09 | -5,11 | -1,57 | -0,97 | 0,61 | -6,80 |
| ES07 | -4,85 | -1,69 | -0,69 | 0,24 | -6,63 |
| AM07-R | -4,35 | -1,47 | -0,95 | 0,00 | -6,61 |
| AM14 | -5,10 | -1,79 | -0,82 | 0,84 | -6,34 |
| AM05 | -4,71 | -1,39 | -0,68 | 0,24 | -6,18 |
| AM03 | -4,46 | -1,38 | -0,80 | 0,09 | -6,14 |
| ES03 | -4,88 | -1,29 | -0,40 | 0,18 | -5,98 |
| AM10-S-S | -4,53 | -1,49 | -0,58 | 0,23 | -5,97 |
| ES05 | -3,97 | -1,82 | -0,84 | 0,24 | -5,93 |
| AM08 | -4,13 | -1,76 | -1,02 | 0,60 | -5,90 |
| AM06-S | -4,92 | -1,30 | -0,61 | 0,75 | -5,83 |
| AM02 | -3,52 | -1,61 | -0,86 | 0,11 | -5,76 |
| ES01-S | -3,91 | -1,61 | -0,72 | 0,36 | -5,57 |
| AM06-R | -4,99 | -1,38 | -0,64 | 1,24 | -5,51 |
| ES04 | -3,80 | -1,45 | -0,80 | 0,08 | -5,51 |
| AM10-R-S | -4,47 | -1,51 | -0,97 | 1,18 | -5,47 |
| AM10-R-R | -3,88 | -1,45 | -1,12 | 0,77 | -5,39 |
| ES10 | -5,40 | -0,52 | -0,23 | 0,34 | -5,37 |
| AM10-S-R | -4,62 | -1,29 | -0,81 | 1,10 | -5,31 |
| ES02 | -3,41 | -1,56 | -0,81 | 0,20 | -5,22 |
| ES01-R | -3,77 | -1,24 | -0,73 | 0,30 | -5,14 |
| ES08 | -5,17 | -1,05 | -0,50 | 0,26 | -5,07 |
| AM04 | -3,73 | -1,54 | -0,94 | 0,27 | -5,00 |
| AM07-S | -1,89 | -1,41 | -0,81 | 0,31 | -3,44 |

TABELA 8: Contribuição dos termos de afinidade e de penalidade – exposição de resíduos hidrófobos – do *docking* molecular dos 25 compostos no sítio ativo da KLK7, ordenados pelo escore total individual – afinidade pelo sítio, em *kcal/mol*.

| Composto | Interação hidrofóbica | Ligação de hidrogênio | Interação eletrostática | Exposição de resíduos hidrófobos | Escore total |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|---------------------|
| AM08 | -5,69 | -2,20 | -0,71 | 0,30 | -8,05 |
| AM10-S-R | -6,04 | -1,33 | -0,77 | 0,35 | -7,51 |
| AM10-R-R | -5,08 | -1,54 | -0,72 | 0,32 | -6,82 |
| AM14 | -5,94 | -1,63 | -0,84 | 0,41 | -6,81 |
| AM10-S-S | -5,51 | -1,46 | -0,47 | 0,54 | -6,81 |
| ES06 | -6,15 | -0,81 | -0,41 | 0,30 | -6,81 |
| AM06-R | -5,90 | -1,17 | -0,64 | 0,78 | -6,67 |
| AM09 | -4,26 | -1,66 | -0,96 | 0,05 | -6,48 |
| AM07-R | -4,81 | -1,40 | -0,59 | 0,15 | -6,32 |
| AM05 | -4,71 | -1,05 | -0,93 | 0,08 | -6,28 |
| ES05 | -5,39 | -0,89 | -0,30 | 0,07 | -6,24 |
| AM10-R-S | -5,99 | -0,49 | -0,23 | 0,20 | -6,22 |
| AM07-S | -4,83 | -1,26 | -0,45 | 0,00 | -6,19 |
| AM06-S | -4,96 | -1,42 | -0,71 | 0,66 | -6,18 |
| ES10 | -3,52 | -1,89 | -0,42 | 0,25 | -6,11 |
| AM04 | -4,42 | -1,30 | -0,67 | 0,03 | -6,01 |
| ES08 | -4,60 | -1,37 | -0,49 | 0,32 | -6,00 |
| ES07 | -4,73 | -1,20 | -0,42 | 0,17 | -5,91 |
| AM03 | -4,75 | -0,73 | -0,66 | 0,00 | -5,73 |
| ES02 | -4,01 | -1,66 | -0,65 | 0,22 | -5,67 |
| ES03 | -4,48 | -1,14 | -0,26 | 0,00 | -5,48 |
| AM02 | -3,89 | -1,56 | -0,51 | 0,13 | -5,47 |
| ES01-S | -4,11 | -0,98 | -0,31 | 0,00 | -5,09 |
| ES04 | -3,34 | -1,84 | -0,45 | 0,08 | -5,02 |
| ES01-R | -3,82 | -0,89 | -0,15 | 0,00 | -4,55 |

As posições gerais dos inibidores em ambas as docagens não foram as mesmas ou significativamente próximas daquelas nos testes cinéticos, tanto nos sítios ativos quanto em qualquer candidato alostérico de ambas as enzimas. Tal fato era de se esperar visto os possíveis diferentes sítios de inibição nas macromoléculas, como se infere dos diferentes mecanismos de inibição apresentados pelos compostos.

Porém podemos destacar, na KLK5, os compostos AM14, ES03, ES06 e ES07, e, na KLK7, AM14 e ES06, que ocupam posições superiores tanto para nas docagens nos sítios ativos quanto nos ensaios de inibição enzimática, em suas respectivas enzimas (TABELA 9).

TABELA 9: Posições relativas dos derivados isomanídeos no docking molecular nos sítios ativos e ensaios enzimáticos de inibição *in vitro* da KLK5 e KLK7.

| KLK5 | | KLK7 | |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| <i>In vitro</i> | <i>Docking</i> | <i>In vitro</i> | <i>Docking</i> |
| ES07 | ES06 | ES10 | AM08 |
| ES06 | AM09 | ES08 | AM10-S-R |
| ES10 | ES07 | ES03 | AM10-R-R |
| ES08 | AM07-R | ES07 | AM14 |
| AM14 | AM14 | AM14 | AM10-S-S |
| AM08 | AM05 | ES06 | ES06 |
| ES03 | AM03 | AM07 | AM06-R |
| AM10 | ES03 | AM08 | AM09 |
| AM04 | AM10-S-S | ES01 | AM07-R |
| AM05 | ES05 | AM09 | AM05 |
| AM03 | AM08 | ES04 | ES05 |
| AM09 | AM06-S | AM10 | AM10-R-S |
| AM06 | AM02 | ES05 | AM07-S |
| ES02 | ES01-S | AM03 | AM06-S |
| AM07 | AM06-R | ES02 | ES10 |
| ES04 | ES04 | AM06 | AM04 |
| ES05 | AM10-R-S | AM05 | ES08 |
| AM02 | AM10-R-R | AM04 | ES07 |

| | | | |
|------|----------|------|--------|
| ES01 | ES10 | AM02 | AM03 |
| - | AM10-S-R | - | ES02 |
| - | ES02 | - | ES03 |
| - | ES01-R | - | AM02 |
| - | ES08 | - | ES01-S |
| - | AM04 | - | ES04 |
| - | AM07-S | - | ES01-R |

Fonte: o ranking das colunas “*In vitro*” é cortesia do professor Luciano Puzer e equipe (UFABC).

TABELA 10: Resultados do *docking* molecular dos 25 compostos nos sítios ativo e alostéricos da KLK5, ordenados pelo escore total individual – afinidade pelo sítio, em *kcal/mol*.

| Ativo | Alo5a | Alo5b | Alo5c | Alo5d | Alo5e |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ES06 | ES03 | AM10-R-S | AM03 | AM08 | AM08 |
| -7,94 | -6,32 | -6,05 | -5,93 | -5,83 | -4,87 |
| AM09 | ES10 | ES08 | AM05 | AM06-R | AM10-R-S |
| -6,80 | -5,95 | -5,23 | -4,88 | -5,44 | -4,59 |
| ES07 | AM10-S-S | ES06 | AM02 | AM10-R-R | AM14 |
| -6,63 | -5,67 | -5,00 | -4,11 | -5,15 | -4,32 |
| AM07-R | ES07 | AM10-S-R | ES10 | AM03 | ES08 |
| -6,61 | -5,52 | -4,96 | -3,53 | -4,52 | -3,76 |
| AM14 | ES01-R | AM03 | AM09 | AM10-S-R | AM10-S-R |
| -6,34 | -5,49 | -4,88 | -3,49 | -4,47 | -3,66 |
| AM05 | ES08 | ES04 | AM10-S-S | AM05 | AM05 |
| -6,18 | -5,43 | -4,87 | -3,39 | -4,44 | -3,44 |

| | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| AM03 | ES06 | AM05 | AM07-S | AM06-S | AM10-R-R |
| -6,14 | -5,37 | -4,79 | -3,08 | -4,41 | -3,29 |
| ES03 | AM10-R-R | AM10-R-R | ES01-R | AM10-R-S | AM06-R |
| -5,98 | -5,25 | -4,78 | -2,71 | -4,20 | -3,23 |
| AM10-S-S | AM02 | ES05 | AM14 | AM07-R | ES10 |
| -5,97 | -5,25 | -4,59 | -2,35 | -4,20 | -3,17 |
| ES05 | AM10-S-R | AM02 | AM10-S-R | ES03 | ES05 |
| -5,93 | -5,07 | -4,55 | -2,33 | -4,19 | -3,01 |
| AM08 | AM10-R-S | AM08 | AM10-R-S | ES10 | AM06-S |
| -5,90 | -5,05 | -4,49 | -2,27 | -4,16 | -2,80 |
| AM06-S | ES02 | ES01-R | ES01-S | AM10-S-S | ES06 |
| -5,83 | -4,97 | -4,42 | -2,16 | -4,01 | -2,52 |
| AM02 | AM09 | AM04 | AM07-R | AM02 | AM07-R |
| -5,76 | -4,88 | -4,38 | -2,15 | -3,97 | -2,43 |
| ES01-S | AM08 | ES02 | AM10-R-R | AM09 | ES04 |
| -5,57 | -4,84 | -4,31 | -2,08 | -3,76 | -2,33 |
| AM06-R | ES04 | ES10 | AM08 | AM07-S | ES03 |
| -5,51 | -4,81 | -4,26 | -2,04 | -3,67 | -2,14 |
| ES04 | ES05 | AM07-R | AM06-S | ES04 | AM04 |
| -5,51 | -4,80 | -4,25 | -1,86 | -3,46 | -2,10 |
| AM10-R-S | AM06-R | ES07 | ES05 | ES05 | AM07-S |
| -5,47 | -4,62 | -4,21 | -1,83 | -3,40 | -2,00 |

| | | | | | |
|----------|--------|----------|--------|--------|----------|
| AM10-R-R | AM07-R | ES01-S | AM04 | AM04 | ES02 |
| -5,39 | -4,57 | -3,98 | -1,79 | -3,35 | -1,86 |
| ES10 | AM03 | AM10-S-S | ES06 | ES08 | ES01-S |
| -5,37 | -4,53 | -3,64 | -1,72 | -3,30 | -1,60 |
| AM10-S-R | AM06-S | AM06-S | ES04 | ES06 | AM03 |
| -5,31 | -4,52 | -3,21 | -1,54 | -3,27 | -1,24 |
| ES02 | ES01-S | AM09 | ES08 | AM14 | ES01-R |
| -5,22 | -4,33 | -2,43 | -1,43 | -2,99 | -1,10 |
| ES01-R | AM07-S | ES03 | ES02 | ES01-R | ES07 |
| -5,14 | -4,24 | -2,33 | -0,52 | -2,94 | -0,87 |
| ES08 | AM05 | AM06-R | ES07 | ES02 | AM10-S-S |
| -5,07 | -4,18 | -1,92 | -0,43 | -2,68 | -0,74 |
| AM04 | AM04 | AM14 | AM06-R | ES01-S | AM02 |
| -5,00 | -3,94 | -1,48 | -0,25 | -2,27 | -0,51 |
| AM07-S | AM14 | AM07-S | ES03 | ES07 | AM09 |
| -3,44 | -3,33 | -1,17 | -0,13 | -2,15 | -0,03 |

TABELA 11: Resultados do *docking* molecular dos 25 compostos nos sítios ativo e alostéricos da KLK7, ordenados pelo escore total individual – afinidade pelo sítio, em *kcal/mol*.

| Ativo | Alo7a | Alo7b | Alo7c | Alo7d | Alo7e |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| AM08 | AM10-R-R | AM10-R-R | AM08 | AM10-R-S | AM05 |
| -8,05 | -7,11 | -3,48 | -5,83 | -2,39 | -4,94 |
| AM10-S-R | AM10-S-S | AM06-S | AM06-R | AM14 | AM10-R-R |
| -7,51 | -7,07 | -3,20 | -5,44 | -2,29 | -4,81 |
| AM10-R-R | AM10-S-R | ES08 | AM10-R-R | ES04 | AM14 |
| -6,82 | -6,52 | -3,16 | -5,15 | -1,65 | -4,31 |
| AM14 | ES10 | ES01-S | AM10-R-S | ES08 | ES08 |
| -6,81 | -6,46 | -2,80 | -5,13 | -1,61 | -4,26 |
| AM10-S-S | AM10-R-S | AM08 | AM03 | AM10-S-S | AM07-R |
| -6,81 | -6,31 | -2,45 | -4,52 | -1,57 | -4,21 |
| ES06 | ES06 | AM10-R-S | AM10-S-R | AM08 | ES10 |
| -6,81 | -6,20 | -2,37 | -4,47 | -1,54 | -3,80 |
| AM06-R | AM06-R | AM10-S-R | AM05 | AM04 | AM08 |
| -6,67 | -6,17 | -2,08 | -4,44 | -1,52 | -3,65 |
| AM09 | AM06-S | AM09 | AM06-S | ES03 | ES03 |
| -6,48 | -6,15 | -1,55 | -4,41 | -1,47 | -3,64 |
| AM07-R | AM08 | ES05 | AM07-R | AM09 | ES05 |
| -6,32 | -6,13 | -1,53 | -4,20 | -1,35 | -3,56 |

| | | | | | |
|----------|--------|--------|----------|----------|----------|
| AM05 | ES07 | AM07-S | ES03 | AM06-R | AM03 |
| -6,28 | -5,98 | -1,31 | -4,19 | -1,24 | -3,49 |
| ES05 | AM09 | ES07 | ES10 | AM05 | AM07-S |
| -6,24 | -5,88 | -1,26 | -4,16 | -1,04 | -3,37 |
| AM10-R-S | AM07-S | AM04 | AM10-S-S | AM10-R-R | ES04 |
| -6,22 | -5,83 | -1,17 | -4,01 | -0,95 | -3,36 |
| AM07-S | ES03 | AM03 | AM02 | ES02 | AM09 |
| -6,19 | -5,80 | -0,96 | -3,97 | -0,92 | -3,22 |
| AM06-S | ES08 | ES01-R | AM09 | ES10 | AM04 |
| -6,18 | -5,36 | -0,91 | -3,76 | -0,88 | -3,21 |
| ES10 | AM03 | ES02 | AM07-S | AM02 | ES01-S |
| -6,11 | -5,27 | -0,85 | -3,67 | -0,86 | -3,07 |
| AM04 | ES04 | ES10 | ES04 | ES01-R | ES01-R |
| -6,01 | -5,23 | -0,72 | -3,46 | -0,80 | -2,61 |
| ES08 | AM02 | ES04 | ES05 | AM03 | AM06-R |
| -6,00 | -5,15 | -0,67 | -3,40 | -0,78 | -2,60 |
| ES07 | AM04 | AM02 | AM04 | AM10-S-R | AM02 |
| -5,91 | -5,05 | -0,64 | -3,35 | -0,53 | -2,52 |
| AM03 | ES02 | AM06-R | ES08 | ES05 | ES02 |
| -5,73 | -4,89 | -0,39 | -3,30 | -0,50 | -2,45 |
| ES02 | ES05 | AM07-R | ES06 | AM06-S | AM10-R-S |
| -5,67 | -4,84 | -0,18 | -3,27 | -0,29 | -2,29 |

| | | | | | |
|--------|--------|-------|--------|--------|----------|
| ES03 | AM07-R | AM05 | AM14 | ES01-S | ES06 |
| -5,48 | -4,78 | -0,02 | -2,99 | -0,11 | -2,22 |
| AM02 | AM05 | ES06 | ES01-R | ES06 | ES07 |
| -5,47 | -4,43 | 0,26 | -2,94 | 0,22 | -1,94 |
| ES01-S | ES01-R | ES03 | ES02 | ES07 | AM10-S-R |
| -5,09 | -4,31 | 0,32 | -2,68 | 0,79 | -1,72 |
| ES04 | ES01-S | - | ES01-S | AM07-S | AM06-S |
| -5,02 | -4,00 | | -2,27 | 1,26 | -1,42 |
| ES01-R | - | - | ES07 | AM07-R | AM10-S-S |
| -4,55 | | | -2,15 | 1,80 | -0,14 |

Os objetivos principais do método XP são eliminar falsos positivos e proporcionar uma melhor correlação entre as poses e os escores (Friesner & Murphy, 2006). As diversas conformações são gradualmente testadas no sentido de amenizar qualquer escore de penalidade, bem como otimizar as poses de melhor escore. Além disso, termos de penalidade são atribuídos a estruturas inadequadamente solvatadas (Schrödinger, 2012a). Esses termos advem de dados estatísticos parametrizados de um expressivo banco de dados de complexos cocristalizados (Halgren *et al.*, 2004).

Analisando a classificação por afinidade dos compostos nos sítios da KLK5, é observado que os inibidores não-competitivos AM04 (em Alo5b) e AM05 (em Alo5c) apresentaram melhor escore em seus sítios alostéricos que no sítio Alo5a. O composto ES04 também obteve melhor escore em Alo5b (-4,87), porém com uma diferença bastante pequena da obtida em Alo5a (-4,81).

A preferência de AM04 pelo bolsão Alo5b é bastante provável de estar relacionada ao seu tamanho, tanto ao volume quanto às áreas de superfície interna e de abertura. O valor da área de abertura de Alo5c é o maior para os bolsões da KLK5 (TABELA 6). O não compartilhamento de resíduos não impede necessariamente Alo5c de influenciar conformação tridimensional de Alo5a/S1. Estudos anteriores têm revelado uma tendência geral dos ligantes em se ligar às maiores cavidades das proteínas (Liang, Edelsbrunner & Woodward, 1998).

Porém, Alo5b é o único que apresenta mais de uma abertura, quatro no total. Os demais inibidores, competitivos, obtiveram melhor escore em Alo5a, dentre os sítios alostéricos. Apesar do menor tamanho relativo, a predileção desses inibidores por Alo5a reafirma suas maiores afinidades pela cavidade do sítio ativo.

Analogamente, na KLK7, apenas AM05 obteve melhor escore em um sítio alostérico diverso do Alo7a, o Alo7e, cujos valores de área de abertura são bem próximos. As seqüências de resíduos dos sítios Alo5a e Alo7a estão contidas na seqüência dos subsítios S1 de suas respectivas enzimas, podendo-se inferir que estão propensos a apresentarem escores altos como àqueles do sítio ativo. Porém, provavelmente devido aos quatro diferentes grupos de tríades escolhidas para o *grid* – Alo5a, Alo7a e sítios ativos de cada calicreína –, a classificação dos compostos foi diferente para as quatro docagens, como era de se esperar. As docagens nos bolsões Alo5a e Alo7a podem ser então consideradas como pontos de partida iniciais alternativos nos próprios sítios ativos, através dos quais os inibidores são capazes de adquirir poses de melhor escore diferentes daquelas obtidas ao se utilizar a tríade catalítica para o *grid*.

4.3 CONFORMAÇÃO, INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS E LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO DAS POSES DE MELHOR ESCORE

4.3.1 Conformação

A numeração de referência, de acordo com a IUPAC, que foi utilizada neste trabalho para os derivados isomanídeos, é indicada na FIG. 14.

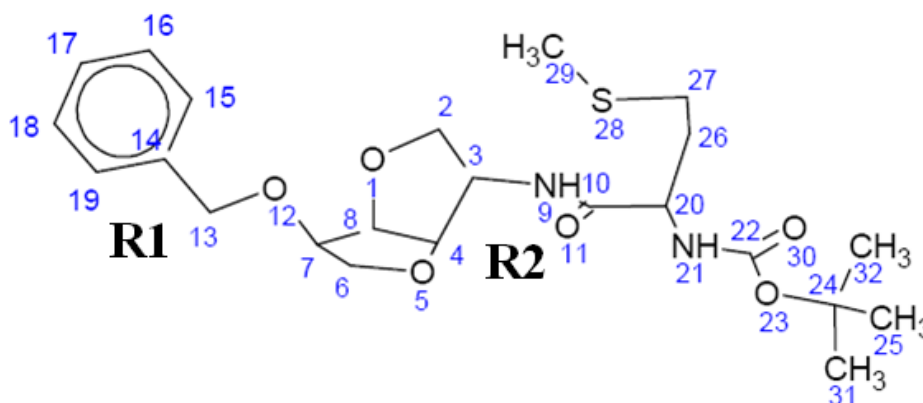


FIGURA 14: Numeração de referência dos átomos dos inibidores. Na imagem, o inibidor AM04. Atenção especial às posições invariantes dos átomos anel bicíclico (1 – 8) e do substituinte R1 (12 – 19) para qualquer um dos 25 compostos estudados.

As moléculas podem se apresentar em diferentes confôrmeros, por transpor as barreiras energéticas existentes entre os arranjos conformacionais (Bruice, 2004). Ao se submeterem as poses de melhor escore do docking dos sítios ativos da KLK5 e KLK7 aos cálculos DFT, novos confôrmeros, com energia minimizada por otimização da geometria foram obtidas.

A análise comparativa entre os ângulos diedros principais é mostrada na TABELA 14. O primeiro ângulo é formado iniciando a partir do carbono aromático de R1 até C7, passando por C13 e O12 (C – O – C – C_φ); o segundo é formado por C6, C7, C12 e C13 (C – C – O – C); o terceiro contém C4, C3, mais o primeiro e segundo átomo de R2, que variam para cada composto. Os demais ângulos diedros também são variáveis abrangendo cada ligação rotativa do esqueleto de R2. Ligações finais do tipo –CH₃, –NH₂ e –NH₃⁺, terminadas com hidrogênio, não foram consideradas porque sua variação conformacional é de pouco interesse (Friesner *et al.*, 2004).

Os ângulos diedros correspondentes nos confôrmeros DFT e nos confôrmeros dos sítios ativos com valores próximos são destacados em verde. O mesmo critério é seguido em relação aos ângulos diedros dos confôrmeros dos sítios alostéricos, utilizando-se a cor laranja. A tonalidade mais escura indica diferença menor que 25°, e a clara quando é maior que 25° e menor que 45°.

TABELA 14: Diedros comparados dos substituintes R1 e R2 dos compostos de menor energia obtidos do docking nos sítios ativo e alostéricos da KLK5 e confôrmeros DFT, em graus.

| AM04 | | | |
|---------------------------------|-------------|--------|-------------|
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo5b |
| R1 | | | |
| C – O – C – C _φ | 80,2 | -177,2 | -170,8 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C – C – O – C | 167,8 | 169,1 | -77,2 |
| C – C – N – C | -60,6 | 55,8 | -133,2 |
| R2 | | | |
| C – N – C = O | -2,8 | -1,8 | 10,5 |
| C – N – C – C | 177,2 | 176,8 | -168,4 |
| N – C – C – C | 60,0 | 163,9 | -173,1 |
| C – C – C – C | 62,5 | 71,1 | -62,0 |

| | | | |
|---------|--------|--------|--------|
| C-C-C-S | -52,4 | 53,1 | -161,6 |
| C-C-S-C | -73,5 | 59,4 | -61,0 |
| N-C-C-N | -59,0 | 36,9 | 62 |
| C-C-N-C | -174,5 | -151,0 | -87,2 |
| C-N-C-O | 160,9 | -167,0 | -179,7 |
| N-C-O-C | 178,8 | -178,1 | 149,0 |
| C-C-C-N | -178,2 | -163,5 | 63,6 |
| C-C-N-C | 65,5 | 82,1 | 144,7 |

AM05

| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo5c |
|---------------------------------|-------------|--------|-------------|
| R1 | | | |
| C-O-C-C _φ | 145,6 | 176,6 | -67,9 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C-C-O-C | 163,6 | 168,9 | 133,7 |
| C-C-N-C | -111,9 | -124,5 | -34,9 |
| R2 | | | |
| C-N-C=O | 3,3 | -3,8 | 23,3 |
| C-N-C-C | -175,6 | 176,7 | -157,8 |
| N-C-C-N | -58,8 | -64,3 | 112,5 |
| C-C-N-C | 74,4 | 73,2 | -120,9 |
| C-N-C-O | 179,0 | 179,5 | 4,4 |
| N-C-O-C | 150,7 | 177,9 | -115,7 |
| N-C-C-C | 71,3 | 65,1 | -126,6 |
| C-C-C-C | 47,0 | 50,1 | 86,0 |
| C-C-C=C | 75,8 | 62,7 | -21,5 |
| C-C-C-N | 177,8 | -180,0 | -151,0 |
| C-C-N-C | -56,4 | -57,2 | 118,6 |

AM07-R

| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo5a |
|---------------------------------|-------------|--------|-------------|
| R1 | | | |
| C-O-C-C _φ | -140,9 | -165,8 | 66,9 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C-C-O-C | -114,2 | -57,2 | 83,7 |

| | | | |
|---------------------------------|--------------------|------------|--------------------|
| C – C – N – C | -62,2 | 56,9 | -74,0 |
| R2 | | | |
| C – N – C = O | 6,3 | -6,5 | -23,4 |
| C – N – C – C | -173,9 | 174,1 | 149,2 |
| N – C – C – N | 53,3 | -72,9 | 50,5 |
| C – C – N – C | 46,7 | 81,9 | 58,6 |
| C – N – C – O | 177,3 | 172,6 | -2,5 |
| N – C – O – C | 179,5 | 175,1 | 159,8 |
| C – O – C – C | -101,9 | -86,1 | 92,0 |
| AM07-S | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo5d |
| R1 | | | |
| C – O – C – C _φ | 57,4 | 169,3 | -173,3 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C – C – O – C | 87,5 | 65,1 | 174,7 |
| C – C – N – C | -66,7 | -152,8 | 147,9 |
| R2 | | | |
| C – N – C = O | -19,7 | 4,7 | -0,9 |
| C – N – C – C | 160,0 | -175,4 | 177,9 |
| N – C – C – N | -40,3 | 72,7 | -58,5 |
| C – C – N – C | -48,2 | -91,3 | -55,7 |
| C – N – C – O | -144,5 | 8,6 | -176,6 |
| N – C – O – C | 176,5 | -179,9 | 139,1 |
| C – O – C – C | 103,7 | -99,0 | -75,0 |
| ES01-R | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo5a |
| R1 | | | |
| C – O – C – C _φ | 128,9 | 70,8 | 77,2 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C – C – O – C | 158,7 | 73,5 | 122,0 |
| C – C – O – C | 81,8 | 169,2 | 116,3 |
| R2 | | | |
| C – O – C = O | -154,8 | -4,0 | 135,7 |

| C-O-C-C | 31,2 | 178,6 | -41,8 |
|---------------------------------|--------------------|------------|--------------------|
| O-C-C-N | 51,6 | -134,6 | -173,1 |
| C-C-N-C | 45,5 | 53,1 | 48,8 |
| C-N-C-O | 177,1 | -178,0 | -99,1 |
| N-C-O-C | -176,4 | 179,3 | 152,9 |
| ES01-S | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo5a |
| R1 | | | |
| C-O-C-C _Φ | 76,9 | 97,0 | -173,5 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C-C-O-C | 161,6 | 159,1 | 172,9 |
| C-C-O-C | 110,1 | 179,2 | 125,9 |
| R2 | | | |
| C-O-C=O | -151,4 | 161,4 | 9,3 |
| C-O-C-C | 31,2 | -26,8 | -169,1 |
| O-C-C-N | 144,3 | 158,5 | -60,4 |
| C-C-N-C | -47,9 | -60,3 | -54,1 |
| C-N-C-O | 178,7 | 175,2 | -177,3 |
| N-C-O-C | 154,9 | 173,0 | -175,5 |
| ES04 | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo5b |
| R1 | | | |
| C-O-C-C _Φ | 88,3 | 67,3 | -166,1 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C-C-O-C | 175,2 | 178,6 | 74,1 |
| C-C-O-C | 157,9 | -171,4 | -178,3 |
| R2 | | | |
| C-O-C=O | -162,2 | -178,7 | -1,2 |
| C-O-C-C | 15,8 | 5,9 | 179,8 |
| O-C-C-N | 159,2 | 108,3 | -154,4 |
| C-C-N-C | 68,8 | -89,9 | -85,5 |
| C-N-C-O | 176,5 | 168,5 | 173,5 |
| N-C-O-C | -2,6 | -8,8 | -150,3 |

| | | | |
|---------------|--------|--------|--------|
| O – C – C – C | -72,1 | -131,3 | -31,7 |
| C – C – C – C | -64,3 | 178,7 | 128,4 |
| C – C – C – S | -164,9 | 175,4 | -80,9 |
| C – C – S – C | -63,1 | 69,6 | -175,4 |
| N – C – C – C | 63,6 | -63,2 | -107,0 |
| C – N – C – C | -62,0 | 150,4 | 147,7 |

TABELA 15: Diedros comparados dos substituintes R1 e R2 dos compostos de menor energia obtidos do docking nos sítios ativo e alostéricos da KLK7 e confôrmeros DFT.

| AM04 | | | |
|---------------------------------|-------------|--------|-------------|
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo7a |
| R1 | | | |
| C – O – C – C _φ | -65,6 | -73,3 | -140,8 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C – C – O – C | 167,0 | 154,8 | 36,1 |
| C – C – N – C | -101,1 | -125,1 | 98,1 |
| R2 | | | |
| C – N – C = O | 5,9 | -13,4 | -3,6 |
| C – N – C – C | -169,9 | 169,7 | 176,4 |
| N – C – C – C | 64,7 | 96,8 | -20,8 |
| C – C – C – C | 164,9 | 67,5 | -86,1 |
| C – C – C – S | 99,4 | -179,0 | 27,2 |
| C – C – S – C | 170,2 | 78,5 | 174,8 |
| N – C – C – N | -58,5 | -25,5 | -139,8 |
| C – C – N – C | -69,4 | -76,3 | -92,4 |
| C – N – C – O | -162,2 | 18,8 | 173,9 |
| N – C – O – C | 89,7 | 178,6 | -15,7 |
| C – C – C – N | -68,7 | -168,1 | 33,2 |
| C – C – N – C | 167,9 | 160,5 | 147,6 |
| AM05 | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo7e |
| R1 | | | |
| C – O – C – C _φ | 113,5 | 67,2 | -114,6 |

| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
|---------------------------------|-------------|--------|-------------|
| C – C – O – C | -66,9 | -179,9 | 175,5 |
| C – C – N – C | 59,8 | -145,5 | -166,5 |
| R2 | | | |
| C – N – C = O | -0,8 | -3,1 | -3,3 |
| C – N – C – C | -179,4 | 175,3 | 175,5 |
| N – C – C – N | 73,7 | 161,1 | 146,9 |
| C – C – N – C | 39,9 | -65,6 | -163,4 |
| C – N – C – O | 176,3 | -18,1 | -2,7 |
| N – C – O – C | -158,2 | 178,9 | -178,7 |
| N – C – C – C | -155,3 | -75,7 | -95,2 |
| C – C – C – C | -58,0 | -67,5 | 80,5 |
| C – C – C = C | -75,9 | -91,9 | -94,8 |
| C – C – C – N | 75,2 | 56,8 | -162,5 |
| C – C – N – C | -93,3 | 169,7 | 77,2 |
| AM07-R | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo7a |
| R1 | | | |
| C – O – C – C _φ | -67,4 | 67,1 | -176,9 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C – C – O – C | 171,7 | 62,4 | 76,9 |
| C – C – N – C | -57,0 | -128,8 | -79,2 |
| R2 | | | |
| C – N – C = O | 5,3 | -7,5 | -2,3 |
| C – N – C – C | -172,3 | 173,0 | 179,2 |
| N – C – C – N | -127,9 | -73,0 | -138,2 |
| C – C – N – C | 56,0 | 81,3 | 52,7 |
| C – N – C – O | 175,0 | 172,6 | -176,1 |
| N – C – O – C | -96,2 | 178,7 | 141,8 |
| C – O – C – C | 172,0 | -171,1 | -102,0 |
| AM07-S | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo7a |
| R1 | | | |

| | | | |
|---------------------------------|--------------------|------------|--------------------|
| C – O – C – C _φ | 170,0 | -169,5 | -73,6 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C – C – O – C | 158,2 | 70,1 | 107,1 |
| C – C – N – C | -62,8 | -136,8 | -162,7 |
| R2 | | | |
| C – N – C = O | 3,3 | 4,5 | -3,1 |
| C – N – C – C | -177,0 | -176,2 | 174,7 |
| N – C – C – N | 169,8 | 73,2 | 150,8 |
| C – C – N – C | -74,5 | -82,6 | -58,9 |
| C – N – C – O | -175,7 | -171,8 | 163,9 |
| N – C – O – C | 153,7 | -176,2 | -164,6 |
| C – O – C – C | 92,2 | 86,2 | 80,8 |
| ES01-R | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo7a |
| R1 | | | |
| C – O – C – C _φ | -154,7 | -177,2 | -104,0 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C – C – O – C | 172,3 | 163,9 | 85,3 |
| C – C – O – C | -171,0 | 167,2 | -85,9 |
| R2 | | | |
| C – O – C = O | -9,6 | 5,7 | -6,3 |
| C – O – C – C | 168,9 | -177,1 | 176,3 |
| O – C – C – N | 59,1 | 27,7 | 67,3 |
| C – C – N – C | 59,8 | 60,7 | 48,8 |
| C – N – C – O | 174,7 | -174,7 | 139,6 |
| N – C – O – C | -164,7 | 177,6 | -136,9 |
| ES01-S | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo7a |
| R1 | | | |
| C – O – C – C _φ | -149,0 | -175,2 | 95,3 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C – C – O – C | 170,7 | 167,1 | 66,7 |
| C – C – O – C | -81,2 | 165,9 | -178,6 |

| R2 | | | |
|---------------------------------|-------------|--------|-------------|
| C-O-C=O | -41,9 | 1,9 | 12,1 |
| C-O-C-C | 139,9 | 179,1 | -164,9 |
| O-C-C-N | 92,1 | 157,5 | 122,5 |
| C-C-N-C | -72,7 | -68,1 | -49,1 |
| C-N-C-O | 176,0 | 177,0 | 4,8 |
| N-C-O-C | 152,6 | -179,3 | 133,2 |
| ES04 | | | |
| Torção | Sítio ativo | DFT | Sítio Alo7a |
| R1 | | | |
| C-O-C-C _φ | -175,1 | 170,2 | -140,7 |
| Com mais de um átomo no biciclo | | | |
| C-C-O-C | 79,9 | -176,0 | 169,7 |
| C-C-O-C | 177,1 | 168,2 | -171,4 |
| R2 | | | |
| C-O-C=O | 0,9 | -0,2 | 2,4 |
| C-O-C-C | -178,6 | 179,1 | -176,7 |
| O-C-C-N | 153,3 | 177,9 | 145,6 |
| C-C-N-C | -116,4 | -151,1 | -118,2 |
| C-N-C-O | 0,9 | -9,8 | 0,4 |
| N-C-O-C | -160,6 | -179,3 | -123,6 |
| O-C-C-C | -86,6 | -57,1 | -94,6 |
| C-C-C-C | 69,5 | -58,3 | 65,5 |
| C-C-C-S | 168,3 | 179,1 | 167,8 |
| C-C-S-C | 61,6 | -67,5 | -78,3 |
| N-C-C-C | -169,3 | 63,2 | -174,4 |
| C-N-C-C | 121,2 | 85,0 | 119,3 |

Nota-se que, as poses obtidas do docking na KLK5 apenas os compostos AM07-S e ES01-R mostraram certa correspondência maior entre os ângulos diedros das poses dos sítios alostéricos e os confôrmeros DFT. Na KLK7, a mesma correspondência é observada para AM07-R e AM05, sendo bastante evidente neste. Os demais compostos possuem a maioria

dos valores de seus diedros avaliados mais próximos entre os confôrmeros DFT e as poses do sítio ativo das respectivas enzimas.

Observa-se que a análise da variação das conformações segundo os ângulos de torção não pode contribuir claramente para uma padronização das afinidades dos isomanídeos. A grande liberdade conformacional das moléculas de ambas as séries estudadas é atribuída essencialmente ao grande número de ligações giratórias de R2, apesar de R1 também ter apresentado direção variável em torno de seu maior eixo.

4.3.2 Ligações de hidrogênio

4.3.2.1 Sítios ativos

A lista completa das ligações de hidrogênio realizadas entre as poses finais de melhor escore de cada composto docado nos sítios ativos da KLK5 e KLK7 é apresentada na TABELA 16.

Na KLK5, a His57 faz ligações de hidrogênio com o O5 de AM04, AM05, AM07-R e AM07-S, e com o primeiro O carbonílico de R2 na AM04. Na KLK7, faz ligações com O1 e o oxigênio de R1, dos compostos AM04 e AM07-R. Observa-se que o resíduo não faz ligações com os ésteres nos sítios ativos das enzimas.

A His41 faz ligações na KLK7 com o hidrogênio ligado ao primeiro nitrogênio, ou seja, de menor número, do substituinte R2 do composto AM04, AM07-R e AM07-S.

A His99 faz apenas uma ligação de hidrogênio, com o segundo oxigênio carbonílico de R2 da AM05 no sítio da KLK7.

A Ser195 faz ligações de hidrogênio na KLK5, com O1 da AM05 e com O5 da AM04, AM05, AM07-R, AM07-S e ES01-S, e também na KLK7 com o nitrogênio de R2 do ES04.

A Gly193 também faz ligações na KLK5, com o primeiro oxigênio carbonílico de R2 nos compostos AM05, AM07-S, ES01-R e ES01-S; na KLK7 faz uma ligação, sendo esta com o segundo oxigênio carbonílico de R2 no ES04.

A Gln97 faz ligação na KLK7 com o hidrogênio ligado ao nitrogênio indólico da AM05, e, concluindo os resíduos comuns, a Lys60, na KLK5, com o segundo oxigênio carbonílico de R2, na AM04.

Exclusiva da KLK7, A Asn192 faz ligações de hidrogênio com os oxigênios do anel bicíclico ou com átomos de R2. Enquanto que a Gln192, própria da KLK5 participa de

ligações exclusivamente envolvendo o oxigênio de R1 dos compostos AM04, AM07-R, ES01-R, ES01-S e ES04, não sendo, portanto, encontradas na AM05 e AM07-S.

Na KLK5, as poses que apresentam maior número de ligações de hidrogênio no sítio ativo são a amida AM07-R e o éster ES01-S (3 ligações cada), e na KLK7 é a AM04, com 4 ligações.

TABELA 16: Comparação das ligações de hidrogênio entre os confôrmeros docados nos sítios ativos da KLK5 e KLK7.

| | Inibidor | Enzima | |
|--------|--|---|------|
| AM04 | R2: $(2^{\circ})\text{C}=\text{O}---$ | Lys60 ($---\text{HN}\zeta$) | KLK5 |
| | O5---/ R2: $(1^{\circ})\text{C}=\text{O}---$ | His57 ($---\text{HN}\epsilon$) | |
| | O5--- | Ser195 ($---\text{HO}$) | |
| | R1: Osp^3--- | Gln192 ($---\text{HN}\epsilon$) | KLK7 |
| | R1: Osp^3--- / O1--- | His57 ($---\text{HN}\epsilon$) | |
| | O5--- | Asn192 ($---\text{HN}\delta$) | |
| | R2: $(1^{\circ})\text{NH}---$ | His41 ($---\text{O}=\text{C}$) | |
| AM05 | O5--- | His57 ($---\text{HN}\epsilon$)/ Ser195 ($---\text{HO}$) | KLK5 |
| | R2: $(1^{\circ})\text{C}=\text{O}---$ | Gly193 ($---\text{HN}$) | |
| | R2: $(2^{\circ})\text{C}=\text{O}---$ | His99 ($---\text{HN}\epsilon$) | KLK7 |
| | R2: $\text{NH}(\text{indólicico})---$ | Gln97 ($---\text{O}=\text{C}-$) | |
| AM07-R | O5--- | His57 ($---\text{HN}\epsilon$)/ Ser195 ($---\text{HO}$) | KLK5 |
| | R1: Osp^3--- | Gln192 ($---\text{HN}\epsilon$) | |
| | R1: Osp^3--- / O1--- | His57 ($---\text{HN}\epsilon$) | KLK7 |
| | O5--- | Asn192 ($---\text{HN}\delta$) | |
| | R2: $(1^{\circ})\text{NH}---$ | His41 ($---\text{O}=\text{C}$) | |
| AM07-S | O5--- | His57 ($---\text{HN}\epsilon$)/ Ser195 ($---\text{HO}$) | KLK5 |
| | R2: $(1^{\circ})\text{C}=\text{O}---$ | Gly193 ($---\text{HN}$) | |
| | R2: $(1^{\circ})\text{NH}---$ | His41 ($---\text{O}=\text{C}$) | KLK7 |
| | R2: $(1^{\circ})\text{C}=\text{O}---$ | Asn192 ($---\text{HN}\delta$) | |
| ES01-R | R1: Osp^3--- | Gln192 ($---\text{HN}\epsilon$) | KLK5 |
| | R2: $(1^{\circ})\text{C}=\text{O}---$ | Gly193 ($---\text{HN}$) | |
| | O5--- | Asn192 ($---\text{HN}\delta$) | KLK7 |

| | | | |
|--------|--|-----------------|------|
| | O1--- | Gly216 (---HN) | |
| | R1: Osp ³ --- | Gln192 (---HNε) | |
| | O5--- | Ser195 (---HO) | KLK5 |
| ES01-S | R2: ^(1°) C=O--- | Gly193 (---HN) | |
| | O5--- | Gly216 (---HN) | |
| | O1--- | Asn192 (---HNδ) | KLK7 |
| | R1: Osp ³ --- | Gln192 (---HNε) | KLK5 |
| | R2: NH--- | Ser195 (---OH) | |
| ES04 | R2: ^(2°) C=O--- | Gly193 (---HN) | KLK7 |
| | R2: ^(2°) Osp ³ --- | Asn192 (---HNδ) | |

^(1°) e ^(2°): evita ambigüidade no caso de haver dois grupos semelhantes no mesmo substituinte; ^(1°) para o átomo/grupo na cadeia mais próximo do biciclo e ^(2°) para o mais distante.

4.3.2.2 Sítios alostéricos

A lista completa das ligações de hidrogênio realizadas entre as poses finais de melhor escore de cada composto nos respectivos sítios alostéricos da KLK5 e KLK7 é apresentada na TABELA 17.

Como mencionando anteriormente em nossos resultados, os compostos AM04, AM05 e ES04, docados na KLK5, apresentaram melhor escore em sítios diversos do Alo5a, que possui alta correspondência de resíduos com S1 do sítio ativo da enzima. Foram encontrados diferentes resíduos realizando ligações de hidrogênio com os inibidores dentro desses sítios alostéricos, as quais estarão incluídas na descrição completa a seguir.

A pose de AM04 (Alo5b) faz ligações com um resíduo próprio da KLK5, a Gln174A (Debela, *et al.*, 2007), sendo uma através do oxigênio de R1 e a outra através do átomo de enxofre de R2, e ainda com a His99 e a Gln192, os três resíduos pertencentes aos subsítios S4, S2 e S1, respectivamente.

O éster ES04 cujo melhor escore também foi no bolsão Alo5b, faz ligação de hidrogênio com Gln192 e Gly216. Apesar de não estarem no sitio ativo ou Alo5a, destacamos novamente a presença da Gln192 ao estabilizar esses compostos.

Similarmente, na KLK7, a AM05 (Alo7e) faz ligação de hidrogênio com a Asn178 e com a Met180. Na KLK5 forma ligações com a Gly85 e a Phe63, ambos resíduos do fundo do sítio.

TABELA 17: Comparação das ligações de hidrogênio entre os confôrmeros docados nos respectivos sítios alostéricos de maior afinidade da KLK5 e KLK7.

| | Inibidor | Enzima | |
|--|----------------------------|--------------------------------|--------------|
| AM04 | R1: Osp ³ --- | Gln192 (---HNε) | KLK5 (Alo5b) |
| | R2: ^(2°) NH--- | Gln174A (---O=C) | |
| | R2: Osp ³ --- | His99 (---HNε) | |
| | R2: S--- | Gln174A (---HNε) | |
| | R2: ^(2°) C=O--- | His99 (---HNε) | KLK7 (Alo7a) |
| AM05 | R2: ^(1°) NH--- | Gly85 (---O=C) | KLK5 (Alo5c) |
| | R2: NH(indólico)--- | Phe63 (---O=C) | |
| | R2: ^(1°) C=O--- | Asn178 (---HNδ) | KLK7 (Alo7e) |
| | R2: NH(indólico)--- | Met180 (---O=C) | |
| AM07-R | O5--- | His57 (---HNε)/ Ser195 (---HO) | KLK5 (Alo5a) |
| | R2: ^(1°) C=O--- | Gly193 (---HN) | |
| | R2: ^(2°) C=O--- | Asn192 (---HNδ) | KLK7 (Alo7a) |
| AM07-S | R1: Osp ³ --- | Gln192 (---HNε) | KLK5 (Alo5a) |
| | R2: ^(1°) NH--- | Gly216 (---O=C) | |
| | O1--- | Gly216 (---HN) | KLK7 (Alo7a) |
| | R2: Osp ³ --- | His99 (---HNε) | |
| ES01-R | R1: Osp ³ --- | Gln192 (---HNε) | KLK5 (Alo5a) |
| | O5--- | His57 (---HNε)/ Ser195 (---HO) | |
| | R2: ^(2°) C=O--- | Cys42 (---HN) | |
| | - | - | |
| ES01-S | R1: Osp ³ --- | Gln192 (---HNε) | KLK5 (Alo5a) |
| | - | - | KLK7 (Alo7a) |
| ES04 | R1: Osp ³ --- | Gln192 (---HNε) | KLK5 (Alo5b) |
| | R2: NH--- | Gly216 (---O=C) | |
| | O1--- | Gly216 (---HN) | KLK7 (Alo7a) |
| | R2: NH--- | Ser195 (---OH) | |
| | R2: ^(2°) C=O--- | Gly193 (---HN) | |
| R2: ^(2°) Osp ³ --- | Asn192 (---HNδ) | | |

^(1°) e ^(2°): evita ambigüidade no caso de haver dois grupos semelhantes no mesmo substituinte; ^(1°) para o átomo/grupo na cadeia mais próximo do biciclo e ^(2°) para o mais distante.

As demais poses de melhor escore estão nos sítios alostéricos Alo5a ou Alo7a, cuja descrição vem a seguir.

A Gln192 (KLK5) faz mais três ligações, com AM07-S, ES01-R e ES01-S. A Asn192 (KLK7) realiza ligação com o segundo oxigênio carbonílico da AM07-R e com o segundo oxigênio sp^3 do ES04. A Gly216 forma ligações de hidrogênio com a AM07-S em Alo5a e Alo7a, e com ES04 em Alo7a. A His99, na KLK7, faz ligação com o oxigênio sp^3 de R2 da AM07-S. Há formação de ligações entre a His57, na KLK5, com o átomo O5 do AM07-R e ES01. A Ser195 realiza ligação com AM07-R, ES01-R, ES04. A Gly193 realiza ligações de hidrogênio com o primeiro O carbonílico de R2 da AM07-R (Alo5a) e com o segundo da ES04 (Alo7a). A Cys42 da KLK5 faz ligação com o segundo oxigênio carbonílico de R2 do composto ES01-R.

4.3.3 Interações hidrofóbicas

Além das ligações de hidrogênio, as demais interações polares e também apolares foram analisadas, pela qual caráter hidrofílico ou hidrofóbico das partes da superfície dos receptores – aquelas próximas ao ligante – foi discriminando. As mesmas regiões foram também observadas através da interface do programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004), corroborando com os resultados.

Como esperado, a interação hidrofóbica é a que mais contribui para a energia de afinidade (TABELAS 7 e 8), seguida da ligação de hidrogênio e enfim pela interação eletrostática, para as 25 moléculas em ambas as enzimas (TABELAS 18 e 19).

TABELA 18: Regiões hidrofóbicas que mais interagem com os inibidores, segundo os resultados do *docking* molecular – sítio ativo

| Composto | KLK5 | | KLK7 | |
|----------|--|--|--|--|
| | Região do composto | Resíduos | Região do composto | Resíduos |
| AM04 | - Bilateralmente ao anel aromático de R1 | - Cys191, Val213, Trp215, | - Entorno de todo o anel aromático de R1 | - Ala190, Cys191, Trp215, |
| | - Ao nível da bifurcação do substituinte R2 | Cys220, Tyr228 - Cys42, Cys58 | - Ao nível da bifurcação do substituinte R2 - Próximo ao Boc | Phe218, Cys220 - Leu40 - Leu73, Phe151 |
| AM05 | - Bilateralmente ao anel aromático de R1 | - Cys191, Val213, Trp215, | - Em torno da parte carbônica de R1 e do biciclo - Extremidade do anel indólico. | - Ala190, Cys191, Trp215, |
| | - Ao nível da bifurcação do substituinte R2 | Cys220, Tyr228 - Cys42, Cys58 | | Phe218 |
| | - Grande região em torno da parte carbônica do anel indólico. | - Val149, Phe151, Cys191 | | - Leu175, Trp215 |
| AM07-R | - Bilateralmente ao anel aromático de R1 | - Cys191, Val213, Trp215, | - Entorno de todo o anel aromático de R1 | - Ala190, Cys191, Trp215, |
| | - Próximo ao heterociclo de R2 | Cys220, Tyr228 | - Em R2, próximo ao anel aromático | Cys220 - Leu40, Phe151 |
| | - Unilateralmente ao anel aromático de R2 | - Cys42, Cys58 - Val149, Phe151 | | |
| AM07-S | - Entre o segundo nitrogênio e terceiro | - Cys42, Cys58 | - Unilateralmente ao anel aromático de R1 | - Leu40, Phe151 |

| | | | | |
|---------------|--|--|--|--|
| | oxigênio de R2. - Pouco próxima ao heterociclo de R2. | - Cys191, Tyr218, Cys220 | - Região carbônica do biciclo, na qual se liga R2. - Entorno de todo o anel aromático de R2. | - Leu40 - Ala190, Cys191, Trp215, Cys220 |
| ES01-R | - Bilateralmente ao anel aromático de R1 - Em torno do heterociclo de R2 - Pouco próximo ao terminal Boc. | - Cys191, Val213, Trp215, Cys220, Tyr228 - Cys42, Cys58, Tyr41 - Leu40, Tyr41 | - Próximo ao anel aromático de R1. - Em torno da região do biciclo voltada a R2 e parte de R2 até seu grupamento éster, inclusive. | - Leu175, Trp215 - Cys191, Trp215, Cys220 |
| ES01-S | - Bilateralmente ao anel aromático de R1 - Em torno do heterociclo de R2 - Pouco próximo ao terminal Boc. | - Cys191, Val213, Trp215, Cys220 - Cys42, Cys58, Tyr41 - Leu40, Tyr41, Phe151 | - Em torno da região do biciclo voltada a R2 e parte de R2 até seu heterociclo, inclusive - Próxima ao terminal Boc. | - Trp215, Phe218 - Leu175, Trp215 |
| ES04 | - Bilateralmente ao anel aromático de R1 - Próxima à ramificação de R2 contendo o átomo de enxofre - Em torno do terminal Boc. | - Cys191, Val213, Trp215, Cys220 - Cys42, Cys58 - Leu40, Tyr41 | - Em torno da região do biciclo voltada a R2 e parte de R2 até seu grupamento éster, inclusive. - Pouco próximo ao: anel aromático de R1 - terminal Boc. | - Trp215, Phe218 - Val100, Trp215 - Phe151 |

(1) Apenas os resíduos apolares e anel da tirosina em distância de interação. (2) Boc: di-terc-butil-dicarbonato

TABELA 19: Regiões hidrofóbicas que mais interagem com os inibidores, segundo os resultados do *docking* molecular – sítios alostéricos

| Composto | KLK5 | | KLK7 | |
|----------|---|--|---|--|
| | Região do composto | Resíduos | Região do composto | Resíduos |
| AM04 | - Próxima ao anel aromático de R1 - Ligeiramente anterior à bifurcação do substituinte R2 | - Trp215, Cys191, Val213 Cys220 - Tyr172 | - Entorno de todo o anel aromático de R1 - Próximo ao Boc e metil terminal da ramificação com enxofre | - Ala190, Cys191, Val213, Trp215, Cys220 - Leu175, Trp215 |
| AM05 | - Próxima ao anel indólico. | - Val62 | - À extremidade carbônica do anel indólico | - Pro132, Ile163, Pro165 |
| AM07-R | - Próxima à parte carbônica do heterociclo de R2. - Em torno do grupo benzil de R2. | - Cys42, Cys58 - Val149, Phe151 | - Em torno do grupo benzil de R2. | - Ala190, Cys191, Val213, Trp215, Cys220 |
| AM07-S | - Pouco próxima ao anel aromático de R1. | - Cys191, Cys220, Val213 | - Em torno de R1 e parte carbônica no biciclo, de onde se ramifica. - Bilateralmente ao anel aromático de R2 | - Ala190, Cys191, Val213, Trp215, Cys220, Phe218 - Leu175, Trp215 |
| ES01-R | - Unilateralmente próximo ao anel aromático de R1. - Próxima à parte carbônica do heterociclo de R2. | - Cys191, Val213 , Cys220, Trp225 - Cys42, Cys58 | - Em torno de R1 e parte carbônica no biciclo, de onde se ramifica - Próximo ao terminal Boc. | - Ala190, Cys191, Val213, Trp215, Cys220, Phe218 - Leu175, Trp215 |

| | | | | |
|--------|--|--|--|---|
| | - Próxima à um dos grupos metil da extremidade Boc. | - Leu40, Tyr41 | | |
| ES01-S | - Próxima ao anel aromático de R1. - Grande região em torno do terminal Boc. | - Cys191, Val213, Trp215, Cys220 - Val149, Phe151 | - De parte do grupo éster ao oxigênio anterior ao terminal Boc, passando pelo heterociclo de R2. | - Cys191, Phe218, Cys220 |
| ES04 | - Próxima ao anel aromático de R1 - Em torno de um dos grupos metil terminais do Boc. | - Trp215, Cys191, Cys220 - Trp215 | - Próxima ao anel aromático de R1 - Em torno da região do biciclo voltada a R2 e parte de R2 até seu grupamento éster, inclusive. | - Leu175, Trp215 - Cys191, Phe218, Cys220 |

4.3.4 Interações intermoleculares, *docking* score e mecanismos inibitórios relacionados

4.3.4.1 Gly193 e Ser195

A maior frequência de ligações de hidrogênio entre os inibidores e os resíduos Gly193 e Ser195 no sítio ativo da KLK5 em relação ao da KLK7 pode ser fator predisponente da maior frequência de inibição competitiva encontrada para aquela enzima. Porém não é observada relação entre essas ligações exclusividade para os compostos competitivos. As ligações canônicas simultâneas com os grupos amina da Ser195 e Gly193 na fenda do oxianion (Nelson & Cox, 2008) não foi observada, visto que a estabilização dos inibidores pela serina se dá através de sua hidroxila. Nota-se que AM04 e AM07-R não apresentam ligação de hidrogênio com a Gly193, e ES01-R com a Ser195.

Interessantemente nota-se que AM07-R é o único composto na KLK5 a apresentar ligações simultâneas com os dois resíduos no sítio Alo5a (além da His57), reforçando seu alto score relativo e, logo, seu caráter competitivo com o substrato (FIG. 15).

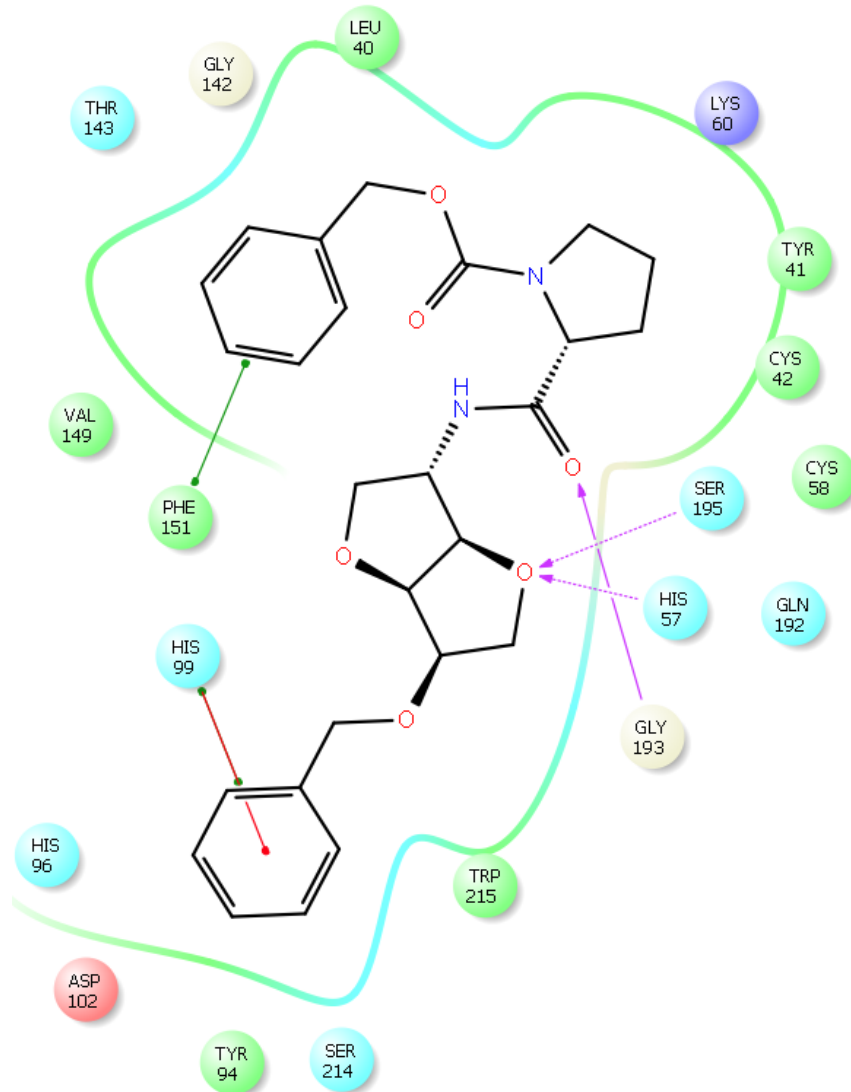


FIGURA 15: Diagrama das forças intermoleculares de AM07-R em Alo5a. As setas lilás indicam as ligações de hidrogênio. As linhas conectivas evidenciam interações do tipo π -aromático (verdes) e π -cátion (vermelha).

4.3.4.2 His57 e Asp102

Estudos que elucidam os mecanismos de inibição por Zn^{+2} , do tipo não-competitivos, demonstram que o cátion faz uso da His57 como um terceiro sítio de coordenação (em solução, com ou sem substrato presente nela). A His99 e a His96 (esta presente apenas na KLK5) geram um sítio de ligação ao Zn^{+2} que atrai a cadeia lateral da His57, que gira para fora da tríade, para uma máxima estabilização (base estrutural da inibição não-competitiva), o que não impede a “entrada” do peptídeo, mas prejudica sua hidrólise catalítica (Debela, *et al.*, 2007). Essa conformação pode representar o estado inibido reversível não-competitivo, onde a ligação (porém sem clivagem) do substrato ainda é possível contanto que as cadeias laterais P2 não sejam tão grandes e o sítio S2 continue acessível (Goettig *et al.*, 2010). Além disso, a

His99, comum a ambas as enzimas, possui uma cadeia lateral móvel, contribuindo para uma fenda S2 de tamanho adaptável (Debela *et al.*, 2007).

Ambas as serino-proteases apresentaram uma ação ótima em pH neutro *in vitro* quando testadas com substratos sintéticos. Porém, sua ação combinada permitiu a degradação em pH 5,6 da corneodesmosina, desmocolina 1 e desmogleína 1. A incubação com KLK5 em um pH 5,6 não induziu a degradação das principais proteínas do extrato epidérmico, exceto a corneodesmosina e desmogleína 1, que é clivada apenas em ambiente ácido. Também se sabe que a KLK7 induz a degradação completa de corneodesmosina e desmocolina1 em pH ácido, mas não da desmogleína 1 (Caubet *et al.*, 2004). KLK5 e KLK7 tornaram-se adaptadas para reter a atividade dentro do espaço ácido intercelular do estrato córneo, o que justifica a escolha do pH ácido durante a simulação computacional em nossos cálculos.

A partir dessas informações, podemos discutir que o fato de a His57 estar em estado protonado no meio ácido da epiderme (pH ~5,5) (Debela, *et al.*, 2007), que foi simulado em nossos cálculos, torna inviável a formação do o íon alcóxido altamente nucleofílico através da ligação entre um de seus nitrogênios imidazólicos com o hidrogênio carboxílico da Ser195. Tal formação é canônica do mecanismo de clivagem hidrolítica de peptídeos pela quimotripsina (Nelson & Cox, 2008), peptidase-tipo da família S1 (Rawlings & Barrett, 1993). Porém observa-se na estrutura cristalográfica da KLK7, a nítida possibilidade de formação de ligação de hidrogênio entre o oxigênio hidroxílico da Ser195 e o hidrogênio do N ϵ , neutro imidazólico, da His57.

Apesar de não fazer parte das paredes de nenhum subsítio do centro ativo ou dos sítios alostéricos, tanto na KLK5 quanto na KLK7, o Asp102 atua estabilizando conformacionalmente, através de ligação de hidrogênio, a His57. Na estrutura cristalográfica da KLK5 utilizada neste trabalho, tal interação se dá com o hidrogênio ligado ao N δ , e na estrutura da KLK7, com o hidrogênio ligado ao N do esqueleto carbônico do resíduo. A partir dessa observação pode-se inferir que o baixo pH não seria empecilho de tal estabilização da tríade catalítica devido à grande disponibilidade de sítios doadores e aceptores de ligação de hidrogênio na His57, mesmo protonada.

Porém, sabe-se que o mecanismo da hidrólise catalítica no sítio ativo da quimotripsina envolve sucessivas protonações e desprotonações da His57 (Nelson & Cox, 2008), as quais não seriam possíveis se o resíduo permanecesse em estado de protonação constante, como ocorre no pH epidérmico. Futuros estudos acerca da formação e rompimento das ligações de hidrogênio no mecanismo de inibição das calicreínas por derivados de isomanídeos e em

diferentes estados de protonação são necessários para uma maior elucidação do comportamento dessas moléculas ao serem confrontadas.

4.3.4.3 Gln192, Asn192 e Gly216

Observam-se várias ligações de hidrogênio com a participação do resíduo Gln192 sítio ativo da KLK5, Alo5a, em relação a outros aminoácidos. Também estão presentes em ligações com os compostos AM04 e ES04 no candidato alostérico Alo5b (FIG. 16).

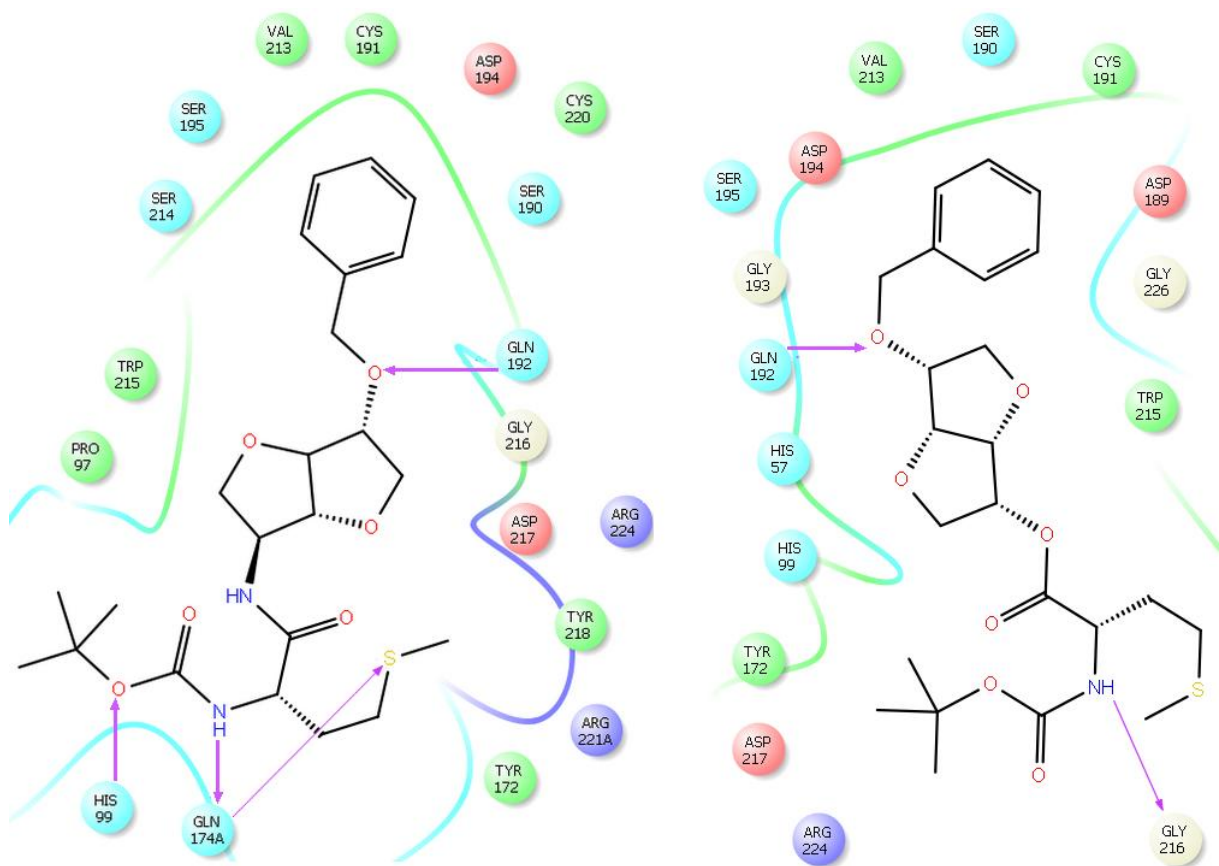


FIGURA 16: Diagrama das forças intermoleculares de AM04 (à esquerda) e ES04 (à direita) separadamente em Alo5b. Note as ligações de hidrogênio com a Gln192, resíduo provável de ser essencial na estabilização do substrato no sítio ativo da KLK5 para a catálise.

O resíduo correspondente na KLK7, ou seja, a Asn192, também possui forte contribuição nas interações de hidrogênio presentes no sítio ativo, porém não nos demais, onde realiza ligações apenas com dois dos inibidores, vistas no bolsão Alo7a.

O resíduo Gly216 faz apenas ligações de hidrogênio no sítio ativo da KLK7, com ES01-R e ES01-S. Nos sítios alostéricos, forma ligações com AM07-S em Alo5a e Alo7a e com ES04 em Alo5b e Alo7a. A observação das ligações de hidrogênio entre AM04 e ES04,

docados em Alo5b, e o resíduo Gln192, e entre ES04 e os resíduo Gly216, permite inferir sobre a importância direta desses resíduos na atividade e na própria inibição enzimática do tipo não-competitiva. Os escores relativamente altos desses compostos no sítio Alo5b que em Alo5a, corroboram com a provável relação.

Comparando-se à estrutura cristalográfica da KLK5 usada neste trabalho, com um de seus conhecidos inibidores, a leupeptina, ligada ao centro ativo do cristal, nota-se que a molécula alinha-se ao segmento enzimático Ser214-Gly216 de uma maneira a formar as ligações de hidrogênio características P3-Leu1i e Gly216, e P1-Arg3i e Ser214 (Debela, *et al.*, 2007). P3-Leu se estende ao volume do solvente e forma ligações de hidrogênio a partir de seu esqueleto carbônico C=O e NH ao esqueleto carbônico da Gly216 (Goettig *et al.*, 2010).

4.3.4.4 Subsítios de interação

Além das ligações de hidrogênio, a localização espacial dos inibidores nos bolsões, reunindo o conjunto de interações intermoleculares que determinaram o maior escore e, logo, a melhor pose, pode corroborar ainda mais para o entendimento de seus possíveis mecanismos de inibição. O Glide XP especificamente recompensa a ocupação bem definida de bolsos hidrofóbicos por grupos ligantes apolares em adição à melhora do escore relativo a ligações de hidrogênio (Friesner & Murphy, 2006).

Ao sobrepor a pose dos compostos AM04 e ES04 em Alo5b com as correspondentes de melhor escore do sítio ativo, observa-se que os componentes aromáticos convergem para o invólucro hidrofóbico formado pelos resíduos apolares e aromáticos de S1 (FIG. 17).

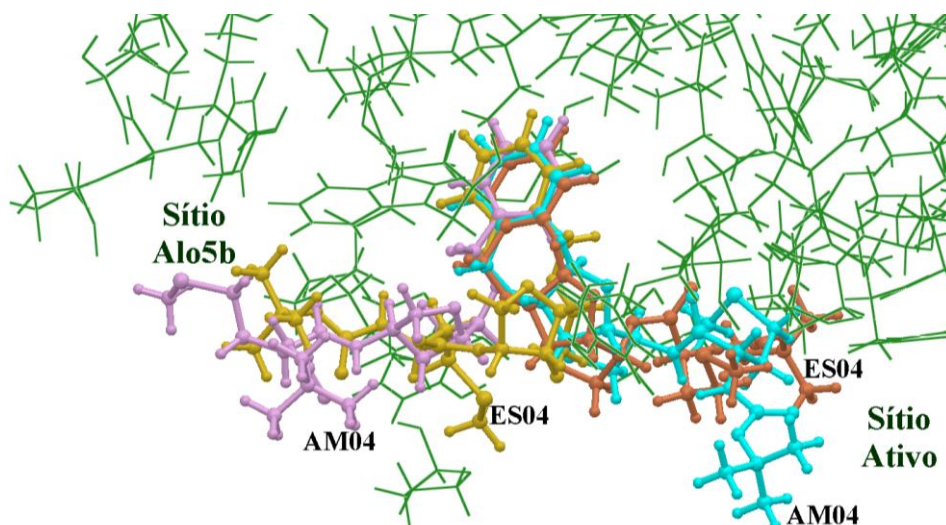


FIGURA 17: Poses de AM04 e ES04 docados no sítio ativo e Alo5b – KLK5. Apenas os resíduos hidrofóbicos e aromáticos do receptor (em verde) são conjuntamente mostrados.

Tal disposição dos inibidores no sítio alostérico é bastante provável de impedir a hidrólise e/ ou mesmo a entrada do substrato no sítio ativo da KLK5, visto o papel essencial desempenhado pelo subsítio S1 na acomodação de R1 da maioria desses compostos nos sítios ativos. A primeira inferência – impedimento da hidrólise do substrato já no sítio – e a segunda – impedimento da entrada do substrato no sítio – poderiam se aplicar respectivamente à inibição pela AM04 (não-competitiva), e à inibição pelo ES04 (competitiva), porém nossos resultados não subsidiam afirmar essa correlação.

Quanto às demais poses obtidas do sítio ativo da KLK5, vê-se que apenas AM07-S, através de R1, ocupa do espaço S2, que permanece livre com os outros inibidores (FIG. 18). Porém, devido ao grande volume das moléculas inibidoras em questão, comparadas ao Zn^{+2} , o fator estérico da AM07-R seria o mais plausível de impedir a clivagem do substrato no sítio ativo de ambas as proteases, mesmo a inibição sendo não-competitiva, e tal interferência puder ser comprovada com mais estudos no futuro.

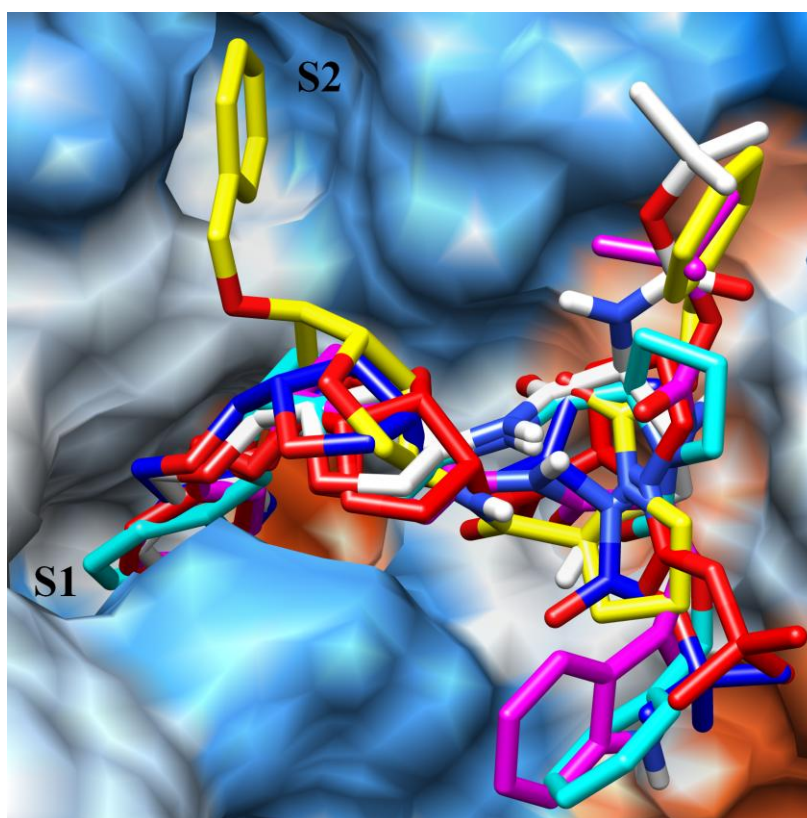


FIGURA 18: Poses dos sete inibidores sobrepostas no sítio ativo da KLK5: AM04 (branco), AM05 (rosa), AM07-R (azul), AM07-S (amarelo), ES01-R (vermelho) e ES01-S (azul escuro). Note que o subsítio S2 é ocupado apenas pelo substituinte R1 de um dos compostos, o AM07-S. O subsítio S1 acomoda os substituintes R1 dos demais inibidores.

Diferentemente, na KLK7 todos os sete inibidores se projetam em S2, não restando espaço disponível de ocupação por outra molécula no subsítio. Na KLK7, as ligações de hidrogênio relativamente ausentes das proximidades de R1 na AM07-S e ES01-S, e a acomodação de R2, ao invés de R1 em S1, é coerente com a orientação inversa, que ambas as poses desses dois inibidores se encontram (FIG. 19).

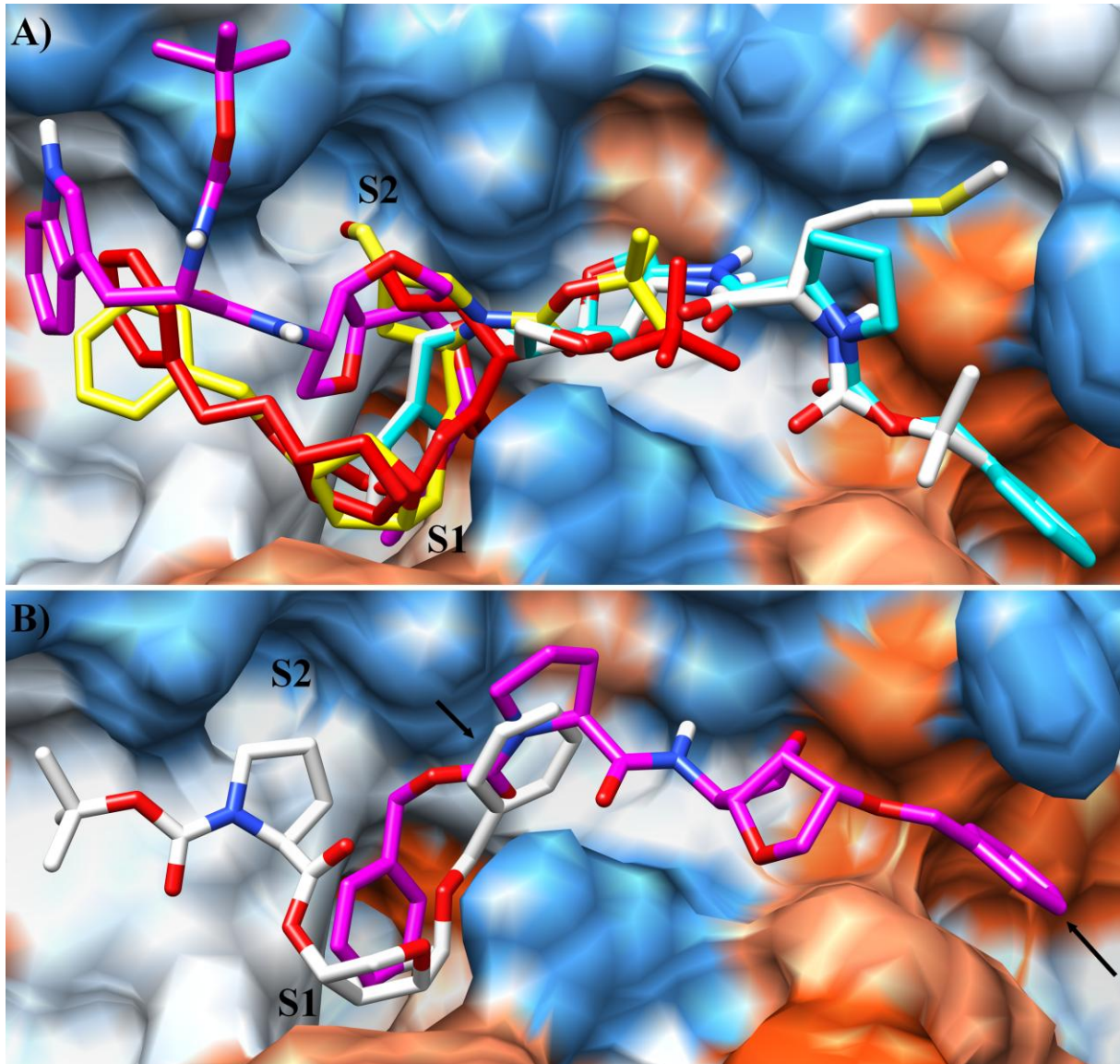


FIGURA 19: Poses de melhor escore no sítio ativo da KLK7. **A)** AM04 (branco), AM05 (rosa), AM07-R (azul), ES01-R (amarelo) e ES04 (vermelho). **B)** AM07-S (rosa) e ES01-S (branco). As setas em B apontando os substituintes R1 indicam a orientação inversa daqueles inibidores em relação àqueles em A, cujos R1 se voltam a S1. Note que R1 das amidas se encontram acomodados em S1, enquanto que para os ésteres, os anéis bicíclicos ocupam o subsítio, evidenciando seu considerável caráter apolar.

A contribuição da hidrofobicidade do bolsão S1 da KLK7 na acomodação da AM07-S e ES01-S também é relativamente maior que nos demais compostos, muito em virtude da

presença dos resíduos Ala190 e Phe218 (Goettig *et al.*, 2010) e como mostram seus respectivos escores.

Ao analisar as posições que possibilitaram a interação com S3, percebeu-se a projeção dos grupos apolares de R1 e R2 dos três ésteres representantes do subconjunto alvo, se localizando mais próximos da cadeia lateral do Trp215, em relação àqueles da série amidas, no sítio ativo da KLK7. Interessantemente, apenas a pose do AM05 apresenta a mesma projeção (FIG 19A). Na KLK5, esse padrão não foi encontrado, estando as sete estruturas praticamente na mesma localização espacial no interior do bolsão ativo. O grupo metil N-terminal do acetil da leupeptina, localizado em S4 (Goettig *et al.*, 2010; Debela *et al.*, 2008), também evidencia a importância desse subsítio hidrofóbico para a catálise e para inibição da enzima.

O Trp215, um aminoácido volumoso, tem vantagem de interagir com partes espacialmente distantes da molécula do inibidor, devido fazer parte tanto de S1, quanto de S4.

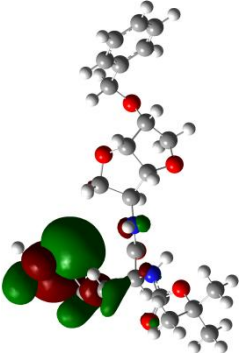
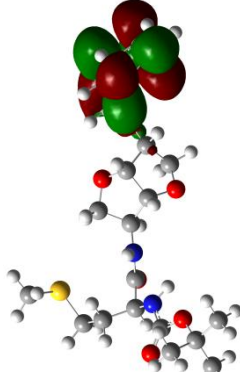
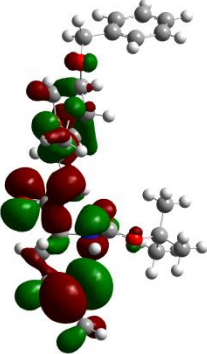
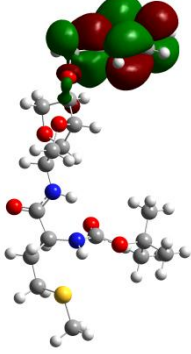
4.3.4 Orbitais moleculares de fronteira

Os orbitais moleculares de fronteira (FMO) dos confôrmeros obtidos do cálculo DFT são mostrados na TABELA 20. A configuração dos orbitais em meio aquoso não apresentou variação proeminente em relação àqueles no vácuo.

A mecânica quântica tem mostrado que as energias do orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) e do orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) são aproximações plausíveis do potencial de ionização e da afinidade eletrônica experimentais negativos, respectivamente, para um sistema de N-elétrons (Zhang & Musgrave, 2007; Cramer, 2006).

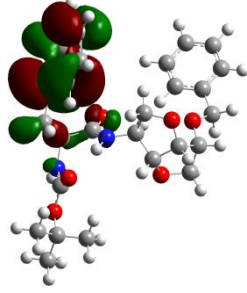
As regiões doadoras de densidade eletrônica nas ligações de hidrogênio foram associadas ("sobrepostas") às regiões do HOMO para cada uma das sete moléculas. Paralelamente, as regiões receptoras de densidade eletrônica nas ligações de hidrogênio bem como aquelas de interação apolar, deficientes em elétrons, foram associadas ao LUMO. A representação gráfica do HOMO e LUMO nos confôrmeros DFT foram comparadas tanto às poses obtidas do sítio ativo, quanto dos sítios alostéricos em ambas as enzimas, a fim de buscar a relação estrutura atividade desses compostos, além de correlacionar os achados a nível clássico e quântico.

TABELA 20: Representação gráfica análise do HOMO e LUMO das poses de melhor escore nos sítios ativos da KLK5 e KLK7, minimizados por cálculo DFT.

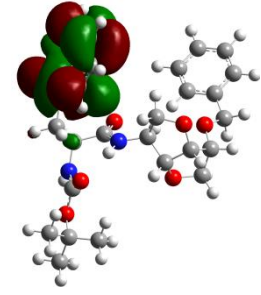
| | HOMO | LUMO |
|------|---|---|
| KLK5 |  |  |
| AM04 | <p>Difusa por toda ramificação de R2 na qual se localiza o átomo de enxofre, com grandes lóbulos sobre o mesmo.</p> | <p>Sobre R1.</p> |
| KLK7 |  |  |
| | <p>Difuso incluindo o oxigênio de R1, o anel bicíclico e todo o R2, exceto pela porção terminal Boc.</p> | <p>Sobre R1.</p> |

AM05

KLK5

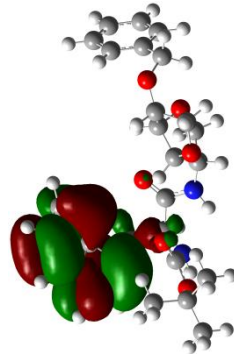


Principalmente sobre o anel indólico, e discretamente sobre os grupos amida de R2

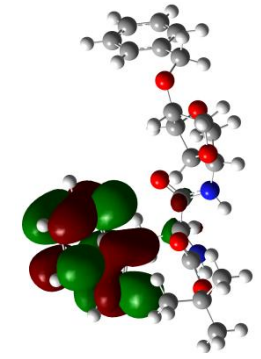


Sobre o anel indólico.

KLK7



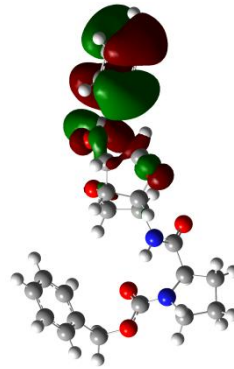
Idem acima.



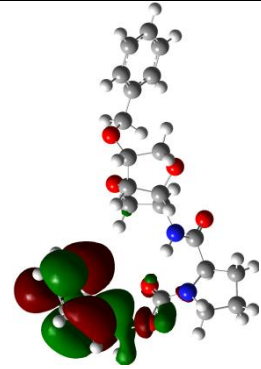
Sobre o anel indólico.

AM07-R

KLK5

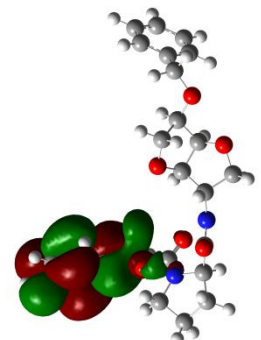
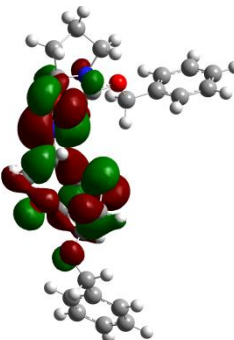


Sobre O5 do anel bicíclico e todo o substituinte R1.



Principalmente sobre o anel benzênico de R2 em menor proporção sobre o átomo de oxigênio próximo.

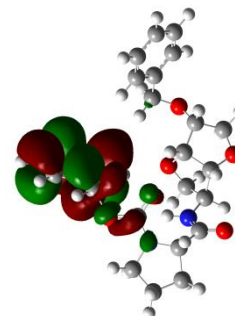
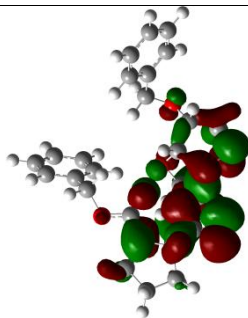
KLK7



Principalmente sobre o anel bicíclico e o primeiro grupo amida de R2, e discretamente sobre o oxigênio de R1 e o segundo nitrogênio de R2.

Principalmente sobre o anel benzênico de R2 em menor proporção sobre o átomo de oxigênio próximo.

KLK5

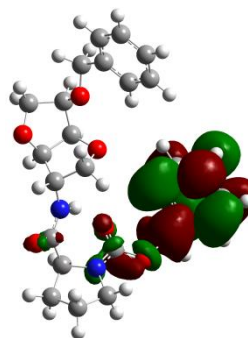
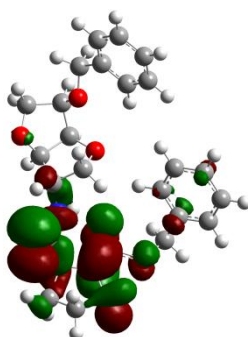


Principalmente sobre o anel bicíclico e o primeiro grupo amida de R2, e discretamente sobre o oxigênio de R1 e o segundo nitrogênio de R2 e também sobre o segundo grupamento amida.

Principalmente sobre o anel benzênico de R2 em menor proporção sobre o átomo de oxigênio e nitrogênio do heterociclo.

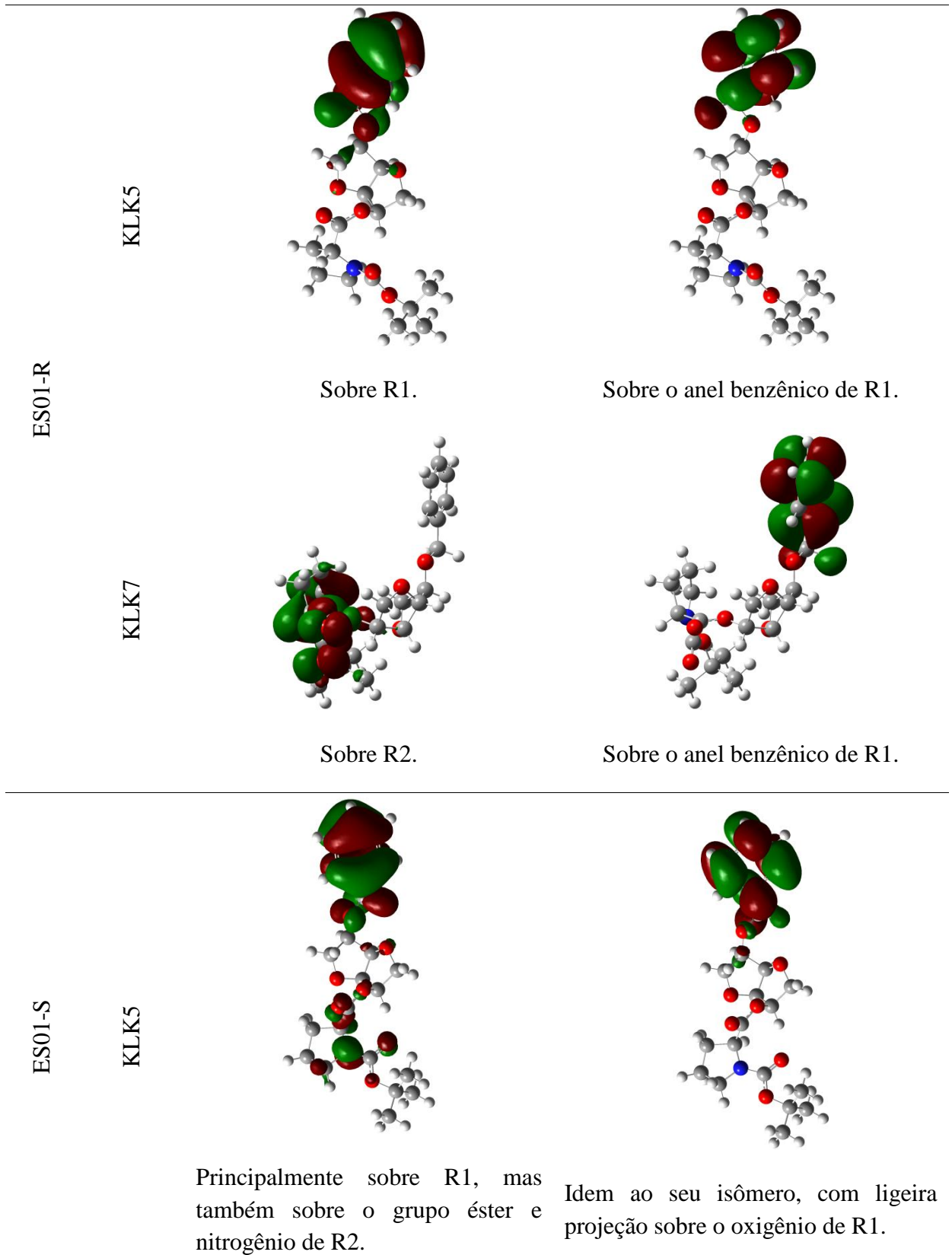
AM07-S

KLK7

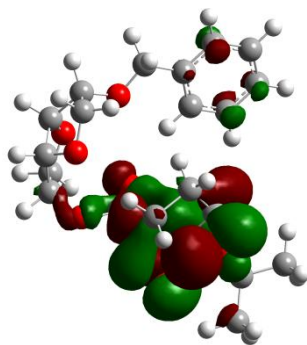


Ao longo de R2, principalmente sobre os grupos amida, e pouco sobre o heterociclo e o anel benzênico.

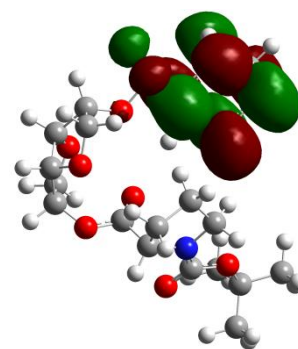
Principalmente sobre o anel benzênico de R2 em menor proporção sobre o átomo de oxigênio próximo, e com maior projeção sobre o nitrogênio, e oxigênios posteriores ao heterociclo.



KLK7

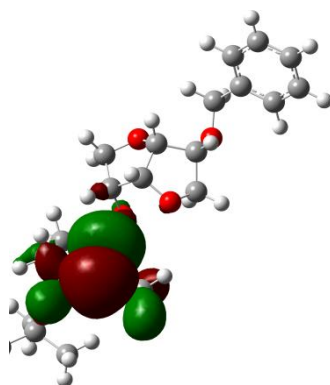


Sobre R2, exceto a parte carbônica do heterociclo e o terminal Boc.

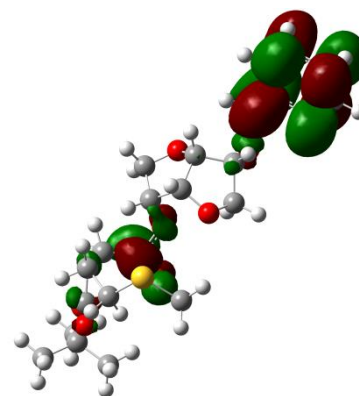


Idem ao seu isômero.

KLK5



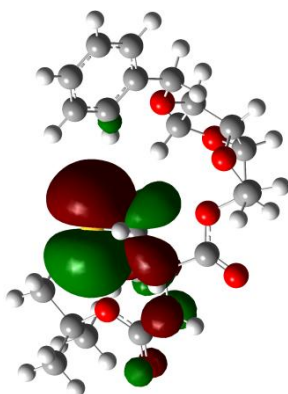
Grandes lóbulos envolvendo o átomo de enxofre, e outros menores sobre as demais partes de R2, exceto pelo terminal Boc.



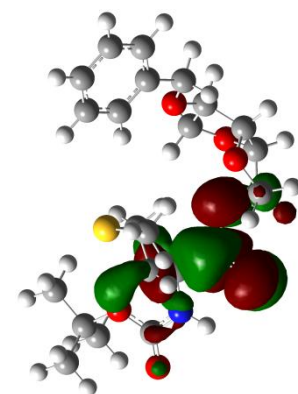
Sobre R1 e o grupamento éster de R2.

ES04

KLK7



Grandes lóbulos envolvendo o átomo de enxofre, e outros menores sobre o nitrogênio e sobre o oxigênio mais próximo.



Sobre o grupamento éster e parte da bifurcação de R2, com projeção ao nitrogênio e terceiro oxigênio da cadeia.

O HOMO da AM04, na KLK5, menos deslocalizado, apresentou correlação ao intrigante caráter acceptor de ligação de hidrogênio observado em seu átomo de enxofre com o sítio alostérico. Apesar de seu baixo valor de eletronegatividade, próximo do valor do elemento carbono (Bruice, 2004), o enxofre é visto capaz de realizar ligação de hidrogênio através de seus pares de elétrons livres (FIG. 16). Na KLK7, pequena correlação foi notada entre o HOMO, mais deslocalizado, e as outras ligações no sítio ativo e alostérico.

Uma pequena parte do HOMO da AM05, porém não a mais proeminente, corresponde à região de R2 que realiza ligação de hidrogênio com o sítio ativo da KLK5 e com o sítio alostérico da KLK7. Já o LUMO apresentou alta correlação com a interação de hidrogênio no sítio ativo da KLK7 e alostérico da KLK5.

O HOMO da AM07-R, na KLK5, apresentou alta correlação com as interações de hidrogênio tanto no sítio ativo quanto no alostérico (Alo5a), enquanto que, na KLK7, apenas no ativo. O HOMO da AM07-S, tanto na KLK5 quanto na KLK7, apresenta correspondência alta com as ligações de hidrogênio no sítio ativo, porém baixa nos sítios alostéricos de ambas as enzimas.

O HOMO do ES01-R, na KLK5, apresenta alta correspondência nos sítios ativo e alostérico. O HOMO do ES01-S na KLK5 apresenta correspondência alta no sítio ativo e baixa no sítio alostérico.

O HOMO do ES04, na KLK7, apresentou correlação alta com as interações de hidrogênio no sítio ativo e baixa no sítio alostérico. No caso do LUMO, a correlação foi menor em ambos os sítios.

A maioria dos compostos também apresentou o LUMO nas regiões que interagem com resíduos hidrofóbicos de ambas as proteínas. Exceções são vistas para a AM07-S no sítio ativo e alostérico da KLK5, e para o ES01-S no sítio ativo e alostérico da KLK7. Não foram observadas correlações além das citadas acima.

Analisando principalmente a relação entre o HOMO e LUMO dos confôrmeros otimizados com as ligações de hidrogênio envolvendo suas poses, é possível reafirmar a tendência dos compostos não competitivos da KLK5, ou seja, AM04 e AM05, a interagirem de forma mais favorável energeticamente em seus respectivos sítios alostéricos (Alo5b e Alo5c). Mais especificamente, essa interação se daria principalmente através do HOMO do primeiro e do LUMO do segundo. Para os demais compostos, tal preferência não é evidenciada.

5 CONCLUSÃO

- A forte regulação homeostática das calicreínas teciduais humanas é necessária para que diversas doenças não se desenvolvam. Na pele, com base em estudos dirigidos em modelos animais, tem-se visto que as calicreínas mais especificamente relacionadas a alterações patológicas são as KLKs 4, 5, 6, 7, 8 e 14, cuja atividade é modulada direta ou indiretamente por vários tipos de inibidores. Diferentemente do nível bioquímico, o nível estrutural da inibição das KLKs 5 e 7 está no escopo principal desta dissertação.
- Nos resultados iniciais de nosso estudo, foi visto que as posições dos candidatos inibidores para as KLKs 5 e 7 do subconjunto alvo no *ranking* de afinidade foram coerentes com os achados nos ensaios enzimáticos realizados pelo professor Dr. Luciano Puzer e equipe da UFABC. AM07-R, ES01-R e ES04, mostraram a mesma ordem da potência observada nos testes *in vitro* com a KLK5.
- Moléculas endógenas e exógenas podem se ligar a bolsos distintos de proteases dependendo das diferenças de afinidade, levando ao rearranjo tridimensional da enzima e conseqüentemente dos demais sítios.
- A possibilidade de a inibição ser reforçada por ligação adicional do inibidor a cavidades distintas do sítio ativo, denominadas exossítios, é bastante comum e conhecida na literatura.
- Devido aos diferentes mecanismos inibitórios, o estudo das características de interação de cada inibidor do subconjunto alvo em prováveis bolsões se mostrou mais significativo para futuras abordagens de pesquisa que uma pontuação classificatória coletiva desses compostos nos sítios ativos.
- A ausência de especificação enantiomérica da estrutura química dos inibidores também nos impediu de avaliar a real eficácia do estudo de *docking* em predizer o *ranking* de atividade (potência) dos mesmos frente às duas enzimas.
- Ao contrapor os tipos de mecanismo reversível competitivo e reversível não-competitivo pela análise das afinidades individuais de cada pose de melhor score do subconjunto alvo em cada sítio, a ferramenta de *docking* foi capaz de fornecer subsídios indicadores de tais preferências.
- A proximidade e compartilhamento de resíduos entre os sítios alostéricos e ativo podem ser um fator propício a influenciar ainda mais o remodelamento da estrutura terciária do domínio catalítico.

- A maior tendência dos compostos não-competitivos AM04 e AM05 de interagirem em um sítio alostérico – Alo5b e Alo5c, respectivamente – em relação aos outros isomanídeos nos bolsões da KLK5 foi evidenciada.
- Segundo esses resultados, os dois inibidores são fortes candidatos a provocar remodelamento tridimensional no sítio ativo da KLK5, pela alta afinidade aos respectivos exossítios de mais alto escore.
- As características a nível eletrônico das interações desses dois inibidores, basicamente as regiões dos orbitais moleculares de fronteira, analisadas dos resultados obtidos com os cálculos DFT e comparadas àquelas nos demais sítios da KLK5 analisados, corroboraram com tal achado do estudo de *docking*.
- A correlação geral entre os HOMOs e o caráter aceptor de ligação de hidrogênio, e entre os LUMOs e as regiões de complementaridade hidrofóbica com ambas as proteínas mostrou a utilidade do estudo paralelo a nível quântico de teoria.
- A ausência de padrão torcional das ligações giratórias livres das estruturas peptidomiméticas estudadas foi um empecilho irrefutável para uma abordagem farmacofórica mais eficaz.
- No entanto, foi possível observar, na KLK5, uma tendência das regiões de alto caráter hidrofóbico da maioria isomanídeos, em convergir para o interior do invólucro formado pelos resíduos apolares do subsítio S1.
- Tais regiões, essencialmente, na KLK5, o substituinte aromático R e, na KLK7, o arcabouço bicíclico, partes lipofílicas de R2 e novamente R1 poderiam constituir-se como prováveis pontos farmacofóricos.
- Novas pesquisas, cujos esforços sejam mais voltados a essas porções e a esses sítios, são necessárias para validar tal afirmação.
- Outros métodos, como a dinâmica molecular possibilitariam melhor abordagem da influência dos ligantes-chave – AM04 e AM05 – para o entendimento do mecanismo inibitório, especialmente na KLK5, acerca do comprometimento ou não da abertura e capacidade de acomodação de outras moléculas simultaneamente nos sítios ativos.
- O desenvolvimento de inibidores para KLK5 e KLK7 pode não somente ajudar a elucidar os papéis fisiológicos e patológicos das KLK5 e 7, mas também servir como arquétipo de novas drogas.

REFERÊNCIAS

- Advanced Chemistry Development I. ChemSketch 12.0. Toronto; 2013.
- Avgeris M, Papachristopoulou G, Polychronis A, Scorilas A. Down-regulation of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) expression in breast cancer patients: a biomarker for the differential diagnosis of breast lesions. *Clinical Proteomics*. 2011;8(1):1-11.
- Bachrach SM. *Computational Organic Chemistry*. Hoboken, Nova Jersey: Wiley; 2007.
- Band V, Blaber M, Clements J, Courty Y, Diamandis P, Fritz H, Lilja H, Maltais L, Olsson Y, Petraki C, Scorilas A, Sotiropoulou G, Stephan C, Talieri M & Yousef G. A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biological Chemistry*. 2006;387(6):637-41.
- Barros TG, Pinheiro S, Williamson JS, Tanuri A, Gomes M, Pereira HS, Brindeiro RM, Neto JBA, Antunes OC, Muri EMF. Pseudo-peptides derived from isomannide: inhibitors of serine proteases. *Amino Acids* [Internet]. 2010 [acesso em 23 jan. 2012];38(3):701-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19330426>.
- Beaubien G, Rosinski-Chupin I, Mattei M, Chrétien M, Seidah N. Gene Structure and Chromosomal Localization of Plasma Kallikrein. *Biochemistry*. 1991;30(6):1628-35.
- Becke AD. A new mixing of Hartree-Fock & local density-functional theories. *The Journal of Chemical Physics*. 1993;98(2):1372-7.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T N, Weissig H, Shindyalov I N, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(1):235-42.
- Bhoola K, Figueroa D & Worthy K. Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacological Reviews*. 1992;44(1):1-80.
- Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, Dubus P, Hovnanian A. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(5):1135-47.
- Brown T, Lemay H, Bursten B. *Química: a ciência central*. 9a ed. Prentice-Hall; 2005.
- Bruice PY. *Organic Chemistry*. 4a ed. Upper Saddle River; 2004.
- Burke K. Perspective on density functional theory. *The Journal of Chemical Physics*. 2012; 136:150901.
- Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre, G. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCCE/KLK5/hK5 & SCCE/KLK7/hK7. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2004;122(5):1235-44.

- Cramer CJ. *Essentials of Computational Chemistry: Theories & Models*. 2a ed. Wiley; 2006.
- Debela M, Beaufort N, Magdolen V, Schechter NM, Craik CS, Schmitt M, Bode W, Goettig P. Structures & specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, & 7. *Biological Chemistry* [Internet]. 2008 [acesso em 18 jul. 2013];389(6):623-32. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18627343>.
- Debela M, Goettig P, Magdolen V, Huber R, Schechter NM, Bode W. Structural basis of the zinc inhibition of human tissue kallikrein 5. *Journal of Molecular Biology*. 2007a; 373(4):1017-31.
- Debela M, Hess P, Magdolen V, Schechter NM, Steiner T, Huber R, Schechter NM, Bode W. Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007b;104(41):16086-91.
- Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural & topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*. 2006;34:116-8.
- Eldridge M, Murray C, Auton T, Paolini G & Mee R. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 1997;11(5):425-445.
- Emami N, Diamandis EP. Utility of Kallikrein-Related Peptidases (KLKs) as Cancer Biomarkers: Mini-Review. *Clinical Chemistry*. 2008;54(10):1600-7.
- Fernández IS, Ständker L, Mägert H-J, Forssmann W-G, Giménez-Gallego G, Romero A. Crystal structure of human epidermal kallikrein 7 (hK7) synthesized directly in its native state in *E. coli*: insights into the atomic basis of its inhibition by LEKTI domain 6 (LD6). *Journal of Molecular Biology*. 2008;377(5):1488-97.
- Frey E, Kraut H & Werle E. Über Die Blutzuckersenkende Wirkung Des Kallikreins (Padutins). *Klinische Wochenschrift*. 1932;11(20):846-9.
- Friesner R, Banks JL, Murphy RB, Halgren T, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P, Shenkin, PS. Glide: a new approach for rapid, accurate docking & scoring. 1. Method & assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47(7):1739-49.
- Friesner R, Murphy R. Extra Precision Glide: docking & scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006;49(21):6177-96.
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery Jr JA, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J,

Cossi M, Rega N, Millam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin A J, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox D J. Gaussian 09, Revision A.1. Wallingford; 2009.

Goettig P, Magdolen V, Brandstetter H. Natural & synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie*. 2010;92(11):1546-67.

Halgren T. Identifying and Characterizing Binding Sites and Assessing Druggability. *J. Chem. Inf. Model*. 2009;49:377-389.

Halgren T, Murphy RB, Friesner R a, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, Banks JL. Glide: a new approach for rapid, accurate docking & scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2004;47(7):1750-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15027866>.

Hartley B. Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*. 1960;29:45-72.

Harvey T, Hooper J, Myers S, Stephenson S, Ashworth L & Clements J. Genomics Proteomics and Bioinformatics: Tissue-specific Expression Patterns and Fine Mapping of the Human Kallikrein (KLK) Locus on Proximal 19q13.4. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275, 37397-37406. doi:10.1074/jbc.M004525200.

Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*. American Physical Society; 1964;136(3B):B864-B871.

Johnson SK, Ramani VC, Hennings L, Haun RS. Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. *American Cancer Society*. 2007;109(9):1811-20.

Jorgensen WL., Ulmschneider JP & Tirado-Rives J. Free Energies of Hydration from a Generalized Born Model and an All-Atom Force Field. *Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108:16264-70.

Jorgensen WL, Maxwell DS & Tirado-Rives J. Development & Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics & Properties of Organic Liquids. *Journal of American Chemical Society*. 1996;118(45):11225-36.

Jorgensen WL & Tirado-Rives J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *Journal of the American Chemical Society*. 1988;110(6):1657-66.

Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J & Jorgensen WL. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *Journal of Physical Chemistry B*. 2001;105(28):6474-87.

Kinch LN & Grishin NV. Bioinformatics perspective on rhomboid intramembrane protease evolution and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1828(12):2937-43.

Kohn W, Sham LJ. Self-Consistent Equations Including Exchange & Correlation Effects. *Physical Review*. 1965;140:1133-8.

Kontos CK, Chantzis D, Papadopoulos IN, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) mRNA predicts short-term relapse in colorectal adenocarcinoma patients. *Cancer Letters*. 2013;330(1):106-12.

Korbakis D, Gregorakis AK, Scorilas A. Quantitative Analysis of Human Kallikrein 5 (KLK5) Expression in Prostate Needle Biopsies: An Independent Cancer Biomarker. 2009; 55(5):904-13.

Kukic P, Nielsen J. Electrostatics in proteins & protein-ligand complexes. *Future Medicinal Chemistry*. 2010;2(4):647-66.

Kurochkina GI, Soboleva NO, Grachev MK, Vasyanina LK & Nifant EE. Monophosphorylation of 1,4:3,6-dianhydro-D-mannitol. *Russian Chemical Bulletin*. 2003; 52(4):1009-12.

Kuszmans J & Medgyes G. Substitution of 1,4:3,6-dianhydro-D-mannitol derivatives by reactions with iodide. *Carbohydrate Research*. 1978; 64:135-42.

Langer T. Pharmacophores in Drug Research. *Molecular Informatics*. 2010;29(6-7):470-5.

Lawrence MG, Lai J & Clements JA. Kallikreins on Steroids: Structure, Function, and Hormonal Regulation of Prostate-Specific Antigen and the Extended Kallikrein Locus. *Endocrine Reviews*. 2010;31(4):407-46.

Lennard-Jones J. Cohesion. *The Proceedings Of The Physical Society*. 1931;43(5):461-482.

Liang J, Edelsbrunner H & Woodward C. Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Science*. 1998;7:1884-97.

Lindsay SM. *Introduction to Nanoscience*. Oxford: Oxford University Press; 2010.

Lose F, Batra J, O'Mara T, Fahey P, Marquart L, Eeles R, Easton, Douglas F, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Guy M, Muir K, Lophatananon A, Rahman A, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Chambers S, Gardiner R, Aitken JF, Yaxley J, Alexander K, Clements J, Spurdle AB, Kedda M-A. Common variation in Kallikrein genes KLK5, KLK6, KLK12, & KLK13 & risk of prostate cancer & tumor aggressiveness. *Urologic Oncology*. 2011;31(5):635-43.

Lu S-H, Wu JW, Liu H-L, Zhao J-H, Liu K-T, Chuang C-K, Lin H-Y, Tsai W-B, Ho Y. The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: a combination of pharmacophore modeling, virtual screening, & molecular docking studies. *Journal of Biomedical Science*; 2011;18(1):1-13.

Mallik B, Masunov A, Lazaridis T. Distance & exposure dependent effective dielectric function. *Journal of Computational Chemistry* [Internet]. 2002 [acesso em 18 jul. 2013];23(11):1090-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116395>.

Michael IP, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Magklara A, Ghosh M, Wasney G, Diamandis EP. Biochemical & Enzymatic Characterization of Human Kallikrein 5 (hK5), a Novel Serine Protease Potentially Involved in Cancer Progression. 2005;280(15):14628-35.

Muri EMF, Gomes M, Albuquerque MG, da Cunha EFF, de Alencastro RB, Williamson JS, Antunes OC. Pseudo-peptides derived from isomannide as potential inhibitors of serine proteases. *Amino Acids*. 2005;28(4):413-9.

Muri EMF, Gomes M, Costa JS, Alencar FL, Sales A, Bastos ML, Hernandez-Valdes R, Albuquerque MG, da Cunha EFF, Alencastro RB, Williamson JS, Antunes OC. N- t-Boc-amino acid esters of isomannide. Potential inhibitors of serine proteases. *Amino Acids*. 2004;27(2):153-9.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 5a ed. New York; 2008.

Nielsen PE. *Pseudo-peptides in Drug Discovery*. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.

Patrick GL. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4a ed. Oxford: Oxford University Press; 2009.

Patsis C, Yiotakis I, Scorilas A. Diagnostic & prognostic significance of human kallikrein 11 (KLK11) mRNA expression levels in patients with laryngeal cancer. *Clinical Biochemistry. The Canadian Society of Clinical Chemists*. 2012;45(9):623-30.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research & analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2004;25(3):1605-12.

Ramani VC, Haun RS. The extracellular matrix protein fibronectin is a substrate for kallikrein 7. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2008;369(4):1169-73.

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical Journal*. 1993;290:205-18.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids research*. 2010;38:D227-33.

Riegman P, Vlietstra R, Suurmeijer L, Cleutjens C & Trapman J. Characterization of the Human Kallikrein Locus. *Genomics*. 1992;14(1):6-11.

Sainz I, Pixley R & Colman R. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: From protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb. Haemost.* 2007; 98(1):77-83.

Saxena P, Thompson P, d'Udekem Y, Konstantinov IE. Kallikrein-kinin system: a surgical perspective in post-aprotinin era. *The Journal of Surgical Research*. 2011;167(1):70-7.

Schrauzer GN. Recent Advances in Nutritional Sciences Selenomethionine: A Review of its Nutritional Significance, Metabolism & Toxicity. *The Journal of Nutrition*. 2000;130:1553-6.

- Schrödinger L. MacroModel 9.7: Reference Manual. New York; 2009.
- Schrödinger L. Protein Preparation Guide. New York; 2011.
- Schrödinger L. Glide 5.8: User Manual. New York; 2012a.
- Schrödinger L. Maestro 9.3: User Manual. New York; 2012b.
- Still W, Tempczyk A, Hawley R & Hendrickson T. Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 1990;112:6127-9.
- Talieri M, Alexopoulou DK, Scorilas A, Kypraios D, Arnogiannaki N, Devetzi M, Patsavela M, Xynopoulos D. Expression analysis and clinical evaluation of kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) in colorectal cancer. *Tumor Biology.* 2011;32(4):737-44.
- Teixeira TSP, Freitas RF, Abrahão O, Devienne KF, de Souza LR, Blaber SI, Kondo MY, Juliano MA, Juliano L, Puzer L. Biological evaluation & docking studies of natural isocoumarins as inhibitors for human kallikrein 5 & 7. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2011;21(20):6112-5.
- Termini L, Maciag PC, Soares FA, Nonogaki S, Pereira SMM, Alves VAF, Longatto-Filho A, Villa LL. Analysis of human kallikrein 7 expression as a potential biomarker in cervical neoplasia. *International journal of cancer. International Journal of Cancer.* 2010;127(2):485-90.
- Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical Reviews.* 2005;105(8):2999-3093.
- Watkins E & Jorgensen W. Perfluoroalkanes: Conformational Analysis and Liquid-State Properties from ab Initio and Monte Carlo Calculations. *Journal of Physical Chemistry A.* 2001;105(16):4118-25.
- Werle E & Fiedler F. Kallikreins. *Biochemistry.* 1969;115(1840):1966-8.
- White NMA, Chow T, Diamandis M, Rofael Y, Faragalla H, Mankarous M. Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression & cell proliferation in ovarian cancer. *British Journal of Cancer.* 2010;102(8):1244-53.
- Yousef GM & Diamandis EP. The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function and Association to Disease. *Endocrine reviews.* 2001;22(2):184-204.
- Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamandis EP. Genomic Organization of the Human Kallikrein Gene Family on Chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2000; 276(1):125-33.
- Zhang G, Musgrave CB. Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations. *Journal of Physical Chemistry A.* 2007;111(8):1554-61.