



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



“Estudos *in silico* dos modos de ligação dos hormônios
tireoidianos T3 e T4 com a Proteína Transportadora
Albumina Sérica Humana HSA”

Elisa Guimarães Barbosa

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Profª. Dra. Ignez Caracelli

Coorientador:

Dr. Thales Souza Freire

* bolsista (CAPES)

**São Carlos – SP
2024**

ELISA GUIMARÃES BARBOSA

“Estudos *in silico* dos modos de ligação dos hormônios
tireoidianos T3 e T4 com a Proteína Transportadora
Albumina Sérica Humana HSA”

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Ignez Caracelli

Coorientador:

Dr. Thales Souza Freire

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ignez Caracelli
Departamento de - UFSCar

Profa. Dra Stella Hernandez Maganhi
Departamento - UEMG

Prof. Dr. Lucas Sousa Madureira
Departamento - IAE

Prof. Dr. Antônio César Silva Sacco
Departamento - Fatec

Prof. Dr. Felix Nicolai Delling
Departamento - IFRS

São Carlos
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Doutorado da candidata Elisa Guimarães Barbosa, realizada em 06/11/2004.

Prof. Dr. Ignez Caracelli
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Prof. Dr. Stella Hernandez Maganhi
Universidade do Estado de Minas Gerais - UEMG

Prof. Dr. Lucas Sousa Madureira
Instituto de Aeronáutica e Espaço - IAE

Prof. Dr. Antônio César Silva Sacco
Faculdade de Tecnologia de São Paulo - Fatec

Prof. Dr. Felix Nicolai Delling
Instituto Federal do Rio Grande do Sul - IFRS

DEDICATÓRIA

À minha família, cujo apoio inabalável e amor constante tornaram esta jornada possível.
Vocês são minha força e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de estender meus mais profundos agradecimentos às seguintes pessoas, cujo apoio e contribuições foram fundamentais para a conclusão desta tese:

Agradeço primeiramente a Deus, cuja orientação e força foram a luz que iluminou meu caminho ao longo desta jornada acadêmica.

Expresso minha profunda gratidão à minha orientadora, Dra. Ignez Caracelli, por sua orientação constante, dedicação e apoio durante todo o desenvolvimento desta pesquisa. Sua sabedoria, incentivo e compromisso com meu crescimento acadêmico foram fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço por todo o tempo e conhecimento compartilhados ao longo desta jornada.

Agradeço sinceramente ao Dr. Thales Souza Freire pelo inestimável apoio na realização deste trabalho, especialmente pela orientação dedicada e pelas contribuições fundamentais no desenvolvimento das análises de dinâmica molecular. Sua expertise e disposição em compartilhar conhecimentos foram essenciais para o avanço desta pesquisa. À minha querida irmã Eloiny e meu cunhado Marcos, cujo apoio inabalável e incentivo constante foram verdadeiras fontes de inspiração e motivação, meu mais sincero reconhecimento.

Ao meu amado esposo, pela sua paciência, compreensão e apoio incondicional, agradeço de todo o coração por estar ao meu lado em cada desafio e conquista.

Agradeço também à minha família e amigos, cujo encorajamento e apoio moral foram pilares essenciais neste percurso acadêmico.

À todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o sucesso deste trabalho, meu profundo e sincero agradecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Barbosa, Elisa Guimarães. **Estudos *in silico* dos modos de ligação dos hormônios tireoidianos T3 e T4 com a Proteína Transportadora Albumina Sérica Humana HSA**. 2024. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2024.

RESUMO

No presente trabalho, foram investigados os modos de ligação e as interações moleculares entre os hormônios tireoidianos (T4, T3 e os isômeros posicionais do T3 – T3IP) e a proteína transportadora (HSA). O T4 possui 4 átomos de iodo e o T3 possui 3. Foi realizada a análise das estruturas cristalográficas dos complexos T4-HSA (1HK1,1HK2-R218H, 1HK3-R218P - com ácidos graxos e 1HK4, 1HK5-R218H- sem ácidos graxos). O conhecimento adquirido foi utilizado no estudo do docking molecular para entender o comportamento do T3, uma vez que não há estrutura cristalográfica do HSA com o T3, sendo que o T3 é a forma ativa do hormônio tireoidiano nas células-alvo. Foi observado que o HSA é capaz de diferenciar o T4 do T3. Outro ponto importante foi estudar 3 casos de complexos HSA-T4 e HSA-T3, com R128, R218H, R218P e explicar a diferença na afinidade HSA-ligante hormonal. No caso do ligante T3, que possui 3 átomos de iodo, com posição específica, foram avaliados 4 isômeros posicionais, T3IP. Estudos de docking mostraram que esses compostos apresentam comportamentos diferentes com a HSA. A presença de ácidos graxos nos complexos cristalográficos da proteína nativa e da proteína mutante R218H afetou a disponibilidade de sítios de ligação, limitando a interação com T4 a um único sítio (Cleft). A análise dos isômeros posicionais de T3 (T3IP) mostrou que a flexibilidade estrutural dos ligantes é um fator importante na determinação das interações com HSA. Os achados deste estudo podem ser aplicados no desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas ao transporte de hormônios tireoidianos em condições de mutações genéticas ou distúrbios metabólicos. A compreensão detalhada das diferenças de afinidade entre T3 e T4 e a influência de mutações na HSA fornecem uma base sólida para futuras pesquisas focadas na modulação da biodisponibilidade desses hormônios. Os resultados apresentados aqui servem como ponto de partida para investigações experimentais que possam validar as tendências observadas nos estudos *in silico* e explorar novas aplicações no campo da endocrinologia e biotecnologia.

Palavras-chave: Albumina Sérica Humana (HSA), dinâmica molecular, interações proteína-ligante, hormônios tireoidianos.

ABSTRACT

Barbosa, Elisa Guimarães. *In silico*, studies of the binding modes of thyroid hormones T3 and T4 with the Human Serum Albumin Transport Protein HSA. 2024. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2024.

In the present work, the binding mode and molecular interactions between thyroid hormones (T4, T3 and the positional isomers of T3 – T3IP) and the transporter protein (HSA) were investigated. T4 has 4 iodine atoms and T3 has 3. Analysis of the crystallographic structures of the T4-HSA complexes (1HK1,1HK2-R218H, 1HK3-R218P - with fatty acids and 1HK4, 1HK5-R218H- without fatty acids) was carried out. The knowledge acquired was used in the study of molecular docking to understand T3 since there is no crystallographic structure of HSA with T3, with T3 being the active form of thyroid hormone in target cells. It was observed that HSA is capable of differentiating T4 from T3. Another important point was to study 3 cases of HSA-T4 and HSA-T3 complexes, R128, R218H, R218P and explain the difference in HSA-hormonal ligand affinity. In the case of the T3 ligand, which has 3 iodine atoms, with a specific position, 4 positional isomers, T3IP, were evaluated. Docking studies showed that these compounds are different compared to HSA. The presence of fatty acids in the crystallographic complexes of the native protein and R218H mutant protein affected the availability of binding sites, limiting the interaction with T4 to a single site (Cleft). The analysis of T3 positional isomers (T3IP) showed that the structural flexibility of the ligands is an important factor in determining interactions with HSA. The findings of this study can be applied in the development of therapeutic strategies aimed at transporting thyroid hormones in conditions of genetic mutations or metabolic disorders. Detailed understanding of the differences in affinity between T3 and T4 and the influence of mutations in HSA provides a solid basis for future research focused on modulating the bioavailability of these hormones. The results presented here serve as a starting point for experimental investigations that can validate the trends observed in silico studies and explore new applications in the field of endocrinology and biotechnology.

Keywords: Albumin Serum Human (HSA), molecular dynamics, protein-ligand interactions, thyroid hormones.

LISTA DE FIGURAS

1. Capítulo I – Introdução Geral		Página
Figura 1.1	Estrutura dos Hormônios T3 (C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄) e T4 (C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₄) que serão estudados na formação de complexos com a HSA e TR, apresentados em sua forma 2D e 3D. As figuras 3D são apresentadas em duas orientações diferentes. Em destaque estão os átomos de Iodo e os 2 anéis: A (um anel externo que contém um grupo hidroxila) e B (anel interno). Os átomos de H estão omitidos. Diferentes. Em destaque estão os átomos de I e os 2 anéis: A (um anel externo que contém um grupo hidroxila) e B (anel interno). Os átomos de H estão omitidos.	20
Figura 1.2	Esquema dos processos ocorridos na conversão da tiroxina (T4) para sua forma biologicamente ativa, a triiodotironina (T3), ou em suas formas inativas.	21
Figura 1.3	Modelo mostrando cada domínio (numerais romanos) e subdomínios (letras A e B) da HSA com os resíduos de aminoácidos numerados. Também estão indicados os sítios de ácidos graxos (FA) de 1 a 7.	23
Figura 1.4	Comparação dos complexos estruturais HSA–T4 (A) livres de ácidos graxos que apresenta quatro sítios de ligação para T4 – Sudlow I, Sudlow II, FA5a e FA5b; (B) com a presença de ácidos graxos e apresenta apenas um sítio para T4 no cleft (fenda).	25
CAPÍTULO 2. Materiais e Métodos		
Figura 2.1	Passos principais do estudo realizado: proteínas , ligantes , docking e análise de interações .	28
Figura 2.2	Diagrama do ligante T4, obtido do CSD, de código TYRXEA10.	29
Figura 2.3	Estrutura dos ligantes do hormônio T4, do T3 (T3 normal), e os ligantes isômeros posicionais T3IP denominados, T3-2, T3-3 e T3-4 (T3 reverso). Em destaque estão os átomos de I e os 2 anéis: A (um anel externo que contém um grupo hidroxila) e B (anel interno). Os átomos de H estão omitidos.	30
Figura 2.4	Estrutura dos hormônios T4, T3 e T3-4 com os dois diedros φ e ψ que conectam o anel B ao anel A.	31
Figura 2.5	Redocking: As moléculas do complexo obtido no PDB são separadas e um complexo é reconstruído por meio de docking molecular. Neste processo são determinados os parâmetros necessários para isso.	34
CAPÍTULO 3. Resultados E Discussão		
Figura 3.1	(a) Valores dos diedros visitados durante a simulação e (b) superfície de energia livre em kcal/mol para o T4.	37
Figura 3.2	(a) Valores dos diedros visitados durante a simulação e (b) superfície de energia livre em kcal/mol para o T3 biologicamente ativo.	37
Figura 3.3	(a) Valores dos diedros visitados durante a simulação e (b) superfície de energia livre em kcal/mol para o T3-4 biologicamente inativo.	38
Figura 3.4	Alinhamento das sequências das proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3.	39
Figura 3.5	Alinhamento das sequências das proteínas 1HK4 e 1HK5.	40

Figura 3.6	Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA com o Ligante T4 representados na forma de superfície. O sítio de ligação é uma cavidade mais interna da HSA e estão representados o ligante T4 (superfície cor azul), e o resíduo de aminoácido 218 que sofre mutação.	41
Figura 3.7.	Superposição das estruturas das proteínas 1HK1 (azul), 1HK2 (rosa), 1HK3 (verde). São apresentados os ligantes T4 nos sítios Sudlow I, Sudlow II, FA5a e FA5b. O rmsd, calculado considerando os C α , entre as estruturas 1HK1 e 1HK2 foi igual a 0,293 Å e entre 1HK1 e 1HK3 foi igual a 0,284 Å.	41
Figura 3.8.	Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA com o Ligante T4. (A) proteína nativa 1HK1 e proteínas mutantes (B) 1HK2 (R218H) (C) 1HK3 (R218P). Aminoácidos em azul são carregados positivamente e os aminoácidos em vermelho, negativamente. Destaque para os resíduos 218.	43
Figura 3.9.	Sítio de Ligação Sudlow II da Proteína HSA com o Ligante T4. (A) proteína nativa 1HK1 e proteínas mutantes (B) 1HK2 (R218H) (C) 1HK3 (R218P). Aminoácidos em azul são carregados positivamente, negativamente. Observa-se que este sítio, que é conservado nas três proteínas.	43
Figura 3.10.	Sítio de Ligação FA5a das Proteínas HSA – 1HK1, 1HK2 (R218H), 1HK3 (R218P) – com o Ligante T4. Aminoácidos em azul são carregados positivamente. Também pode ser observado no destaque a superfície que representa a proteína HSA e a cavidade onde estão os ligantes T4 no sítio FA5a e a cavidade vizinha onde se encontra o ligante do sítio FA5b.	44
Figura 3.11.	Sítio de Ligação FA5b das Proteínas HSA – 1HK1, 1HK2 (R218H), 1HK3 (R218P) – com o Ligante T4. Neste sítio não foram observados aminoácidos carregados. Também pode ser observado no destaque a superfície que representa a proteína HSA e a cavidade onde estão os ligantes T4 no sítio FA5b e a cavidade vizinha onde se encontra o ligante do sítio FA5a.	44
Figura 3.12.	Esta é a fenda interdomínios, o Cleft . Pode ser observado que a proteína nativa 1HK4 e a proteína mutante 1HK5 são similares (rmsd = 0.4 Å, não considerando os resíduos 218 – R e H). Aminoácidos em azul são carregados positivamente e os aminoácidos em vermelho , negativamente. No destaque apresenta-se o ligante T4 no cleft distante do resíduo 218 (d > 8 Å).	45
Figura 3.13	Representação das interações π e das ligações de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA com o Ligante T4. (A) proteína nativa 1HK1 e proteínas mutantes (B) 1HK2 (R218H) (C) 1HK3 (R218P).	48
Figura 3.14	Representação das interações π e das ligações de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow II da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T4.	50
Figura 3.15.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5a da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T4.	51
Figura 3.16.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5b da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T4.	52
Figura 3.17.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Cleft da Proteína HSA nativa 1HK4 e a mutante 1HK5 (R218H) com o Ligante T4.	53
Figura 3.18.	Resultados dos experimentos de redocking, nas proteínas 1HK1 (rosa), 1HK2 (verde) e 1HK3 (azul) no sítio Sudlow I para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico em todos os casos.	57
Figura 3.19.	Resíduos arginina 218, histidina 218 e prolina 218 com o hormônio T4 (RX) com a superfície de van der Waals calculada para os três aminoácidos e o ligante cristalográfico.	58

Figura 3.20.	Resultados dos experimentos de redocking, nas proteínas 1HK1 (rosa), 1HK2 (verde) e 1HK3 (azul) no sítio Sudlow II para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico em todos os casos.	59
Figura 3.21.	Resultados dos experimentos de redocking, nas proteínas 1HK1 (rosa), 1HK2 (verde) e 1HK3 (azul) no sítio FA5a para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico em todos os casos.	60
Figura 3.22.	Resultados dos experimentos de redocking, na proteína 1HK2 (verde) no sítio FA5b para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico.	61
Figura 3.23.	Resultados dos experimentos de redocking, na proteína 1HK4 (marrom) e 1HK5 (azul) no Cleft para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico.	61
Figura 3.24.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA nativa 1HK1 com o Ligante T3.	68
Figura 3.25.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.	69
Figura 3.26.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA mutante 1HK3 (R218P) com o Ligante T3.	71
Figura 3.27.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow II da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.	73
Figura 3.28.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5a da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.	74
Figura 3.29.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5b da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.	75
Figura 3.30.	Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5b da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.	77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2. Materiais e Métodos		Página
Tabela 2.1	Estruturas tridimensionais selecionadas para o estudo, obtidas do PDB. T4 é o hormônio tiroxina; MYR é o ácido graxo, ácido místico	32
CAPÍTULO 3. Resultados E Discussão		
Tabela 3.1	Sequências das estruturas tridimensionais selecionadas para o estudo, obtidas do PDB 1HK1, 1HK2 e 1HK3	38
Tabela 3.2	Sequências das estruturas tridimensionais selecionadas para o estudo, obtidas do PDB 1HK4 e 1HK5	39
Tabela 3.3	Análise das interações intermoleculares dos complexos cristalográficos	46
Tabela 3.4	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com os iodos de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações com os átomos de iodo	49
Tabela 3.5.	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodos de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações com os átomos de iodo	49
Tabela 3.6.	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com os iodos de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações com os átomos de iodo	49
Tabela 3.7.	Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodos de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações com os átomos de iodo	50
Tabela 3.8.	Análise de Interação do Sítio FA5a da proteína 1HK2 com os iodos de T4. Em lilás interações com átomos de iodo e os resíduos em azul são carregados positivamente	52
Tabela 3.9.	Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodos de T4. Em lilás interações com átomos de iodo e os resíduos em azul são carregados positivamente	53
Tabela 3.10.	Análise de Interação do Cleft da proteína 1HK4 com os iodos do hormônio T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente, em vermelho os resíduos carregados negativamente e em lilás interações com átomos de iodo	55
Tabela 3.11.	Análise de Interação do Cleft da proteína 1HK5 (R218H) com os iodos do hormônio T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente, em vermelho os resíduos carregados negativamente e em lilás interações com átomos de iodo	55
Tabela 3.12.	Parâmetros determinados para os cálculos de docking	56
Tabela 3.13.	Constantes de dissociação para proteínas HSA complexadas com T4. Dados obtidos PETIPAS <i>et al.</i> , 2003	62
Tabela 3.14.	Resultados das somas dos experimentos de redocking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 nos quatro sítios de ligação para o hormônio T4 (RX)	63

Tabela 3.15.	Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 no Sudlow I para os ligantes T3 e T3IP	64
Tabela 3.16.	Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 no Sudlow II para os ligantes T3 e T3IP	64
Tabela 3.17.	Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 no FA5a para os ligantes T3 e T3IP	65
Tabela 3.18.	Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 no FA5b para os ligantes T3 e T3IP	65
Tabela 3.19.	Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK4 e 1HK5 no Cleft para os ligantes T3 e T3IP	66
Tabela 3.20.	Resultados das somas dos quatro sítios das proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 com o ligantes T4, T3 e T3 IP	66
Tabela 3.21.	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações dos átomos de iodo	68
Tabela 3.22.	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações dos átomos de iodo	70
Tabela 3.23.	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações dos átomos de iodo	73
Tabela 3.24.	Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente	75
Tabela 3.25.	Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente	76
Tabela 3.26.	Análise de Interação do Cleft com a proteína da 1HK4 com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente	77
Tabela 3.27.	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás interações com átomos de iodo	79
Tabela 3.28.	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-3. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás interações com átomos de iodo	79
Tabela 3.29.	Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás interações com átomos de iodo	79
Tabela 3.30.	Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2. Em lilás estão as interações com átomos de iodo	80
Tabela 3.31.	Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-3. Em lilás estão as interações com átomos de iodo	80
Tabela 3.32.	Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em lilás estão as interações com átomos de iodo	80
Tabela 3.33.	Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2 Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás interações com átomos de iodo	81

Tabela 3.34.	Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2. Em lilás estão as interações com átomos de iodo	81
Tabela 3.35	Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em lilás estão as interações com átomos de iodo	81
Tabela 3.36.	Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em lilás estão as interações com átomos de iodo	82
Tabela 3.37.	Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-3. Em lilás estão as interações com átomos de iodo	82
Tabela 3.38	Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em lilás estão as interações com átomos de iodo	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HSA	Albumina Sérica Humana
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
T3IP	Isômeros Posicionais de T3
CSD	Cambridge Structural Database
PDB	Protein Data Bank
<i>Kd</i>	Constante de Dissociação
<i>Ka</i>	Constantes de Associação
PLP	Função de Pontuação ChemPLP
MYR	Ácido Mírico
CFD	Dinâmica de Fluidos Computacional
HB	Ligação de Hidrogênio
<i>fchem-hb</i>	Termo de Ligação de Hidrogênio Dependente da Distância no Modelo
<i>fPLP</i>	A complementaridade estérica entre proteína e ligante
<i>flig-clash</i>	Pontuação interna do ligante consiste no potencial de choque de átomos pesados
<i>flig-tors</i>	Potencial torcional
<i>fchem-cov</i>	A formação de ligações covalentes proteína-ligante
<i>fchem-prot</i>	A flexibilidade das cadeias laterais
<i>fcons</i>	Moléculas de água explícitas, e outros constrains
<i>fchem-hb</i>	Ligação de hidrogênio (HB) dependente da distância
<i>fchem-cho</i>	Ligação de hidrogênio (HB) dependente do ângulo
<i>fchem-met</i>	Ligação metálica dependente da distância

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice 1.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com o ligante e os iodios de T4
- Apêndice 2.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T4
- Apêndice 3.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com o ligante e os iodios de T4
- Apêndice 4.** Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T4
- Apêndice 5.** Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com ligante e os iodios de T4
- Apêndice 6.** Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T4
- Apêndice 7.** Análise de Interação do Cleft da proteína nativa 1HK4 com o ligante e os iodios de T4
- Apêndice 8.** Análise de Interação do Cleft da proteína 1HK5 (R218H) com o ligante e os iodios de T4
- Apêndice 9.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com o ligante e os iodios de T3
- Apêndice 10.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3
- Apêndice 11.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com o ligante e os iodios de T3
- Apêndice 12.** Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3
- Apêndice 13.** Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3
- Apêndice 14.** Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3
- Apêndice 15.** Análise de Interação do Cleft da proteína nativa 1HK4 com o ligante e os iodios de T3
- Apêndice 16.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-2
- Apêndice 17.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-3
- Apêndice 18.** Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-4
- Apêndice 19.** Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-2
- Apêndice 20.** Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-3
- Apêndice 21.** Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-4
- Apêndice 22.** Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-2
- Apêndice 23.** Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-3
- Apêndice 24.** Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-4
- Apêndice 25.** Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-2
- Apêndice 26.** Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-3
- Apêndice 27.** Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-4

SUMÁRIO

	Página
Resumo	
Abstract	I
Lista de Figuras	II
Lista de Tabelas	III
Lista de Abreviaturas e Siglas	XI
Lista de Apêndices	XII
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 - Os Hormônios Tireoidianos T4 E T3	19
1.2 Proteína Transportadora Albumina Sérica Humana	22
1.2.1 Os Sítios de interação na Proteína HSA com Hormônio Tiroxina (T4)	24
1.3 OBJETIVOS	26
1.3.1 Objetivos Gerais	26
1.3.2 Objetivos Específicos	26
CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 Ligantes T4, T3 e isômeros posicionais de T3 – T3IP	29
2.2 Dinâmica molecular com ligantes T4, T3 e isômeros posicionais de T3 – T3IP	30
2.3 Proteína Transportadora Albumina Sérica Humana	31
2.3.1 Seleção e Preparação de Estruturas tridimensionais das Proteínas da HSA	31
2.4 O Docking Molecular	32
2.5 Análise de estruturas e de interações	34
Capítulo 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 Dinâmica molecular com ligantes T4, T3 e isômeros posicionais de T3 – T3IP	36
3.2 Alinhamento e homologia da estrutura tridimensional das proteínas transportadoras HSA	38
3.3 Os Sítios de Ligação das Proteínas HSA	40
3.4. Análise das Interações Cristalográficas	45
3.5 Estudos De Redocking	56

3.6 Estudo de Docking molecular com os ligantes T3 e T3IP	63
3.7. Análise das Interações do docking molecular com o ligante T3	67
3.8. Análise das Interações do docking molecular com os ligantes T3IP	78
CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	86

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

A biologia molecular moderna tem destacado com crescente ênfase a relevância das interações entre proteínas e hormônios no funcionamento do corpo humano. Essas interações não apenas regulam processos biológicos fundamentais, como crescimento e metabolismo, mas também desempenham um papel central na resposta do organismo a mudanças ambientais. Em particular, os hormônios tireoidianos, incluindo a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), desempenham papéis fundamentais para o controle do metabolismo basal.

A tiroxina é a 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (teraidotiroxina) é um dos hormônios sintetizados na glândula tireoide e são liberados na corrente sanguínea, junto com o hormônio o 3,5,3- tri-iodotironina (tri-iodotironina). Cerca de 93% dos hormônios liberados pela tireoide consiste, normalmente, de tiroxina, enquanto a tri-iodotironina corresponde aos outros 7%. Os dois, tanto o T3 e o T4 servem para regular o metabolismo (GUYTON *et al.*,2011).

A tireoide armazena quantidade suficiente de hormônios T3 e T4 para suprir o organismo humano cerca de 2 a 3 meses. Após a administração de uma grande quantidade de tiroxina em humanos, observa-se uma ausência de efeitos no metabolismo nos primeiros 2 a 3 dias, da tiroxina antes de sua ação começar. Quando a atividade se inicia, ocorre um aumento gradual, atingindo o pico entre 10 e 12 dias. Em seguida, a atividade começa a diminuir, com uma meia-vida de aproximadamente 15 dias. Parte desse efeito pode permanecer no organismo por até 6 semanas a 2 meses (GUYTON *et al.*,2011).

Os sintomas do hipotireoidismo, uma das principais doenças causadas pela falta desses hormônios, só aparecem após alguns meses de interrupção na produção dos hormônios tireoidianos, pois seus efeitos fisiológicos demoram a se tornar perceptíveis. Praticamente toda a tiroxina acaba sendo convertida em tri-iodotironina nos tecidos, tornando ambos os hormônios funcionalmente relevantes. Embora suas funções sejam qualitativamente semelhantes, diferem em termos de velocidade e intensidade de ação. Com o passar de alguns dias, aproximadamente metade da tiroxina é desiodada lentamente, gerando mais tri-iodotironina (GUYTON *et al.*,2011).

A Albumina Sérica Humana (HSA) é a proteína que faz o transporte de T3 e T4 na corrente sanguínea (LITWACK, 2018; LINDSEY *et al.*, 2018; FREIRE *et al.*, 2024).

A Albumina Sérica Humana (HSA) destaca-se como a proteína mais abundante no plasma humano, sendo responsável por transportar uma ampla gama de substâncias, entre elas hormônios, ácidos graxos e fármacos. A HSA possui múltiplos sítios de ligação, cada qual específico na interação com ligantes endógenos e exógenos, o que a coloca como uma peça central na regulação dos níveis de T4 e T3 no sangue. Essa função torna-se particularmente relevante quando é considerada a biodisponibilidade dos hormônios tireoidianos como um fator crucial na modulação de processos metabólicos (FASANO *et al.*, 2005, PEPTIPAS *et al.*, 2024). Modificações na conformação da HSA, seja decorrente de mutações genéticas ou de interações com outros ligantes, pode ter consequências significativas para o transporte eficaz de T4 e T3, potencialmente levando a desordens metabólicas (LITWACK, 2018; FREIRE *et al.*, 2024).

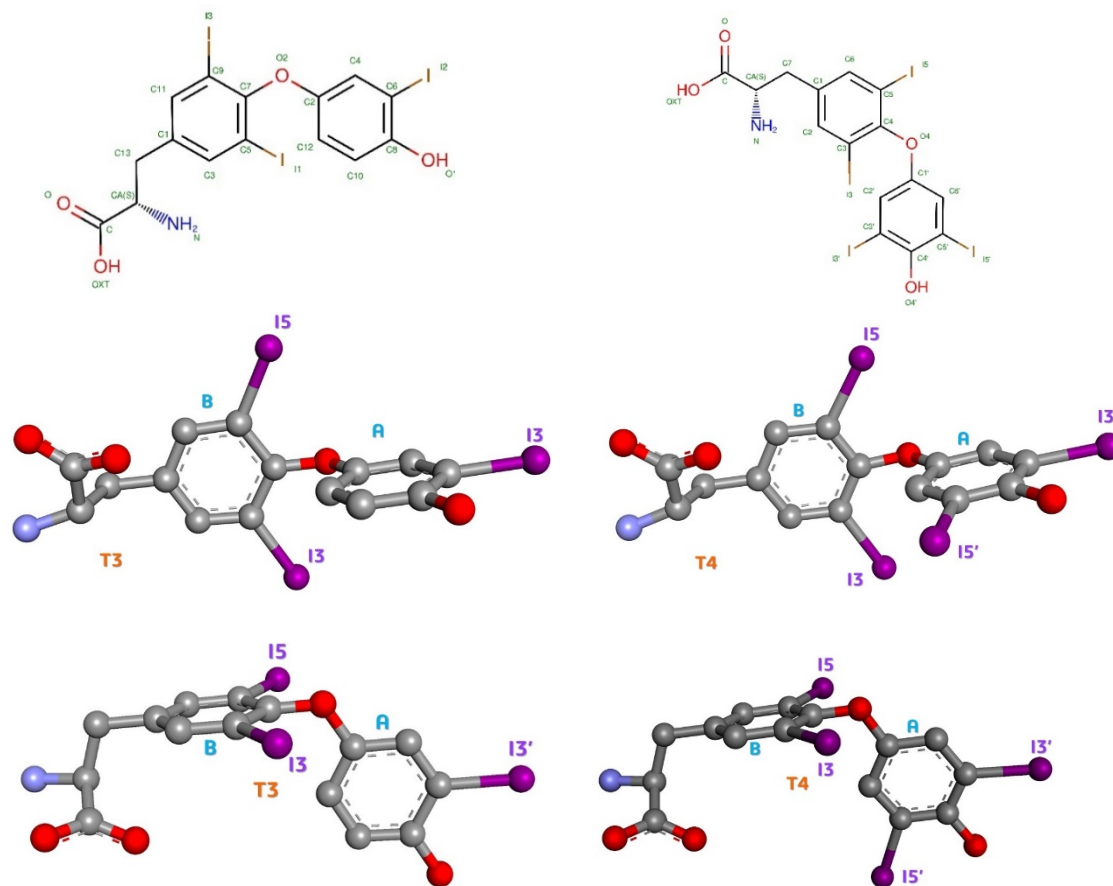
O estudo presente adota uma abordagem *in silico*, utilizando o docking molecular e para entender, simular e prever as interações entre T4, T3 e seus isômeros posicionais com a HSA. O docking molecular foi empregado para prever como os ligantes se posicionam nos sítios de ligação das proteínas, oferecendo uma visão sobre a formação de complexos proteína-ligantes, permitindo inferir sobre a afinidade dos ligantes às proteínas.

No Capítulo 2, trata de Materiais e Métodos utilizados neste trabalho. O Capítulo 3, mostra os resultados obtidos do estudo referente aos hormônios T3 e T4 com a proteína Albumina Sérica Humana (HSA). No Capítulo 4 são apresentadas as Conclusões do trabalho.

1.1 - Os Hormônios Tireoidianos T4 E T3

Os hormônios tireoidianos (TH) desempenham papéis específicos no crescimento, desenvolvimento e metabolismo em vários tecidos humanos, assim como em modelos animais experimentais. A presença dos TH é crucial durante o desenvolvimento do esqueleto, o crescimento ósseo linear, a manutenção da massa óssea e a cicatrização eficaz de fraturas (BASSETT *et al.*, 2016).

A Figura 1.1 apresenta as estruturas dos hormônios (TH) T3 e T4.



Nome IUPAC: (2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3-iodophenoxy)-3,5-diiodo-phenyl] propanoic acid

Outros nomes:

3,5,3'triiodotironina

Triiodotironina, T3

Nome IUPAC: (2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-diiodophenoxy)-3,5-diiodophenyl] propanoic acid

Outros nomes:

3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina

Tiroxina, T4

Figura 1.1. Estrutura dos Hormônios T3 (C₁₅H₁₂I₃NO₄) e T4 (C₁₅H₁₁I₄NO₄) que serão estudados na formação de complexos com a HSA e TR, apresentados em sua forma 2D e 3D. As figuras 3D são apresentadas em duas orientações diferentes. Em destaque estão os átomos de iodo e os 2 anéis: A (um anel externo que contém um grupo hidroxila) e B (anel interno). Os átomos de H estão omitidos.

O principal produto secretado pela glândula tireoide é o pró-hormônio tiroxina (T4), que requer conversão em 3,3',5-triiodotironina (T3) por meio da remoção de um átomo de iodo do anel externo, permitindo sua ligação aos receptores nucleares T3 (Figura 1.2). A conversão da tiroxina (T4) para sua forma biologicamente ativa, a triiodotironina (T3) é realizada pela enzima 5'-deiodinase. O hormônio tireoidiano fica inativado ao remover um

átomo de iodo pela ação da enzima 5-deiodinase, gerando o T3 reverso (HUANG & CASTRONEVES, 2010).

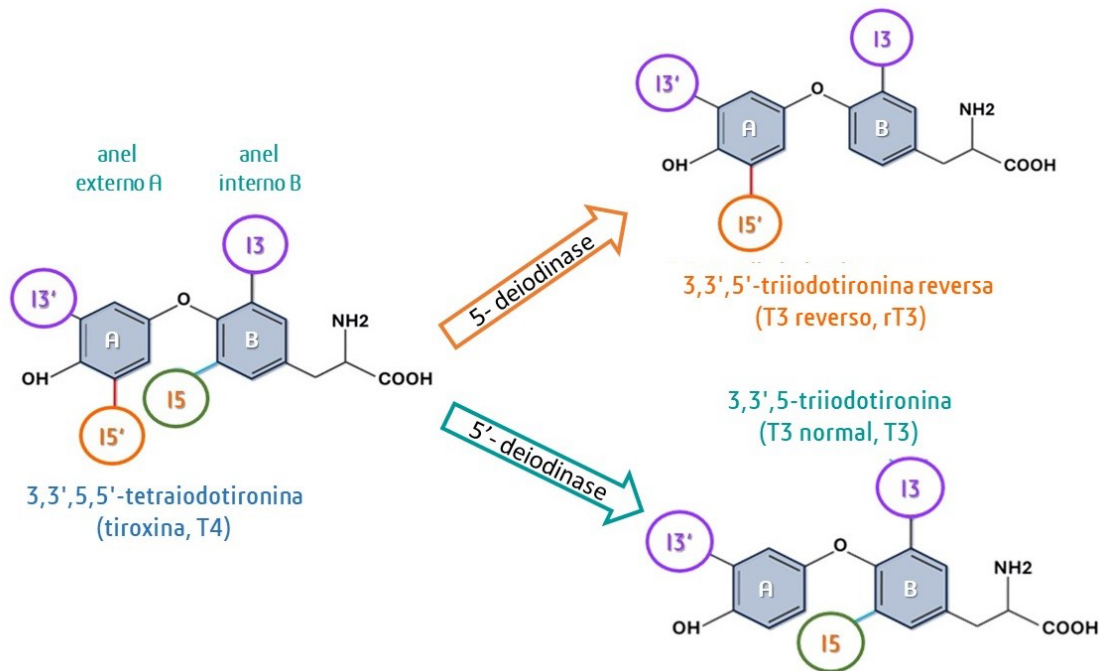


Figura 1.2. Esquema dos processos ocorridos na conversão da tiroxina (T4) para sua forma biologicamente ativa, a triiodotironina (T3), ou em suas formas inativas.

A tireoide, uma glândula localizada no pescoço, é responsável pela produção dos hormônios T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina), que controlam várias funções vitais do corpo, incluindo o ritmo cardíaco, o funcionamento do intestino, a concentração mental, a regularidade do ciclo menstrual e a respiração celular. Esses hormônios têm um papel fundamental desde o desenvolvimento intrauterino, ajudando na formação adequada do sistema nervoso central do feto (NUNES, 2003).

Entre os principais problemas de saúde relacionados à tireoide estão desequilíbrios na produção hormonal, podendo causar hipertireoidismo (produção excessiva) ou hipotireoidismo (produção insuficiente), além de alterações na estrutura da glândula, como o surgimento de nódulos ou até câncer. Aproximadamente 5% das pessoas apresentam problemas na produção de hormônios, sendo o hipotireoidismo o mais comum, e cerca de 10% dos adultos têm nódulos palpáveis na tireoide. Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 750 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem com problemas na tireoide, mas aproximadamente 60% desconhecem essa condição. Isso

reforça a importância de disseminar informações sobre a saúde da tireoide, para que mais pessoas tenham acesso a esse conhecimento (EBSERH, 2024).

Os hormônios tireoidianos (TH) se ligam a três proteínas principais para o transporte no soro: a globulina ligadora de tiroxina (TBG), a transtirretina (TTR) e a albumina sérica humana (HSA). Dentre essas, a TBG apresenta a maior afinidade pelos hormônios tireoidianos, enquanto a HSA é a proteína mais abundante no plasma (PAPPA *et al.*, 2015). Os hormônios tireoidianos livres mantêm um equilíbrio com as proteínas transportadoras. Portanto, qualquer alteração na quantidade ou qualidade dessas proteínas impacta diretamente a farmacocinética e a farmacodinâmica dos hormônios tireoidianos. (KRAGH-HANSEN *et al.*, 2017, MAHENDHAR *et al.*, 2018).

1.2 Proteína Transportadora Albumina Sérica Humana

A HSA tem sido amplamente investigada por diversos grupos por meio de métodos experimentais úmidos (PETIPAS *et al.*, 2003; ASCENZI *et al.*, 2015; AL-HARTHI *et al.*, 2019). A proteína HSA desempenha um papel crucial na regulação hormonal, incluindo a interação com os hormônios tireoidianos T3 e T4, o que é essencial para a modulação das funções metabólicas e do crescimento celular. O BioMat (Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas – UFSCar) tem utilizado métodos de docking molecular e de dinâmica molecular para simular as interações intermoleculares e prever alterações conformacionais na HSA, oferecendo valiosos insights sobre sua estrutura e função (VENTURINI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019; YOGUIM *et al.*, 2022; FREIRE *et al.*, 2024).

A Albumina Sérica Humana (HSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo e é sintetizada no fígado a partir da proalbumina, que inicialmente se forma como pré-proalbumina no retículo endoplasmático dos hepatócitos (RABBANI & AHN, 2019). Essa proteína desempenha um papel crucial na modulação da distribuição de fluidos entre os compartimentos corporais e é o principal determinante da pressão oncótica plasmática (FANALI *et al.*, 2012).

A afinidade pela HSA desempenha um papel crucial na distribuição e na concentração ativa de diversos compostos no corpo. Uma certa afinidade pela albumina é

benéfica, pois ajuda a solubilizar substâncias que poderiam, de outra forma, formar agregados e ter uma distribuição limitada. Em contrapartida, compostos com alta afinidade pela albumina podem precisar de doses maiores para alcançar concentrações efetivas no organismo, ser distribuídos mais lentamente aos locais de ação e ter uma eliminação menos eficaz (FASANO *et al.*, 2005).

A primeira estrutura tridimensional da HSA foi obtida por difração de Raios X por Carter e He, e suas coordenadas estão disponíveis no PDB (Protein Data Bank), sob o código 1UOR com uma resolução de 2.8 Å (CARTER *et al.*, 1990). A estrutura da HSA consiste em três domínios homólogos basicamente constituídos de hélices alfa, sendo estes: I (resíduo 1-196), II (resíduo 197-383) e III (resíduo 384-585), conforme pode ser observado na Figura 1.3, os quais não são topologicamente idênticos, sendo que cada domínio compreende dois subdomínios que possuem motivos estruturais comuns. A proteína contém 17 ligações dissulfeto e uma cisteína livre (Cys34).

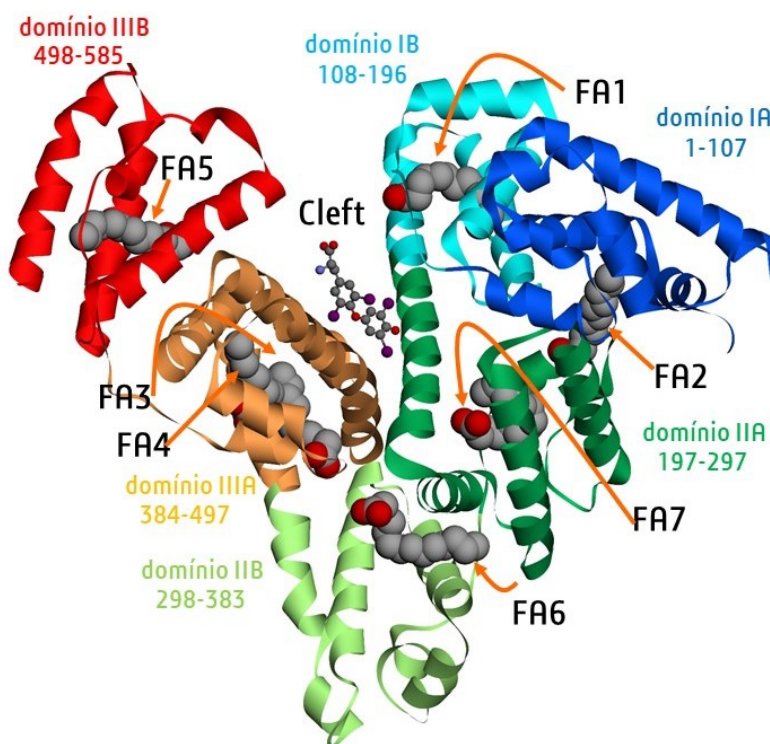


Figura 1.3. Modelo mostrando cada domínio (numerais romanos) e subdomínios (letras A e B) da HSA com os resíduos de aminoácidos numerados. Também estão indicados os sítios de ácidos graxos (FA) de 1 a 7.

A HSA possui uma versatilidade de ligação que permite atuar como transportador de uma ampla variedade de compostos endógenos e exógenos, como íons inorgânicos, bilirrubina, vitaminas, hormônios e esteroides (ASCENZI *et al.*, 2006, CHUGH *et al.*, 2019). A estrutura multidomínios da HSA, composta por uma única cadeia polipeptídica de 585 aminoácidos e estabilizada por 17 ligações dissulfeto, confere a essa proteína a capacidade de se ligar a vários ligantes e desempenhar diversas funções fisiológicas (ZUNSZAIN *et al.*, 2008; ASCENZI & FASANO, 2010).

A HSA se destaca como transportador de ácidos graxos de cadeia longa, modulando indiretamente seu metabolismo, e por essa característica, os sítios de ligação da HSA podem ser classificados quanto à sua capacidade de ligação com ácidos graxos (FA), conforme pode ser observado na Figura 1.3. Sudlow e seus colaboradores, por outro lado, propuseram outra classificação (Figura 1.4) relacionando com sítios onde podem ligar-se fármacos (GHUMAN *et al.*, 2005).

O Sítio Sudlow I coincide com os sítios de ácidos graxos, FA7, situado no subdomínio IIA. Por exemplo, é sabido que este sítio é preferencial para o fármaco Varfarina, e outros compostos heterocíclicos (ASCENZI *et al.*, 2015).

O sítio Sudlow II é menor que o sítio Sudlow I e coincide com os sítios FA3 e FA4. Os ligantes que possuem afinidade a essa região são os ligantes que possuem ácidos carboxílicos aromáticos, como por exemplo: ibuprofeno, ácido flufenâmico, propofol diflunisal e diazepam (GHUMAN *et al.*, 2005; ASCENZI *et al.*, 2006). O sítio III de fármacos coincide com FA1, fica localizado no subdomínio IB, sendo um sítio relativamente aberto, ocasionando desse modo uma acessibilidade do solvente à região (AL-HARTHI *et al.*, 2019; ASCENZI *et al.*, 2015).

1.2.1 Os Sítios De Interação Na Proteína Hsa Com Hormônio Tiroxina (T4)

Quatro moléculas do ligante T4 se ligam à HSA nativa, nos sítios de ligação Sudlow I, Sudlow II, FA5a e FA5b (PETITPAS *et al.*, 2003) (Figura 1.4).

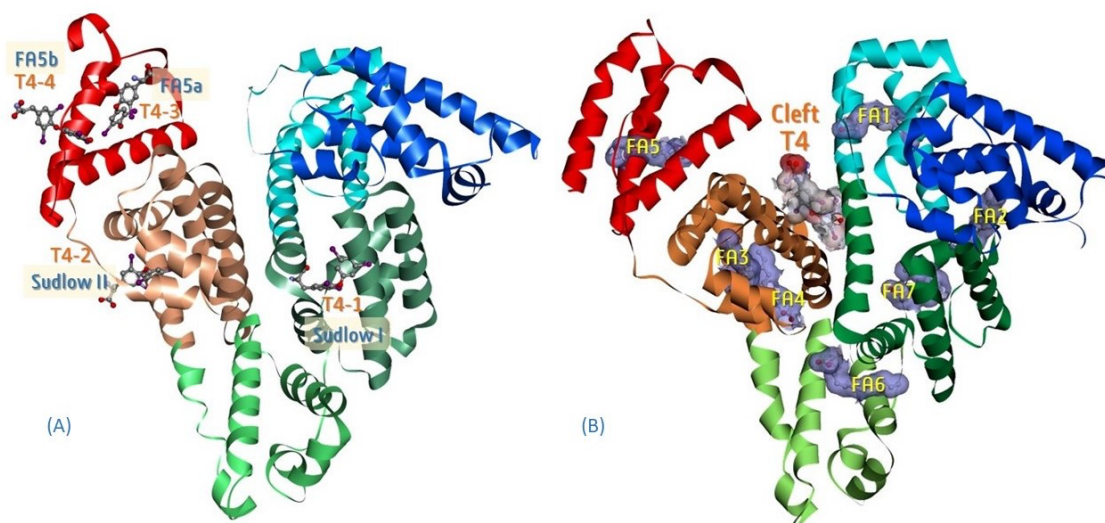


Figura 1.4. Comparação dos complexos estruturais HSA–T4 **(A)** livres de ácidos graxos que apresenta quatro sítios de ligação para T4 – Sudlow I, Sudlow II, FA5a e FA5b; **(B)** com a presença de ácidos graxos e apresenta apenas um sítio para T4 no cleft (fenda).

Quando a tiroxina (T4) se liga ao sítio Sudlow I (FA7) assume uma conformação na qual tanto o ácido aminopropiônico quanto o anel fenólico externo estão posicionados no mesmo lado do anel aromático interno da molécula. Essa conformação surge por limitações estéricas resultantes da presença dos resíduos W214, R218 e R222, que se estendem a partir da hélice e impede a rotação do ácido aminopropiônico do ligante T4. Ao contrário, os outros três sítios que interagem com o ligante T4 assumem uma conformação onde o ácido aminopropiônico e o anel fenólico externo estão posicionados em lado opostos (WOJTCZAK *et al.*, 2001; PETITPAS *et al.*, 2003; ASCENZI *et al.*, 2015).

Se sobrepondo à fenda FA3-FA4 (subdomínio IIIA) se encontra o sítio Sudlow II. Embora o subdomínio IIIA seja capaz de acomodar duas moléculas de ácidos graxos e de se ligar a fármacos, o T4 não consegue penetrar completamente, ligando-se apenas à entrada do sítio FA4 (ASCENZI *et al.*, 2015). O hormônio T4 pode ligar-se a dois sítios localizados no subdomínio IIIB, o FA5a e FA5b. O sítio FA5b está localizado em uma parte muito flexível da proteína HSA, essa flexibilidade dificulta a obtenção de uma densidade eletrônica bem definida (PETITPAS *et al.*, 2003; ASCENZI *et al.*, 2015).

Na fenda entre os domínios I e III, se encontra o sítio de ligação Cleft (Fenda). Aqui este sítio será tratado assim – cleft, pois é o nome comumente da literatura, assim como Sudlow I ou Sudlow II, FA (ácidos graxos) (PEPTIPAS *et al.* 2003).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos Gerais

Os objetivos gerais desse trabalho foram o de investigar os modos de ligação e as interações moleculares entre os hormônios tireoidianos (T4, T3 e os isômeros posicionais de T3 - T3IP) e a Albumina Sérica Humana (HSA) ampliando o conhecimento sobre as propriedades de ligação dos compostos endógenos T3 e T4 na albumina sérica humana HSA, uma proteína multidomínios (Peptipas *et al*, 2003). Como não há estrutura cristalográfica com complexo HSA com T3, este resultado pode fornecer mais conhecimentos sobre o transporte de T3 pela proteína HSA. As estruturas tridimensionais (complexos HSA-T4) existentes no PDB mostram o posicionamento do hormônio com e sem a presença de ácidos graxos. Dada a similaridade das estruturas dos ligantes, T4 e T3 (um átomo de iodo de diferença), pode-se estudar detalhadamente as diferenças entre as interações dos complexos, obtidos por docking molecular, utilizando também a observação em tela gráfica. Estes resultados serão comparados com os valores experimentais das constantes de ligação dos hormônios T3 e T4 (MIMOTO & REFETOFF, 2020) quando se complexam com a HSA, e que mostram uma ordem de grandeza de diferença (T4, $K_a = 1 \times 10^{10}$; T3, $K_a = 1 \times 10^9$).

Também foram feitos estudos no sentido de entender como uma mutação no resíduo R218 pode promover diferença de afinidade proteínas-T4. Estes resultados serão comparados com os valores experimentais das constantes de dissociação (K_d) do hormônio T4 (PETITPAS *et al.*, 2003) quando se complexam com as proteínas HSA, 1HK1, 1HK2 (R218H), 1HK3 (R218P), 1HK4 e 1HK5 (R218H).

1.3.2 Objetivos Específicos

Com este estudo, pretende-se responder a algumas questões, do ponto de vista estrutural.

A primeira pergunta a ser respondida é sobre como a HSA consegue diferenciar T4 de T3. Dados da literatura mostram diferentes constantes de afinidade para os dois hormônios

em relação à HSA. Os estudos de docking que evidenciam dados estruturais HSA-T4 3 HSA-T3 conseguem refletir essa situação?

A segunda pergunta diz respeito a diferenças encontradas para as afinidade entre HSA-T4 para as proteínas nativa (1HK1, sem ácidos graxos e 1HK4, com ácidos graxos) e mutantes (1HK2 e 1HK3, sem ácidos graxos e 1HK5, com ácidos graxos). Os estudos estruturais conseguem, mais uma vez, considerando dados estruturais dos complexos refletir as diferenças?

A terceira pergunta refere-se aos ligantes T3. O hormônio T3 difere de T4 em um iodo, com posição específica. Como há 4 iodios presentes em T4, foram avaliados 4 isômeros posicionais de T3. Os estudos estruturais podem mostrar se estes compostos são diferentes para a HSA?

CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este tópico apresenta os procedimentos utilizados nos experimentos *in silico* para investigar os complexos HSA (e variantes) com os hormônios tireoidianos T4, T3 e os T3IP. A primeira questão foi a de obter a estrutura dos ligantes T4 e T3 descritos no capítulo anterior. No caso da proteína HSA, foi necessário entender os complexos moleculares: alinhar as sequências, analisar as estruturas cristalográficas, analisar as interações intermoleculares, realizar estudo de docking molecular e a subsequente análise das interações intermoleculares após a seleção das poses obtidas nos cálculos.

A Figura 2.1 mostra as etapas desenvolvidas no estudo desenvolvido.

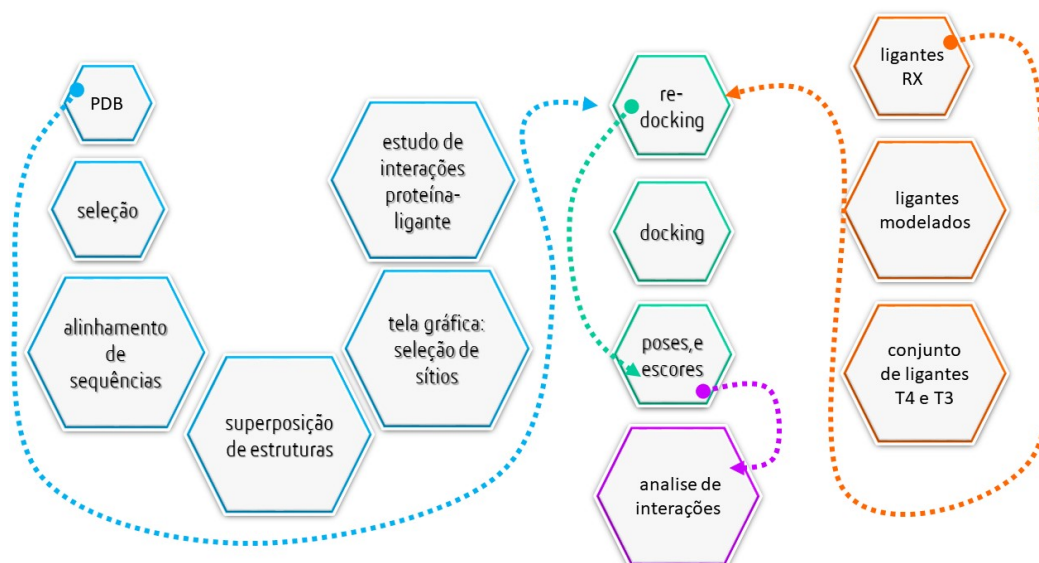


Figura 2.1. Passos principais do estudo realizado: **proteínas**, **ligantes**, **docking** e **análise de interações**.

Os experimentos *in silico* foram desenvolvidos no BioMat – Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas, do Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

2.1 Ligantes T4, T3 e isômeros posicionais de T3 – T3IP

Neste estudo foram considerados os ligantes cristalográficos T4 e T3, além dos isômeros posicionais de T3 (T3IP)

A estrutura do hormônio T4 foi obtida do complexo HSA-T4 de código pdb 1HK1, e do composto cristalográfico obtido do CSD (Cambridge Structural Database), de código TYRXEA10 (CODY, 1981), mostrado na Figura 2.2. Os isômeros posicionais de T3 foram gerados por modelagem molecular usando o DSVisualizer 3.5, utilizando a estrutura do T4 (TYRXEA10) como molde inicial (T3, T3-2, T3-3 e T3-4).

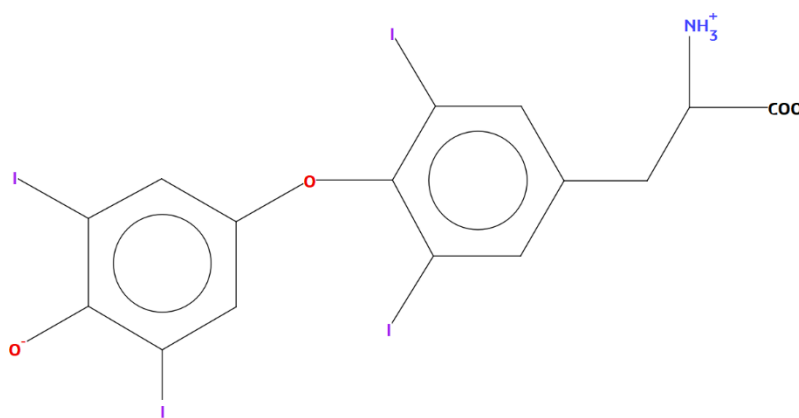


Figura 2.2. Diagrama do ligante T4, obtido do CSD, de código TYRXEA10.

O hormônio T4, a tiroxina, possui quatro átomos de iodo em sua estrutura, distribuídos em dois anéis aromáticos (A e B) (Figura 2.3), o que lhe confere maior polarizabilidade e estabilidade nas interações moleculares. No anel A estão os iodos I3' e I5' e no anel B os iodos I3 e I5. O hormônio T3, ou triiodotironina, que é a forma biologicamente ativa do hormônio tireoidiano, possui um átomo de iodo a menos em relação ao T4, no anel aromático A. Já o T3 reverso que é biologicamente inativo é no anel B o iodo ausente. Os isômeros T3IP foram construídos para explorar como a ausência de átomos de iodo, com relação à T4, em diferentes posições afeta a afinidade de ligação e a interação com as proteínas.

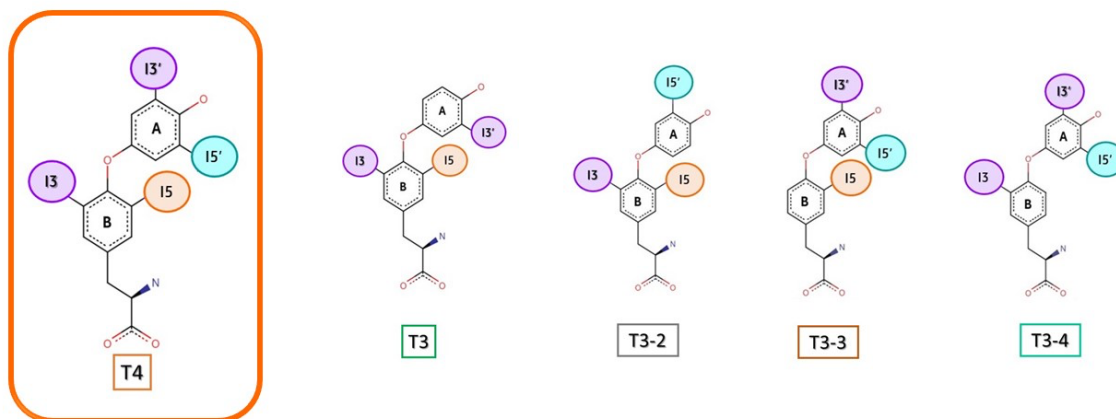


Figura 2.3. Estrutura dos ligantes do hormônio T4, do T3 (**T3 normal**), e os ligantes isômeros posicionais T3IP denominados, T3-2, T3-3 e T3-4 (**T3 reverso**). Em destaque estão os átomos de I e os 2 anéis: A (um anel externo que contém um grupo hidroxila) e B (anel interno). Os átomos de H estão omitidos.

Nos ligantes T3 e T3-2, o átomo de iodo ausente se está no anel aromático A, sendo o I5' ausente em T3 e o I3' ausente em T3-2. Já nos ligantes T3-3 e T3-4, o iodo ausente está no anel aromático B, onde o I3 está ausente em T3-3 e o I5 está ausente em T3-4.

2.2 Dinâmica molecular com ligantes T4, T3 e isômeros posicionais de T3 – T3IP

Foi realizado dinâmica molecular nas moléculas dos hormônios T4, T3 biologicamente ativa e T3-4 biologicamente inativa para estudar as combinações possíveis dos diedros que conectam o anel B ao anel A (Figura 2.4). Para isso, o sistema foi construído como uma caixa com condições periódicas de contorno, introduzindo as moléculas a serem estudadas e o volume preenchido com moléculas de água e íons de Na⁺ e Cl⁻, atingindo uma concentração 0,15 M e neutralizando as cargas do sistema.

O sistema foi equilibrado no ensemble NPT por 1 ns. Em seguida, para melhorar a amostragem dos possíveis estados dos diedros e calcular a energia livre para essas duas variáveis, o método OPES (On-the-fly Probability Enhanced Sampling Method) (RAHIMI, *et al.* 2023). Este método é baseado em ajustar dinamicamente a probabilidade de amostrar diferentes configurações de um sistema, de forma a explorar mais eficientemente o espaço

de configurações e superar barreiras energéticas. Aqui são escolhidas variáveis coletivas dos sistemas para as quais a função será construída. Neste, os diedros ϕ e ψ foram escolhidos como variáveis coletivas e tiveram sua dinâmica acelerada pelo algoritmo do OPES.

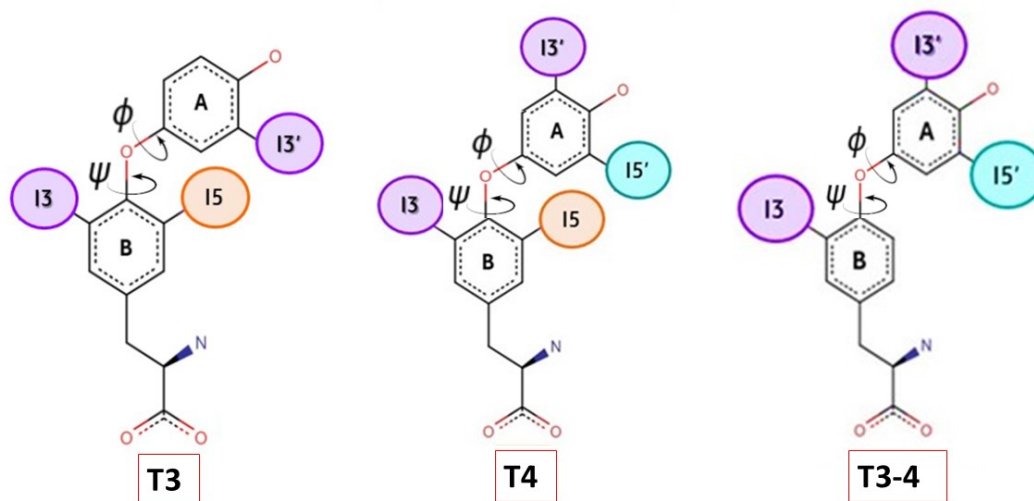


Figura 2.4. Estrutura dos hormônios T4, T3 e T3-4 com os dois diedros ϕ e ψ que conectam o anel B ao anel A.

2.3 Proteína Transportadora Albumina Sérica Humana

2.3.1 Seleção e Preparação de Estruturas tridimensionais das Proteínas da HSA

A preparação das estruturas proteicas foi uma etapa fundamental para a execução dos experimentos *in silico*, abrangendo as proteínas transportadoras da Albumina Sérica Humana (HSA).

As estruturas tridimensionais das proteínas de interesse foram obtidas a partir do Protein Data Bank (PDB). Os Complexos HSA-T4, selecionados para o estudo estão apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Estruturas tridimensionais selecionadas para o estudo, obtidas do PDB. T4 é o hormônio tiroxina; MYR é o ácido graxo, ácido místico

proteína	sítios para T4	nativa ou mutante	MYR	resolução (Å)	referência
1HK1	4	nativa	não	2.65	Peptipas <i>et al.</i> , 2003
1HK2	4	R218H	não	2.80	
1HK3	4	R218P	não	2.80	
1HK4	1	nativa	7	2.40	
1HK5	1	R218H	7	2.70	

As proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 possuem quatro ligantes T4 posicionados da mesma forma em 4 sítios de ligação distintos e equivalentes, e as 1HK4 e 1HK5 têm apenas um ligante T4 no complexo, e, todos os ácidos graxos que ocupam sítios equivalentes nas duas estruturas.

Todo o estudo foi feito levando em conta dois grupos de complexos sem ácidos graxos (1HK1, 1HK2 e 1HK3) e os complexos com ácidos graxos (1HK4 e 1HK5).

Foi feito o alinhamento de sequências, utilizando as facilidades do programa DSVvisualizer, depois a superposição das estruturas tridimensionais das moléculas.

2.4 O Docking Molecular

Para realizar os cálculos de docking, o programa utilizado foi o **GOLD 2024.1.0** (The Cambridge Crystallographic Data Centre–CCDC), baseado em algoritmos genéticos (JONES *et al.*, 1995, JONES *et al.*, 1992, CLARK *et al.*, 1989).

A função score utilizada foi o ChemPLP (SAPUNDZHI, PRODANOVA, & LAZAROVA, 2019), baseada em funções empíricas, é a função fitness padrão para a atribuição de scores, e o uso desta função de ajuste permite obter diferentes soluções. PLP, do inglês Piecewise Linear Potential, representa Potencial Linear por Partes, representada pela função de ajuste ChemPLP, onde todos os átomos de proteína e ligante são introduzidos como doador, aceitador, doador/aceitador ou apolar.

São considerados vários potenciais para as ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e de repulsão.

$$\text{ChemPLP} = f_{PLP} + f_{lig-clash} + f_{lig-tors} + f_{chem-cov} + f_{chem-prot} + f_{cons} + f_{chem-hb} + f_{chem-cho} + f_{chem-met}$$

função	considera
f_{PLP}	→ a complementaridade estérica entre proteína e ligante
$f_{lig-clash}$	→ pontuação interna do ligante consiste no potencial de choque de átomos pesados
$f_{lig-tors}$	→ potencial torcional
$f_{chem-cov}$	→ a formação de ligações covalentes proteína-ligante
$f_{chem-prot}$	→ a flexibilidade das cadeias laterais
f_{cons}	→ moléculas de água explícitas, e outros <i>constrains</i>
$f_{chem-hb}$	→ ligação de hidrogênio (HB) dependente da distância
$f_{chem-cho}$	→ ligação de hidrogênio (HB) dependente do ângulo
$f_{chem-met}$	→ ligação metálica dependente da distância

Como o ChemPLP é tomado como sendo o negativo da soma dos termos de energia, quanto maior o valor do escore, melhor.

Para as três proteínas transportadoras da HSA (1HK1, 1HK2 e 1HK3) sem ácidos graxos, o procedimento de redocking foi realizado nos quatro sítios de ligação, Sudlow I, Sudlow II, FA5a e FA5b. Já para as outras HSA com ácidos graxos (1HK4 e 1HK5), o redocking consistiu em avaliar apenas um sítio. Para todas estas proteínas o ligante é T4.

Em todos os cálculos de docking realizados, os ligantes foram flexíveis e as proteínas foram mantidas rígidas. As águas foram descartadas, uma vez que a análise mostrou que não havia interações com os ligantes. Também foram descartados os ácidos graxos (FA) no caso das proteínas 1HK4 e 1HK5.

O início do estudo consiste em realizar o redocking. O redocking é o processo de reconstruir o complexo cristalográfico a partir da proteína e do ligante isolados (Figura 2.5). É um experimento *in silico*, no qual são determinados os melhores parâmetros para conseguir um modelo similar à estrutura PDB. Assim determina-se o melhor raio para a seleção do sítio onde será colocado o ligante, se as protonações são necessárias ou não, moléculas de água – se devem ou não ser consideradas. Após o redocking são realizados os experimentos de docking com os outros ligantes.

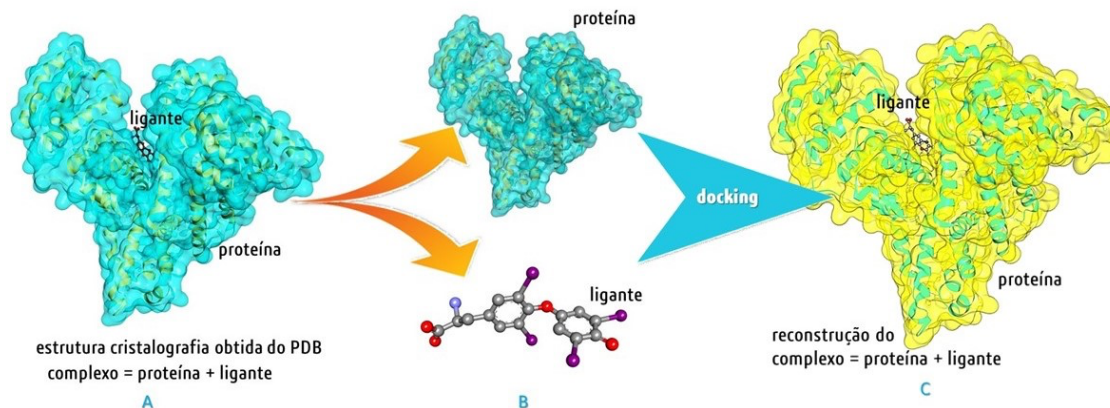


Figura 2.5 Redocking: As moléculas do complexo obtido no PDB são separadas e um complexo é reconstruído por meio de docking molecular. Neste processo são determinados os parâmetros necessários para isso.

O docking molecular foi empregado para prever a formação de complexos entre os hormônios tireoidianos T4 e T3 e os T3IP, e as proteína transportadora da Albumina Sérica Humana (HSA) e seus mutantes na presença e na ausência de ácidos graxos.

As conformações geradas pelo docking foram avaliadas utilizando a função de pontuação ChemPLP, que atribui um valor de score a cada conformação, indicando a adequação e a estabilidade da interação ligante-proteína. Para cada proteína e ligante, foram geradas até 10 conformações distintas, e os complexos resultantes foram analisados por visualização molecular, utilizando o software DSVisualizer 3.5. Os cálculos resultaram em várias poses de docking e a avaliação das afinidades relativas de ligação dos ligantes nos diferentes sítios de ligação das proteínas estudadas. Após a seleção das melhores poses, foram feitos estudos sobre as interações entre os hormônios tireoidianos e suas proteínas alvo, contribuindo de forma significativa para os resultados discutidos nos capítulos subsequentes.

2.5 Análise de estruturas e de interações

Todas as estruturas obtidas do pdb, as interações não-covalentes e as poses obtidas do estudo de docking, foram avaliadas com o programa DSVisualizer3.5.

Na análise de interações não covalentes, foram consideradas as interações de van der Waals, se empregaram os valores dos raios de van der Waals, as ligações e hidrogênio e as interações π .

Para completar a análise das interações (envolvendo as ligações de hidrogênio e interações de van der Waals) que é feita por visualização molecular, a análise das interações π foi realizada com o programa WIM baseado em mapeamento vetorial (SACCO, 2013., SACCO *et al.*, 2019), de forma a caracterizar esse tipo de interações, com a possibilidade de medir ângulos e distâncias das interações π .

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos para os experimentos *in silico*, das cinco proteínas da Albumina Sérica Humana (HSA) com os ligantes T4, T3 seus isômeros posicionais. Neste ponto é necessário destacar, que os resultados de docking são avaliados pelas poses obtidas (conformação, posição e orientação da molécula no sítio de ligação em estudo). Os escores resultantes dos experimentos de simulação de docking, em geral não costumam ser absolutos na análise dos complexos. Porém, nestes casos avaliados, dada a similaridade das proteínas e dos ligantes, o escore foi considerado. Também foi tomado como uma indicação da afinidade de ligação do ligante à proteína, por isso, relacionamos aqui diretamente, escore com *afinidade de ligação*.

3.1 Dinâmica molecular com ligantes T4, T3 e isômeros posicionais de T3 – T3IP

O método OPES possibilitou uma rápida convergência da superfície de energia livre. Esta se mostrou estável a partir de 3 ns de simulação, revelando combinações dos diedros em questão com energia livre mínima e regiões de alta energia, os quais não foram visitados para o intervalo de energia considerado. Para as situações em que o anel B possui os iodios I3 e I5 (T4, T3 e T3-2), existe uma simetria rotacional de aproximadamente 1,57 rad (180°) para máximos e mínimos de energia. Especialmente para regiões próximas da coordenada ($0 \pm 1,57$, $0 \pm 1,57$) (Figuras 3.1 e 3.2) é possível notar uma vacância de pontos nos dois gráficos, mostrando que essas regiões precisariam de energia maior de 10 kcal/mol para serem visitadas. Isso pode ser interpretado como um efeito do impedimento estérico entre os iodios I3 e I5 do anel B e os hidrogênios mais próximos no anel A.

Já para situações em que existe apenas um iodo no anel B (T3-3 e T3-4), o corre um alargamento das regiões de mínima energia, e a simetria das regiões não visitadas passam a ser de aproximadamente 3,14 na direção horizontal (Figura 3.3). Nestes casos, as regiões proibidas se limitarão a situações em que o iodo do anel B encontra um hidrogênio no anel A. Já as novas regiões de alta energia livre, porém ainda visitadas, serão de coordenadas onde um hidrogênio do anel A se aproxima de um hidrogênio do anel B. Neste caso, a

repulsão estérica é menor pois os hidrogênios não se superpõem, como no caso da interação com o Iodo. Estes resultados corroboram as análises feitas por.

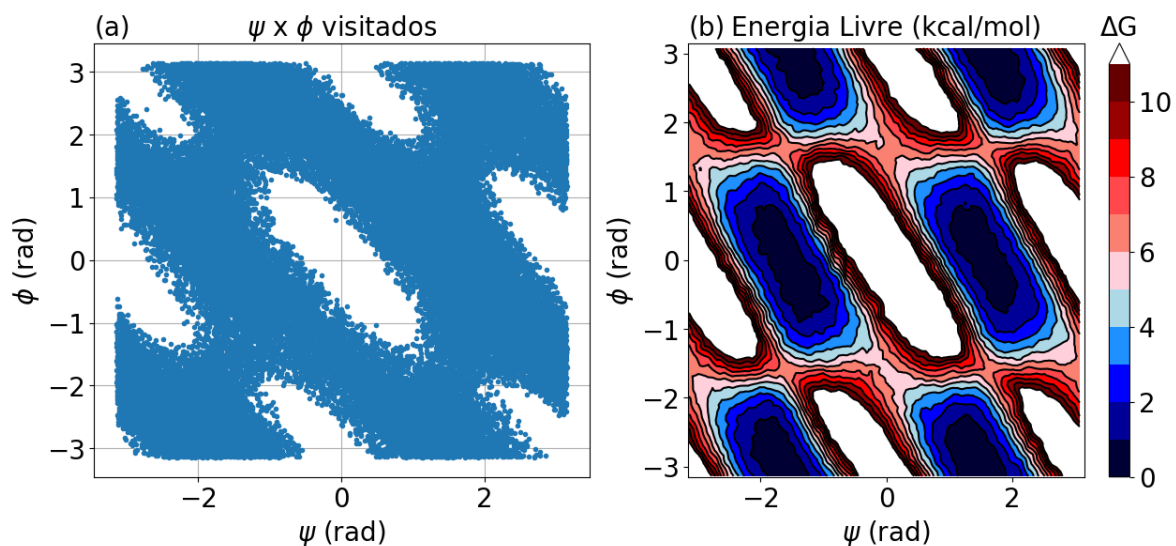


Figura 3.1: (a) Valores dos diedros visitados durante a simulação e (b) superfície de energia livre em kcal/mol para o T4.

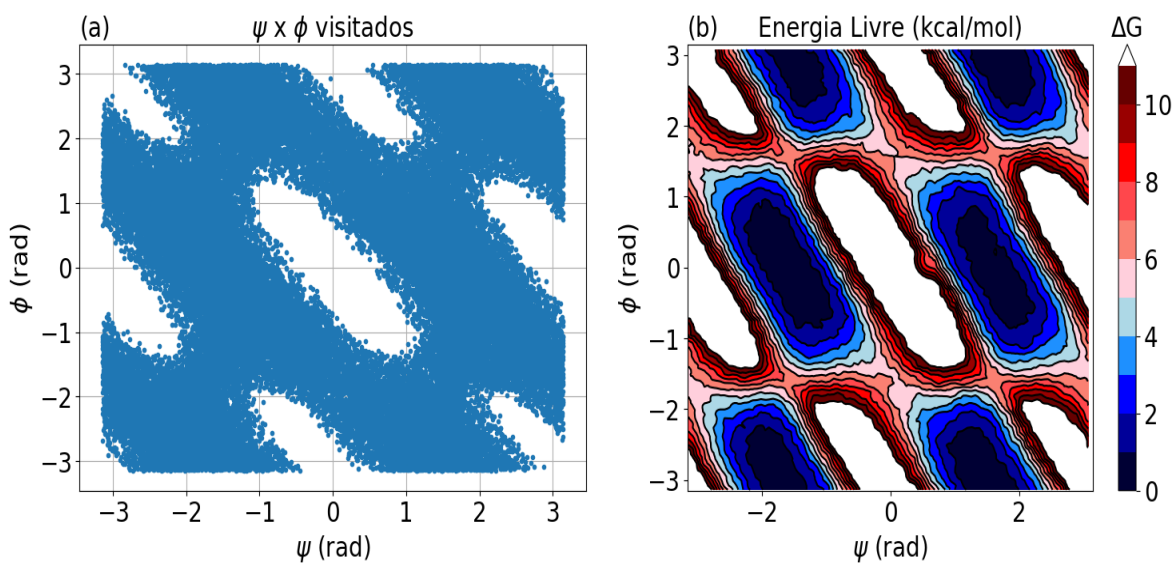


Figura 3.2: (a) Valores dos diedros visitados durante a simulação e (b) superfície de energia livre em kcal/mol para o T3 biologicamente ativo.

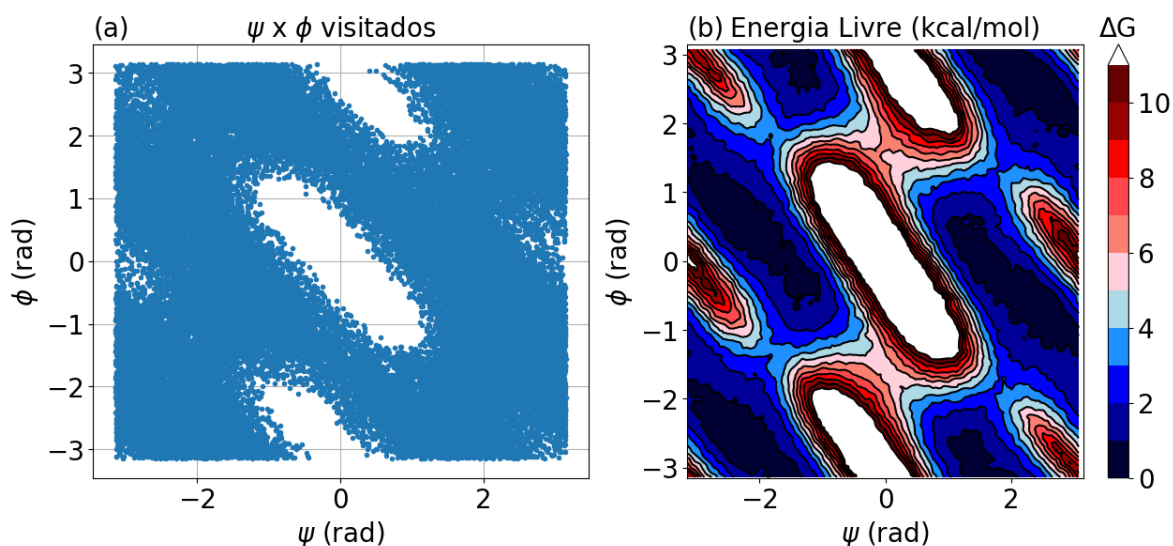


Figura 3.3: (a) Valores dos diedros visitados durante a simulação e (b) superfície de energia livre em kcal/mol para o T3-4 biologicamente inativo.

3.2 Alinhamento e homologia da estrutura tridimensional das proteínas transportadoras HSA

Para fins do alinhamento, foi necessário que as sequências tivessem todas o mesmo tamanho. Embora a sequência de HSA possua 585 resíduos de aminoácidos, as estruturas cristalográficas, nem sempre contém todos os resíduos. A Tabela 3.1 mostra os tamanhos das sequencias cristalográficas, e foi mantido o menor tamanho.

Tabela 3.1 Sequências das estruturas tridimensionais selecionadas para o estudo, obtidas do PDB 1HK1, 1HK2 e 1HK3

proteína	nativa ou mutante	resíduo inicial	resíduo final	resolução (Å)	referência
1HK1	nativa	5	569	2.65	Peptipas <i>et al.</i> , 2003
1HK2	R218H	5	576	2.80	
1HK3	R218P	5	575	2.80	

Para o alinhamento, foram considerados os resíduos de 5 a 569. A Figura 3.4 apresenta o alinhamento das sequências das proteínas 1HK1, 1HK2 (R218H) e 1HK3 (R218P). As proteínas analisadas estão livres de ácidos graxos. A análise revelou uma similaridade sequencial entre elas, com diferença pontual limitada ao resíduo R218 que sofreu mutações, nomeadamente R218H e R218P.

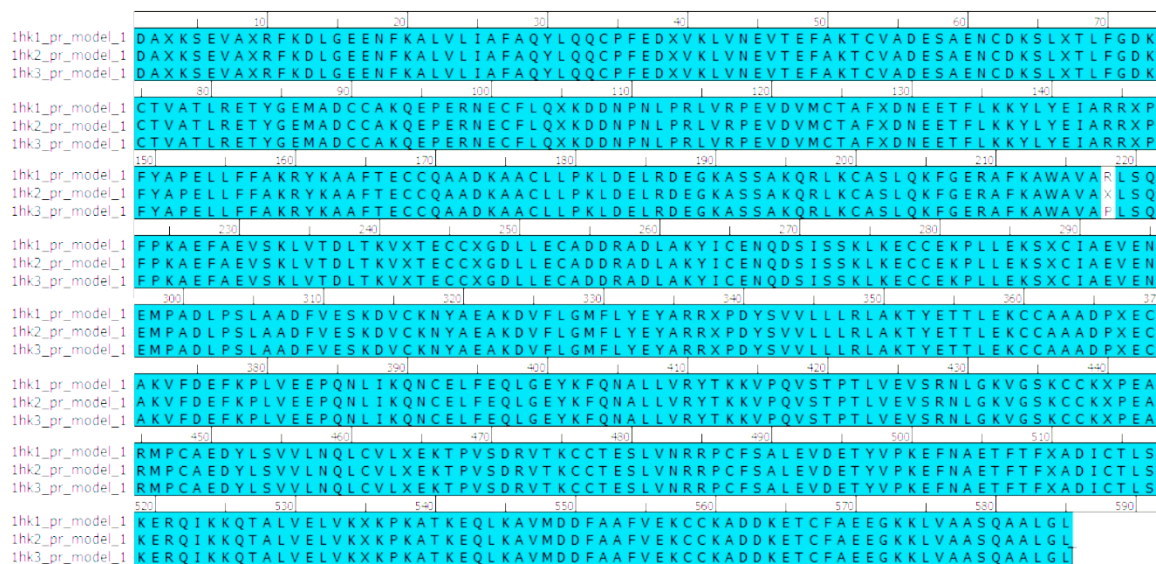


Figura 3.4. Alinhamento das sequências das proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3.

Para as proteínas 1HK4 e sua mutante 1HK5 (R218P), foram considerados os resíduos de aminoácidos apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Sequências das estruturas tridimensionais selecionadas para o estudo, obtidas do PDB 1HK4 e 1HK5

proteína	nativa ou mutante	resíduo inicial	resíduo final	resolução (Å)	referência
1HK4	nativa	3	584	2.40	Peptipas <i>et al.</i> , 2003
1HK5	R218H	3	584	2.70	

O alinhamento sequencial das proteínas 1HK4 e sua mutante 1HK5 (R218P) está apresentado na Figura 3.5. A análise desse alinhamento mostra que, assim como observado anteriormente, há uma similaridade na sequência de suas estruturas. As proteínas aqui analisadas são livres de ácidos graxos.

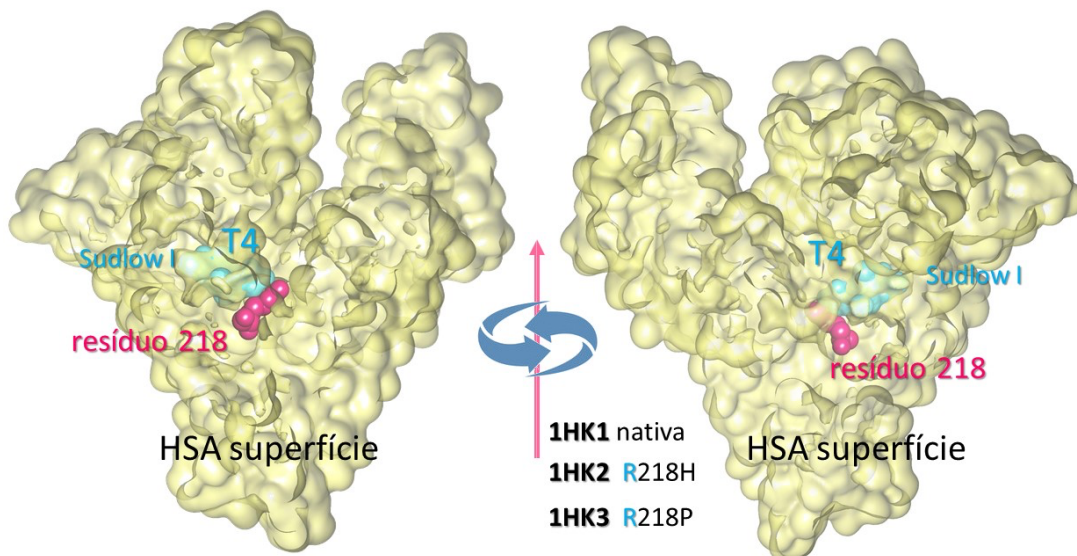


Figura 3.6. Sítio de Ligação **Sudlow I** da Proteína HSA com o Ligante T4 representados na forma de superfície. O sítio de ligação é uma cavidade mais interna da HSA e estão representados o ligante **T4** (superfície cor azul), e o resíduo de **aminoácido 218** que sofre mutação.

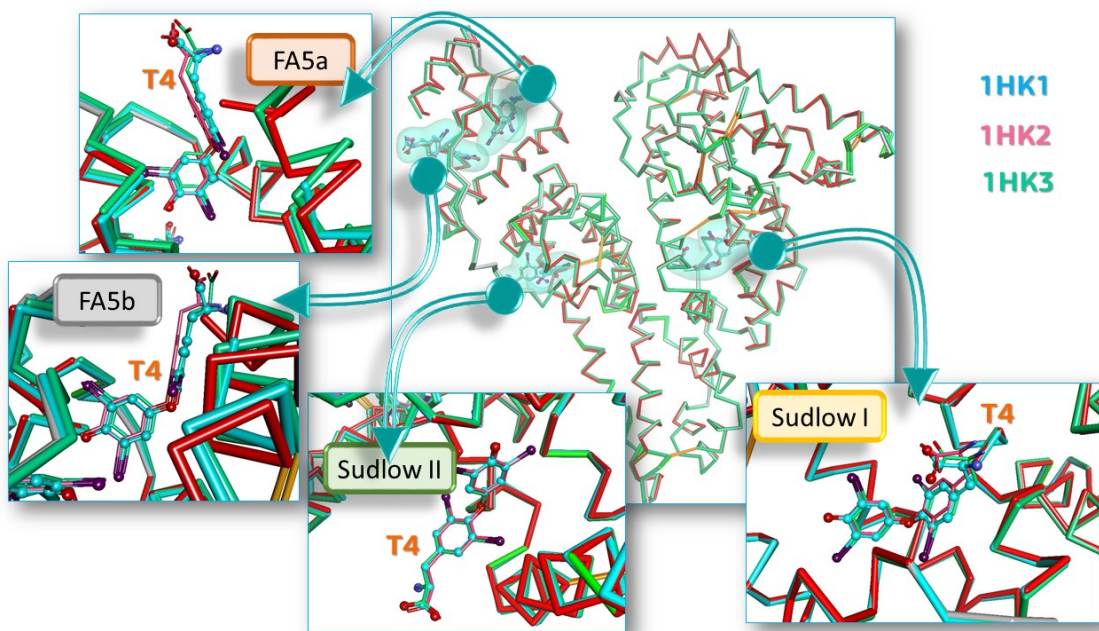
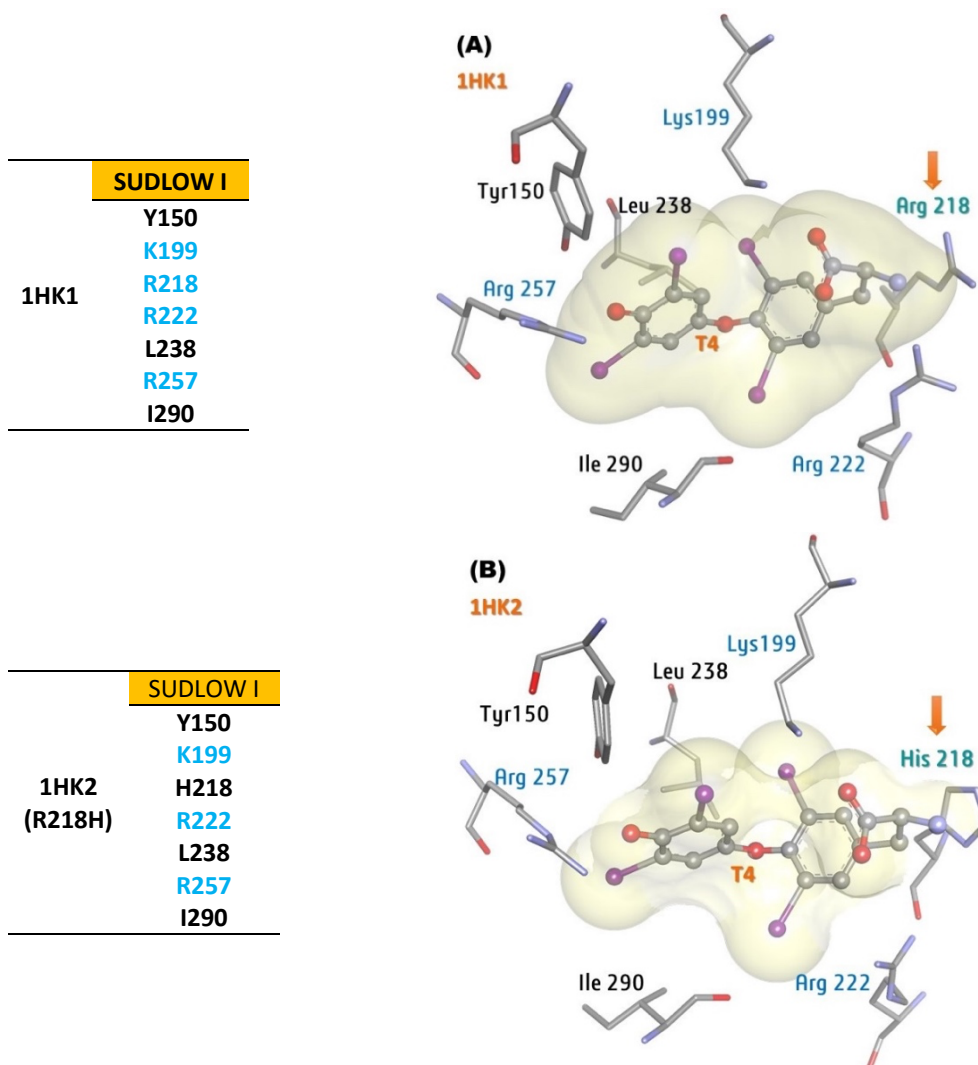


Figura 3.7. Superposição das estruturas das proteínas 1HK1 (azul), 1HK2 (rosa), 1HK3 (verde). São apresentados os ligantes T4 nos sítios Sudlow I, Sudlow II, FA5a e FA5b. O rmsd, calculado considerando os $C\alpha$, entre as estruturas 1HK1 e 1HK2 foi igual a 0,293 Å e entre 1HK1 e 1HK3 foi igual a 0,284 Å.

Com o uso do programa gráfico foi feita a identificação dos sítos de ligação para as proteínas HSA. A Figura 3.8 apresenta o Sítio Sudlow I para as proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 e a Figura 3.9 mostra o Sítio Sudlow II, onde estão superpostas as estruturas, mostrando que o sítio é conservado.



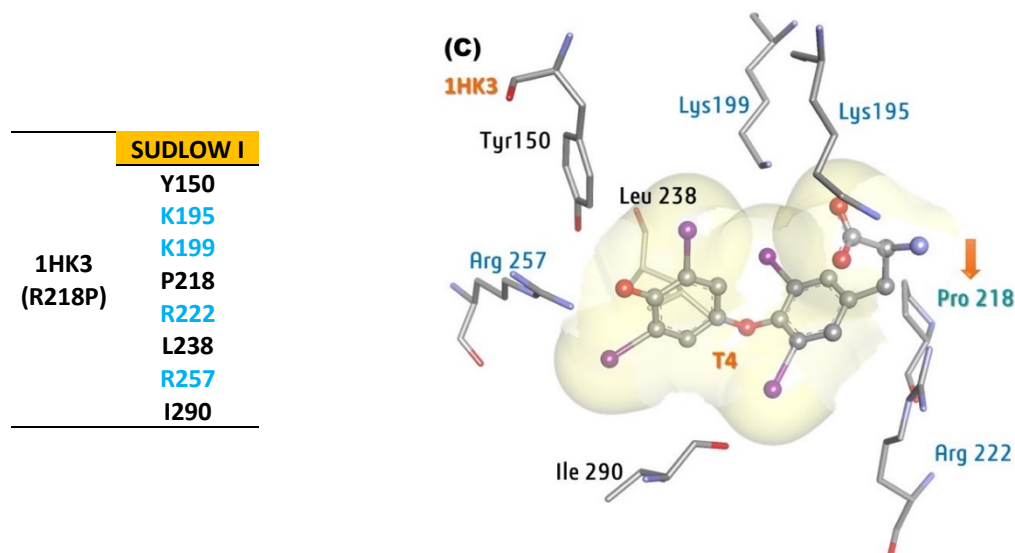


Figura 3.8. Sítio de Ligação **Sudlow I** da Proteína HSA com o Ligante T4. (A) proteína nativa 1HK1 e proteínas mutantes (B) 1HK2 (**R218H**) (C) 1HK3 (**R218P**). **Aminoácidos em azul** são carregados positivamente e os aminoácidos em vermelho, negativamente. Destaque para os resíduos 218.

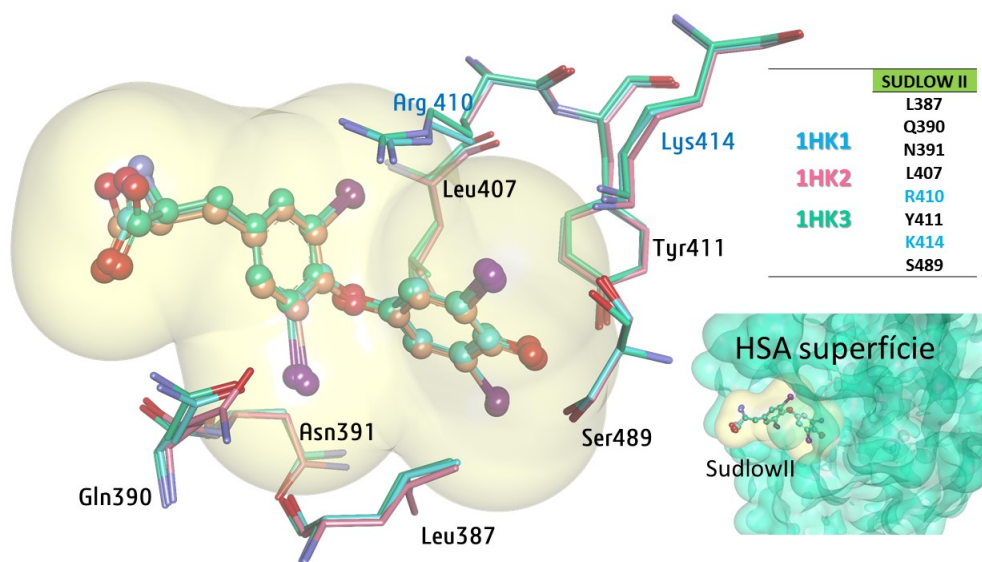


Figura 3.9. Sítio de Ligação **Sudlow II** da Proteína HSA com o Ligante T4. (A) proteína nativa 1HK1 e proteínas mutantes (B) 1HK2 (**R218H**) (C) 1HK3 (**R218P**). **Aminoácidos em azul** são carregados positivamente, negativamente. Observa-se que este sítio, que é conservado nas três proteínas.

O mesmo estudo foi feito para os sítios FA5a e FA5b, que são apresentados nas Figuras 3.10 e 3.11.

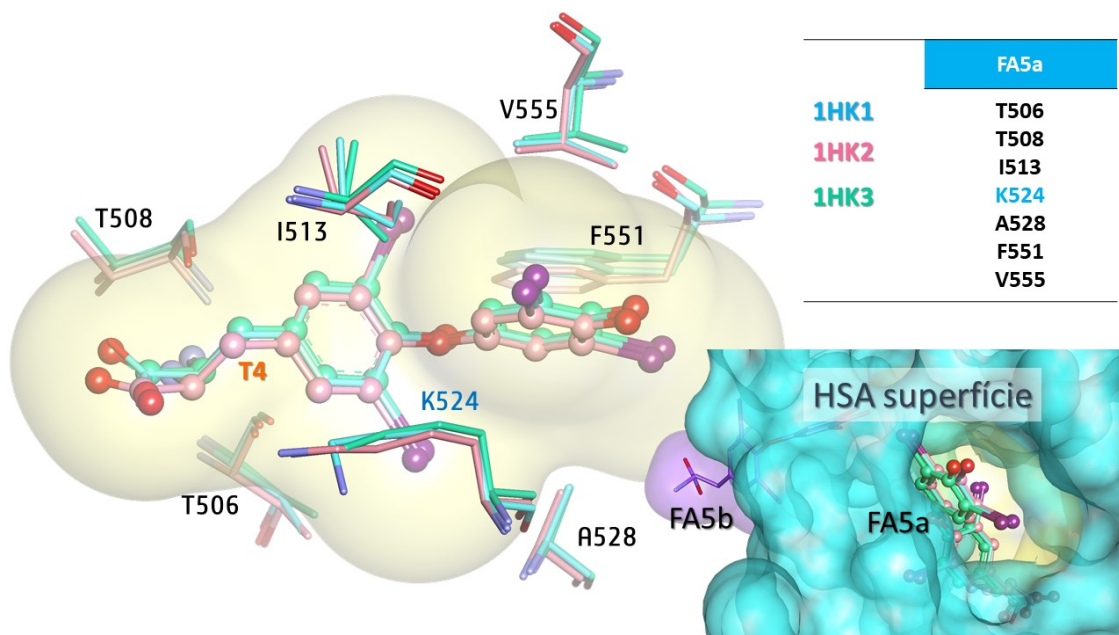


Figura 3.10. Sítio de Ligação **FA5a** das Proteínas HSA – 1HK1, 1HK2 (R218H), 1HK3 (R218P) – com o Ligante T4. Aminoácidos em azul são carregados positivamente. Também pode ser observado no destaque a superfície que representa a proteína HSA e a cavidade onde estão os ligantes T4 no sítio FA5a e a cavidade vizinha onde se encontra o ligante do sítio FA5b.

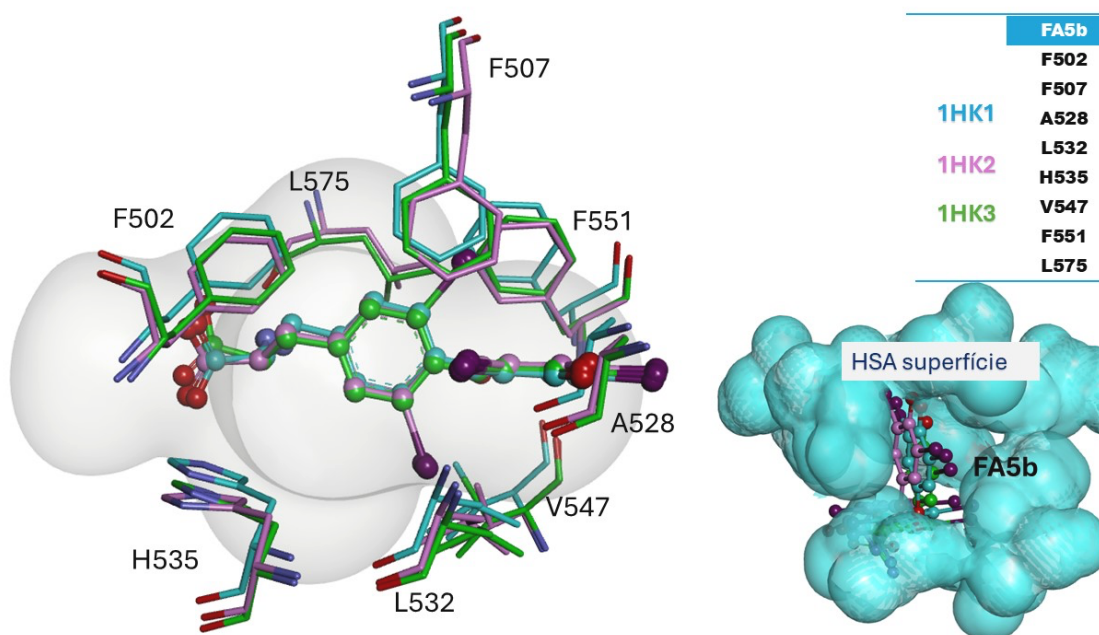


Figura 3.11. Sítio de Ligação **FA5b** das Proteínas HSA – 1HK1, 1HK2 (R218H), 1HK3 (R218P) – com o Ligante T4. Neste sítio não foram observados aminoácidos carregados. Também pode ser observado no destaque a superfície que representa a proteína HSA e a cavidade onde estão os ligantes T4 no sítio FA5b e a cavidade vizinha onde se encontra o ligante do sítio FA5a.

As proteínas HSA 1HK4 (nativa com ácidos graxos) e 1HK5 (mutante R218H com ácidos graxos) possuem apenas um sítio de ligação; os demais sítios de ligação são ocupados por ácidos graxos. A Figura 3.12 apresenta o Cleft (fenda), um sítio de ligação interdomínios I e III com o ligante T4, para as proteínas 1HK4 (nativa) e a mutante 1HK5 (R218H). Os complexos cristalográficos, que possuem ácidos graxos FA, possuem apenas 1 sítio de ligação de T4.

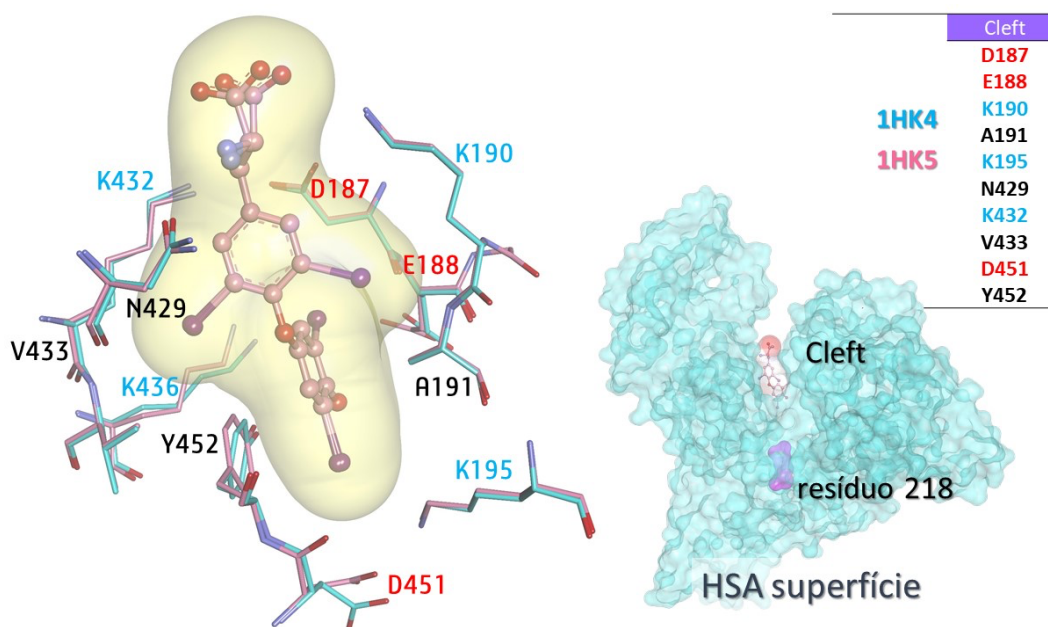


Figura 3.12. Esta é a fenda interdomínios, o **Cleft**. Pode ser observado que a proteína nativa 1HK4 e a proteína mutante 1HK5 são similares ($rmsd = 0.4 \text{ \AA}$, não considerando os resíduos 218 – R e H). **Aminoácidos em azul** são carregados positivamente e **os aminoácidos em vermelho**, negativamente. No destaque apresenta-se o ligante T4 no cleft distante do resíduo 218 ($d > 8 \text{ \AA}$).

3.4. Análise das Interações Cristalográficas

O resultado da análise das interações intermoleculares dos complexos cristalográficos está apresentado na Tabela 3.3.

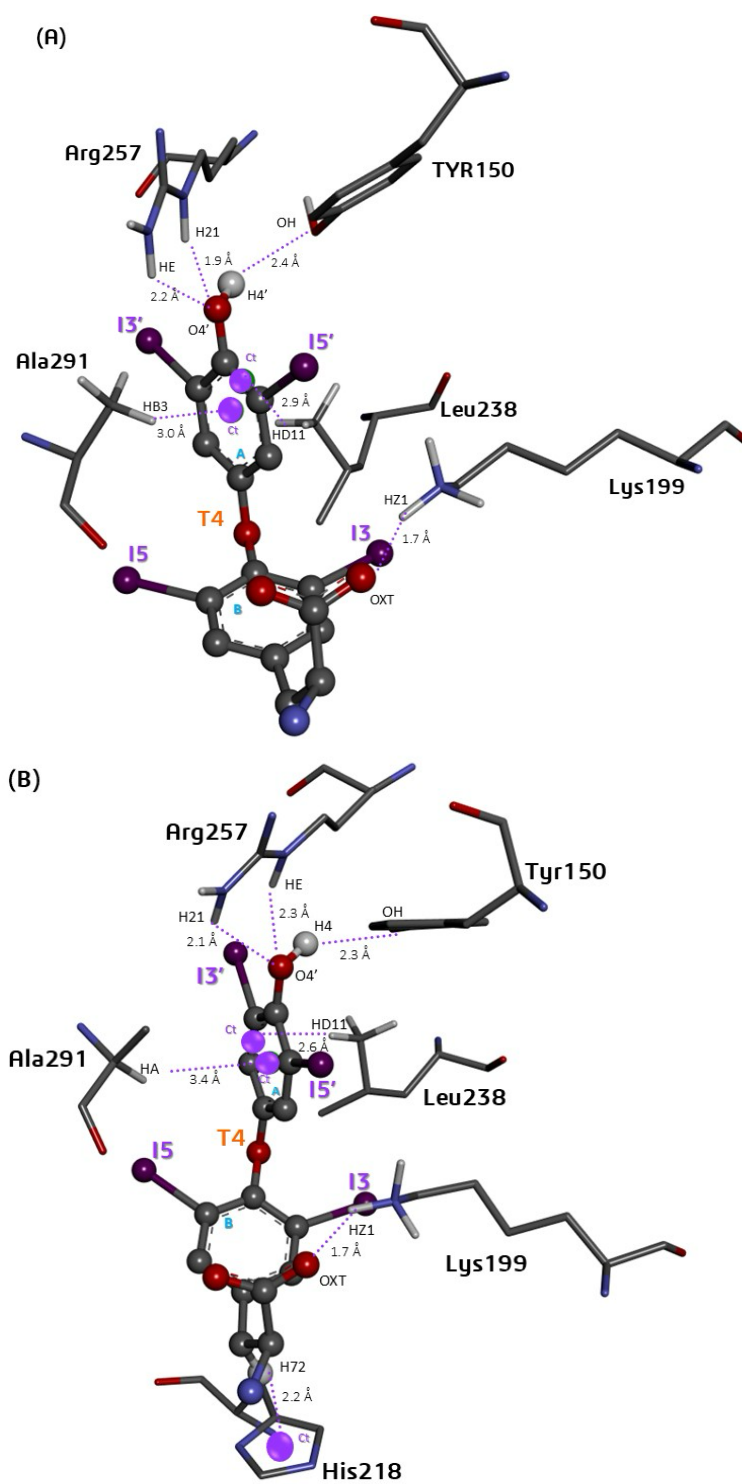
Tabela 3.3 Análise das interações intermoleculares dos complexos cristalográficos

proteína	mutante ou nativa	ácidos graxos	Sudlow I	Sudlow II	FA5a	FA5b	Cleft
1HK1	nativa	nao	sim				
1HK2	R218H	nao	sim	sim	sim	sim	
1HK3	R218P	não	sim				
1HK4	nativa	sim					sim
1HK5	R218H	sim					sim

Todos os sítios Sudlow I de 1HK1, 1HK2 e 1HK3 foram analisados pelo fato de conterem o resíduo 218 (Figura 3.6), que é o passível de mutação. A análise dos demais sítios foi realizada somente em uma das estruturas, devido a sua similaridade, conforme apresentado na Figura 3.10.

Nos Apêndices 1, 2 e 3, as Tabelas 1A, 2A e 3A apresentam, de forma detalhada, as interações do ligante T4 com o sítio Sudlow I nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3, respectivamente.

A análise das interações no sítio Sudlow I com o hormônio T4 mostra que as três proteínas, 1HK1, 1HK2 (R218H) e 1HK3 (R218P), compartilham ligações de hidrogênio com os aminoácidos Y150, K199 e R257, já as interações π com os resíduos L238 e A291. Nas proteínas mutantes 1HK2 e 1HK3, houve um aumento do número de resíduos que participam das interações, com destaque para a interação π do resíduo H218 em 1HK2 e, em 1HK3, para as interações de P218 (π) e K195 (HB). A Figura 3.13 apresenta as interações para o sítio Sudlow I nas três proteínas. As duas proteínas mutantes mostraram maior afinidade que a nativa, devido ao aumento das interações π e à presença dos resíduos H218 e K195, carregados positivamente.



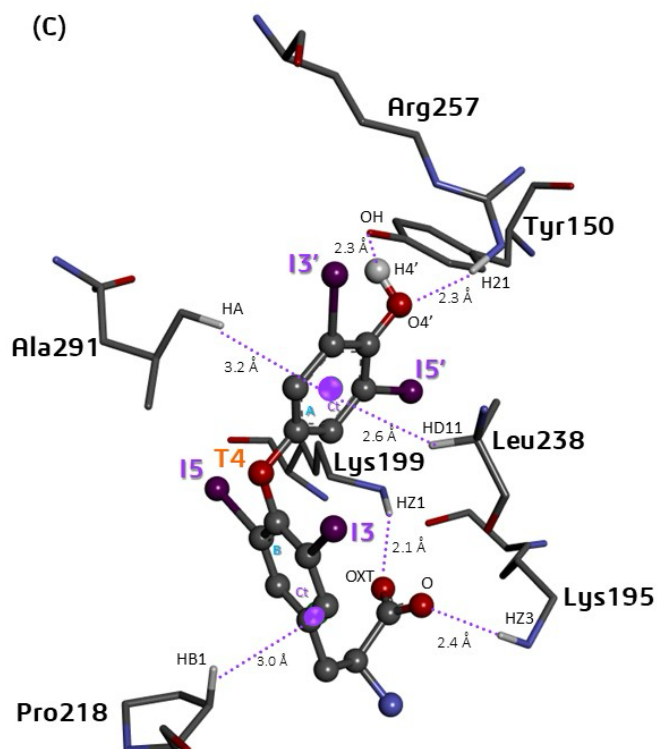


Figura 3.13. Representação das interações π e das ligações de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA com o Ligante T4. (A) proteína nativa 1HK1 e proteínas mutantes (B) 1HK2 (R218H) (C) 1HK3 (R218P).

As interações dos átomos de iodo do T4 com as proteínas 1HK1, 1HK2 (R218H) e 1HK3 (R218P) estão apresentadas nas Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6, respectivamente. Nas proteínas mutantes 1HK2 e 1HK3, observou-se o aumento de uma ligação de hidrogênio entre o iodo I3' e o resíduo L238 em 1HK2 (R218H), além da inclusão do resíduo Q196. Em 1HK3, identificou-se a presença adicional dos resíduos K195 e Q196, em comparação com a proteína nativa 1HK1. Nos Apêndices 1, 2 e 3, as Tabelas 1B, 2B e 3B descrevem detalhadamente as interações entre os átomos de iodo do ligante T4 com as proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3, respectivamente.

Tabela 3.4. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações com os átomos de iodo

PROTEINA 1HK1	LIGANTE	Sudlow I								
		T4-RX	Y150	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
B	I3		X			X		X		
	I5				X				X	X
A (OH)	I3'								X	
	I5'	X	X				X			X

Tabela 3.5. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações com os átomos de iodo

PROTEINA 1HK2	LIGANTE	Sudlow I								
		Y150	Q196	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
B	I3			X		X				
	I5	X			X				X	X
A (OH)	I3'					X		X	X	
	I5'		X	X			X			X

Tabela 3.6. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações com os átomos de iodo

PROTEINA 1HK3	LIGANTE	Sudlow I								
		Y150	Q196	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
B	I3			X		X				X
	I5				X				X	
A (OH)	I3'							X	X	
	I5'	X	X	X			X			X

A análise de interação no sítio Sudlow II com o hormônio T4 apresentou interações π com o resíduo L394 e ligações de hidrogênio com Y411 e S489 na proteína 1HK2 (R218H) (Figura 3.14). No Apêndice 4, na Tabela 4A apresenta, de forma detalhada, as interações do ligante T4 com o sítio Sudlow II na proteína mutante 1HK2.

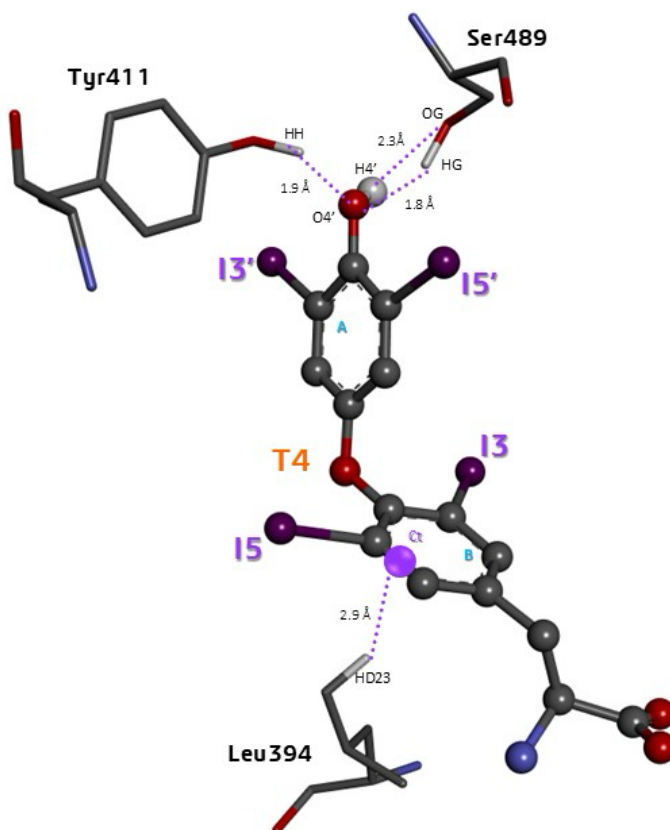


Figura 3.14. Representação das interações π e das ligações de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow II da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T4.

No Apêndice 4 na Tabela 4B descreve detalhadamente as interações dos átomos de iodo do ligante T4 com a proteína 1HK2 (R218H) no sítio Sudlow II. Os resíduos Q390, N391 e L407 interagem apenas com o I3, enquanto o aminoácido R410, carregado positivamente, estabelece interações com os átomos I5 e I5'. O resíduo L387 interage com os átomos de iodo I3 e I3', ao passo que Y411 interage com I3', e S489 com I5'. As interações dos átomos de iodo do hormônio T4 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações com os átomos de iodo

PROTEÍNA 1HK2	LIGANTE T4- RX	Sudlow II								
		L387	Q390	N391	L394	L407	R410	Y411	K414	S489
B	I3	X	X	X						
	I5					X	X			
A (OH)	I3'	X						X		
	I5'							X	X	X

Nos Apêndice 5, a Tabela 5A apresenta detalhadamente as interações do ligante T4 com o sítio FA5a na proteína mutante 1HK2. Foi observado a presença de duas interações π com os resíduos F507 e I513, e uma ligação de hidrogênio com T506 e T508. A Figura 3.15 apresenta as interações no sítio FA5a com o hormônio T4 na 1HK2 (R218H).

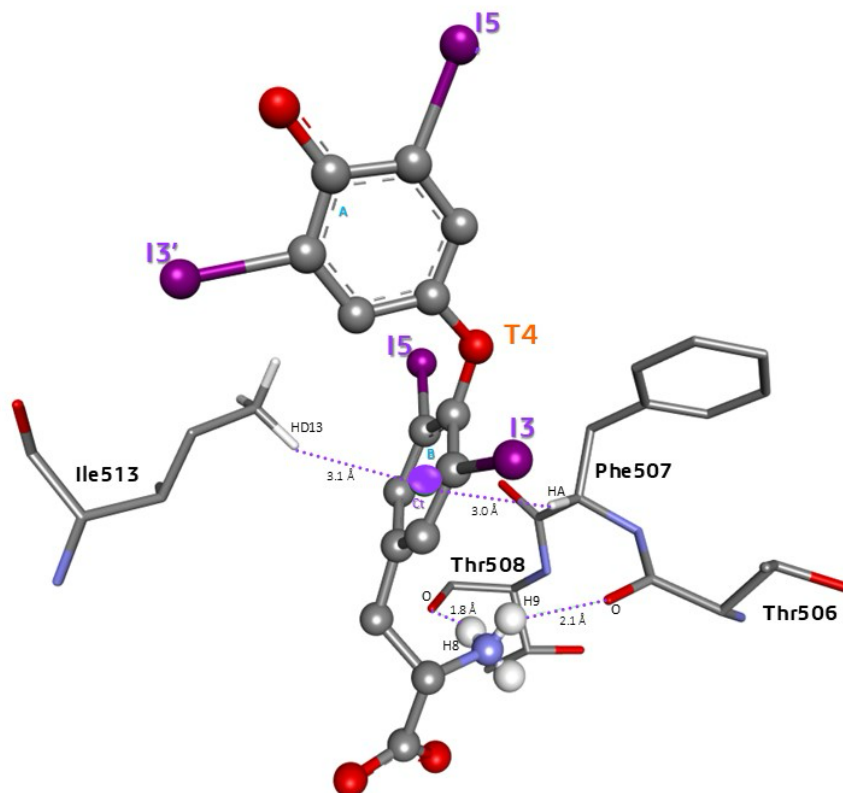


Figura 3.15. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5a da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T4.

As interações dos átomos de iodo do T4 com a proteína 1HK2 no sítio FA5a estão apresentadas na Tabela 3.8. Os resíduos F507, F551 e V555 interagem com mais de um átomo de iodo: F507 interage com I3 e I5, F551 interage com I5 e I5', e V555 interage com I3' e I5. Os resíduos K524 e A528 formam interações com I3 além dos átomos I3' e I5', respectivamente, enquanto I513 interage tanto com I3' quanto com I5. No Apêndice 5 na Tabela 5B descreve detalhadamente as interações dos átomos de iodo do ligante T4 com a proteína 1HK2 (R218H).

Tabela 3.8. Análise de Interação do Sítio FA5a da proteína 1HK2 (R218H) com os iodos de T4. Em lilás interações com átomos de iodo e os resíduos em azul são carregados positivamente

PROTEÍNA 1HK2	LIGANTE T4- RX	FA5a						
		T506	F507	I513	K524	A528	F551	V555
B	I3		X		X	X		
	I5		X	X			X	X
A (OH)	I3'			X	X			X
	I5'					X	X	

O sítio FA5b está localizado em uma parte muito flexível da proteína HSA, o que dificulta a obtenção de uma densidade eletrônica bem definida. A análise das interações no sítio FA5b com o hormônio T4 na proteína 1HK2 (R218H) apresentou duas interações π com os resíduos F502 e L532 (Figura 3.16). No Apêndice 6 na Tabela 6A descreve detalhadamente as interações do ligante T4 com a proteína 1HK2 (R218H).

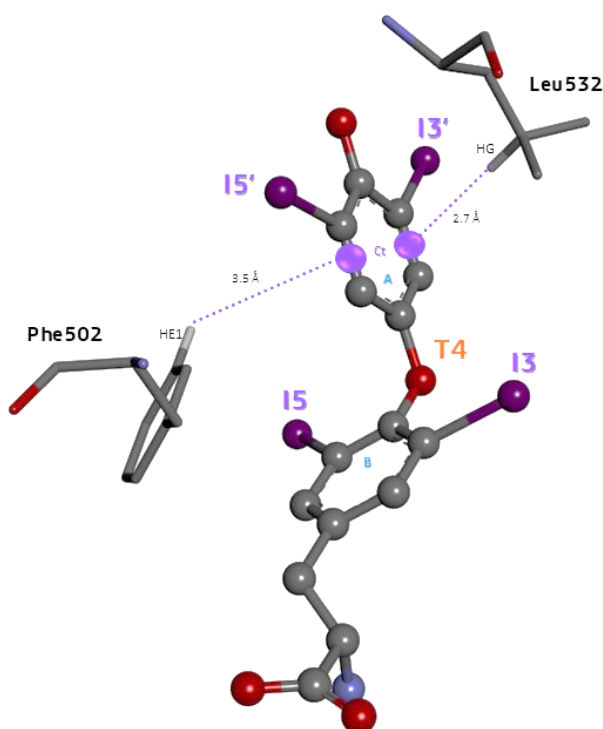


Figura 3.16. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5b da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T4.

As interações de cada iodo de T4, avaliadas para a proteína 1HK2 (R218H) no sítio FA5b, estão apresentadas na Tabela 3.9. O resíduo F507 interage com I5', enquanto A528 interage apenas com I3'. O resíduo L532 apresenta interações com os átomos I3' e I5'. O resíduo H535 interagem com I3 e I5' e o L575 apenas com I5. O aminoácido F551 estabelece interações tanto com I3' quanto com I5. No Apêndice 6, na Tabela 6B descreve detalhadamente as interações do ligante T4 com a proteína 1HK2 (R218H).

Tabela 3.9. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T4. Em lilás interações com átomos de iodo e os resíduos em azul são carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b							
		F502	F507	A528	L532	H535	V547	F551	L575
B	I3					X	X		
	I5	X						X	X
A (OH)	I3'			X	X		X	X	
	I5'	X	X		X	X			

As interações π e as ligações de hidrogênio, para as duas proteínas nativas HSA que contêm ácidos graxos FA e possuem apenas o Cleft, estão demonstradas na Figura 3.17. A proteína nativa 1HK4 e a mutante 1HK5 (R218H) apresentam interações π com A291 e Y452. As ligações de hidrogênio em 1HK4 ocorrem com os resíduos D187 e K436, enquanto na mutante 1HK5, a ligação ocorre com D429. Nos Apêndices 7 e 8, nas Tabelas 7A e 8A descreve detalhadamente as interações do ligante T4 com as proteínas 1HK4 e a mutante 1HK5.

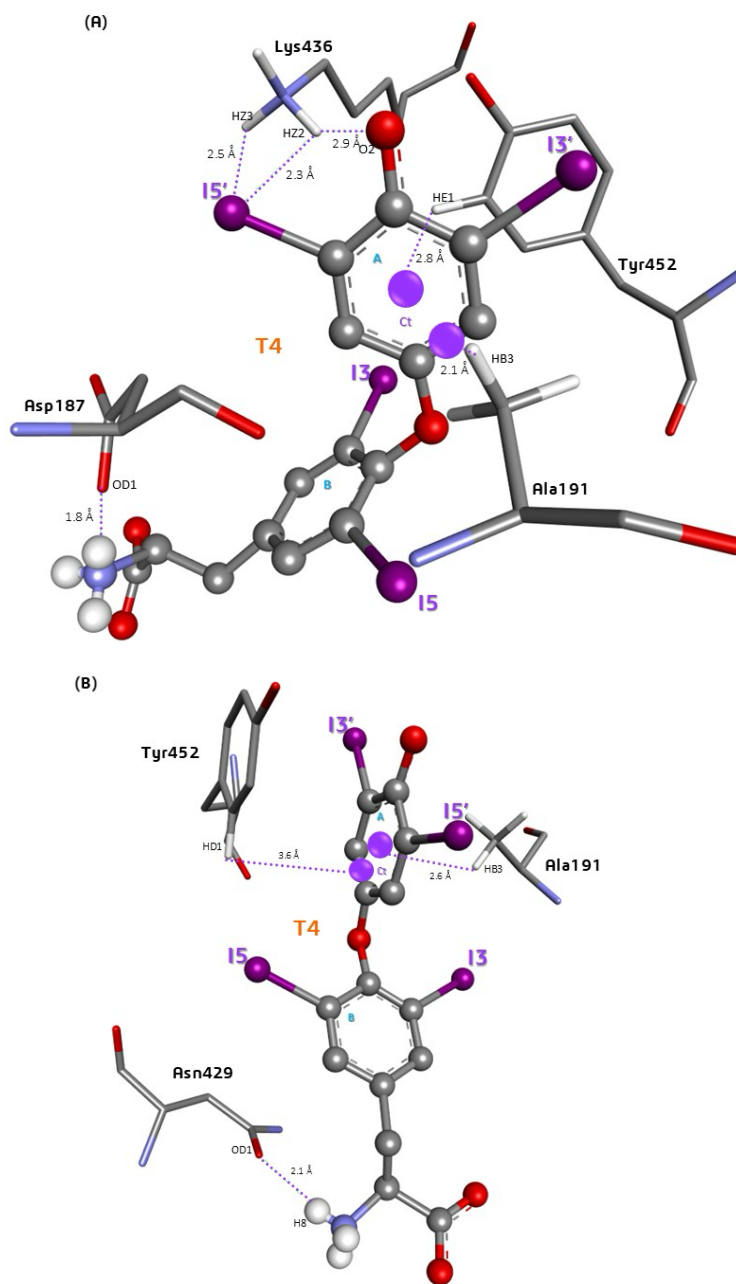


Figura 3.17. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Cleft da Proteína HSA nativa 1HK4 e a mutante 1HK5 (R218H) com o Ligante T4.

As interações de cada iodo de T4, avaliadas para as proteínas 1HK4 e 1HK5 (R218H), estão apresentadas nas Tabelas 3.10 e 3.11, respectivamente. Na mutante 1HK5, foi observado um aumento nas ligações de hidrogênio, com uma ligação entre o iodo I5' e D187 e outra entre o iodo I3' e o resíduo Y452. Nos Apêndices 7 e 8, nas Tabelas 7B e 8B descreve detalhadamente as interações dos iodios do ligante T4 com as proteínas 1HK4 e 1HK5, respectivamente.

Tabela 3.10. Análise de Interação do Cleft da proteína 1HK4 com os iodios do hormônio T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente, em vermelho os resíduos carregados negativamente e em lilás interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	CLEFT								
		D187	Q188	A191	K195	D429	V433	K436	D451	Y452
1HK4	T4-RX									
	I3	X		X						
B	I5					X	X			
	I3'				X				X	X
A (OH)	I5'		X					X		

Tabela 3.11. Análise de Interação do Cleft da proteína 1HK5 (R218H) com os iodios do hormônio T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente, em vermelho os resíduos carregados negativamente e em lilás interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	CLEFT								
		D187	Q188	A191	K195	D429	V433	K436	D451	Y452
1HK5	T4-RX									
	I3	X		X						
B	I5					X	X			
	I3'				X				X	
A (OH)	I5'	X	X					X		

3.5 Estudos de Redocking

Para o redocking molecular das cinco proteínas HSA — 1HK1 nativa, 1HK2 (R218H), 1HK3 (R218P), 1HK4 nativa e 1HK5 (R218H) — foram testados raios de 5, 6, 7 e 8. A Tabela 3.12 apresenta os parâmetros adotados para cada complexo no redocking. Não foi necessário ajustar os parâmetros para os outros ligantes T3 e T3IP, uma vez que todos possuíam o mesmo número de átomos.

Tabela 3.12. Parâmetros determinados para os cálculos de docking

Proteína	Tipo	Ácidos graxos	Sítios de ligação	Sítio	Raio (Å)	Raio da cavidade (Å)	Constrain
1HK1	nativa	não	4	Sudlow I	6	12.8	não
				Sudlow II	6	12.0	ligação de H com S489
				FA5a	6	13.4	não
				FA5b	8	8.0	centro no I3'
1HK2	R218H	não	4	Sudlow I	6	12.9	não
1HK3	R218P	não	4	Sudlow I	6	12.8	não
1HK4	nativa	sim	1	Cleft	5	12.7	não
1HK5	R218H	sim	1	Cleft	5	11.3	não

As mutações das proteínas 1HK2 e 1HK3 ocorrem no sítio de ligação Sudlow I. Os resultados do redocking do ligante T4 (RX) nesse sítio para as três proteínas HSA estão apresentados na Figura 3.18.

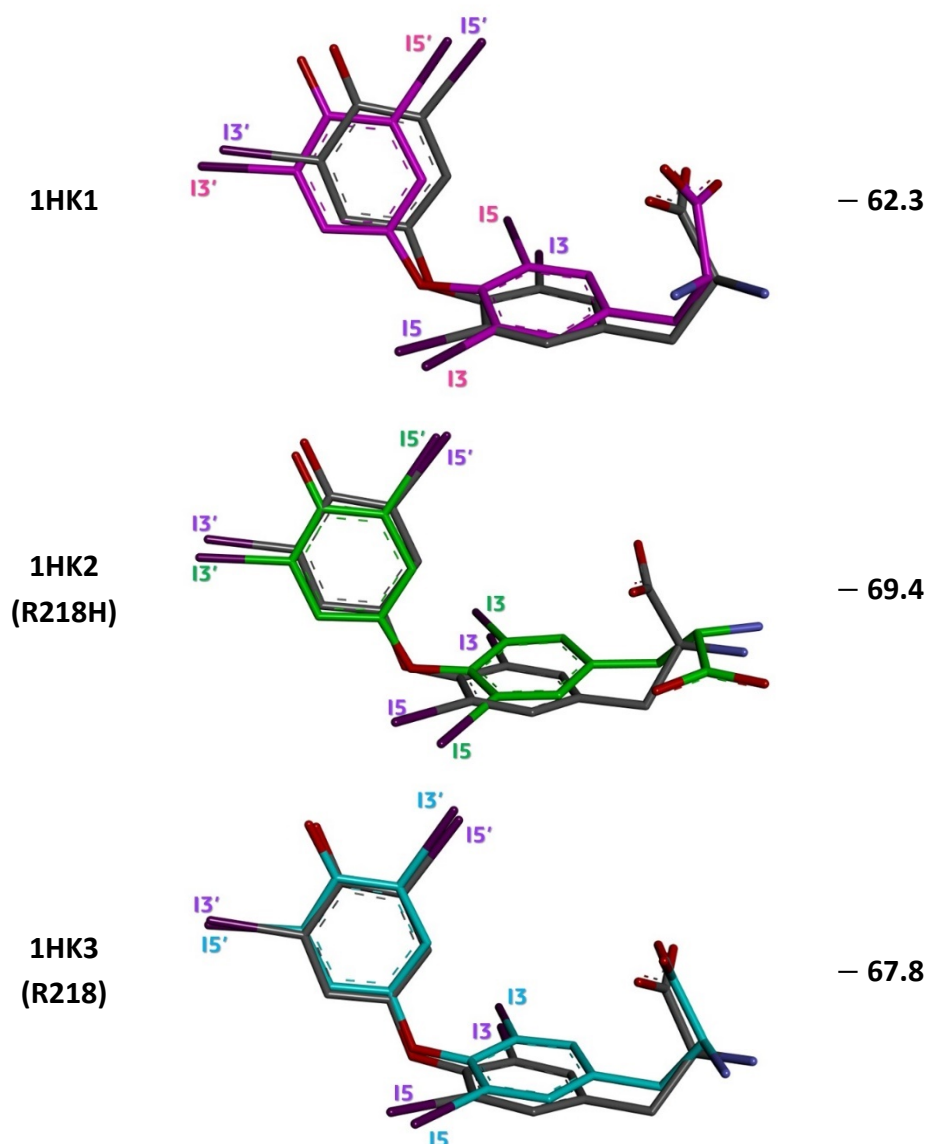


Figura 3.18. Resultados dos experimentos de redocking, nas proteínas 1HK1 (rosa), 1HK2 (verde) e 1HK3 (azul) no sítio Sudlow I para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico em todos os casos.

Os resultados dos estudos de docking indicam que os escores seguem a ordem: 1HK2 < 1HK3 < 1HK1, sugerindo maior afinidade pelas proteínas mutantes em comparação com a nativa. A diferença de escores encontrada foi: $\Delta_{\text{escore}} (1\text{HK2}-1\text{HK1}) = 7.1$ e $\Delta_{\text{escore}} (1\text{HK3}-1\text{HK1}) = 5.5$.

A Figura 3.19 mostra os resíduos que diferenciam o sítio Sudlow I: arginina 218, histidina 218 e prolina 218 em interação com o hormônio T4 (RX), com a superfície de van der Waals calculada para os três aminoácidos e o ligante cristalográfico. Nesta situação, ocorrem dois tipos de mudança: uma espacial e a outra referente às cargas. Do ponto de

vista espacial, R218 (1HK1) ocupa um espaço maior que os outros resíduos, e a prolina (1HK3) ocupa o menor espaço. A área superficial acessível às cadeias laterais, determinada em unidades arbitrárias para arginina vale 152.9, a da histidina 98.2 e para a prolina 79.5 (EL MAATY, ABO-ELKHIER, ABD ELWAHAAB, 2010). DARBY & CREIGHTON (1993), colocam para as áreas superficiais acessíveis dos resíduos de aminoácidos, em Å², os valores de 241, 194 e 143 para a arginina, a histidina e a prolina, respectivamente. Do ponto de vista de cargas, visto que a R218 é um resíduo carregado positivamente, quando substituído pela H218, enfraquece a interação, por ser menos positivo. A substituição por P218, que é um aminoácido com cadeia lateral não polar, elimina a característica positiva dessa região de interação.

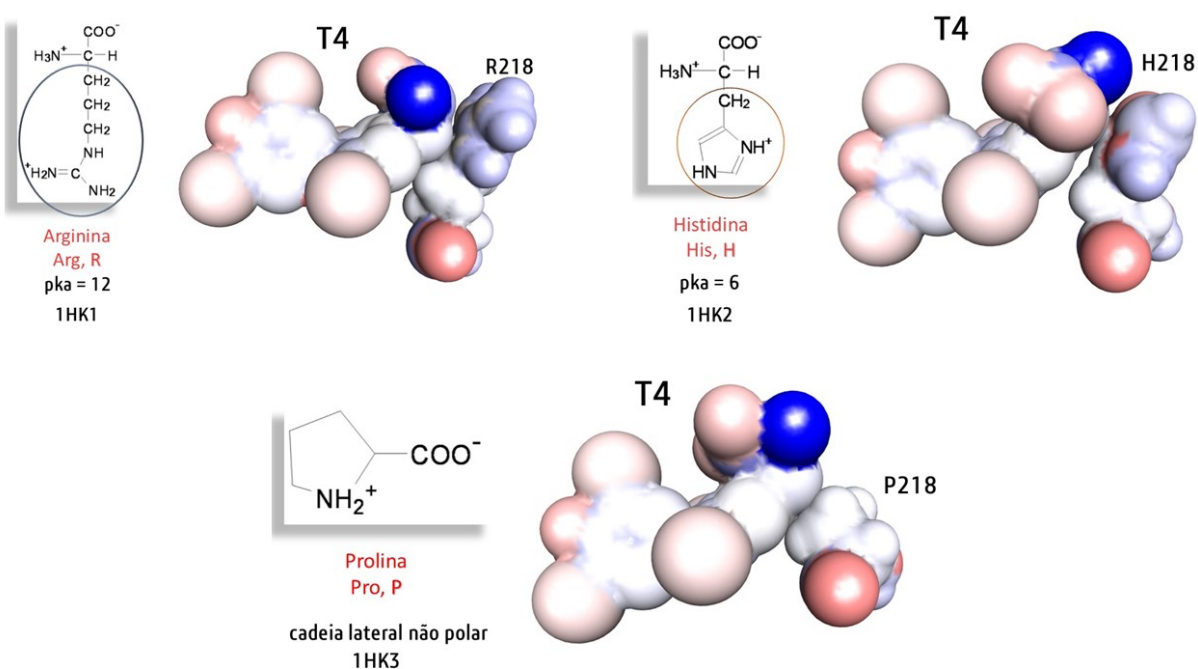


Figura 3.19. Resíduos arginina 218, histidina 218 e prolina 218 com o hormônio T4 (RX) com a superfície de van der Waals calculada para os três aminoácidos e o ligante cristalográfico.

A Figura 3.20 mostra as poses e os escores obtidos para o sítio de ligação Sudlow II. Os escores obtidos seguem a ordem 1HK3 < 1HK1 < 1HK2, mas com diferenças menores em comparação ao sítio Sudlow I: $\Delta_{\text{escore}} (1HK2-1HK1) = 1.3$ e $\Delta_{\text{escore}} (1HK3-1HK1) = 0.9$. Isso

sugere uma afinidade semelhante entre as proteínas, o que era esperado, já que não há alterações nos aminoácidos deste sítio nas três proteínas.

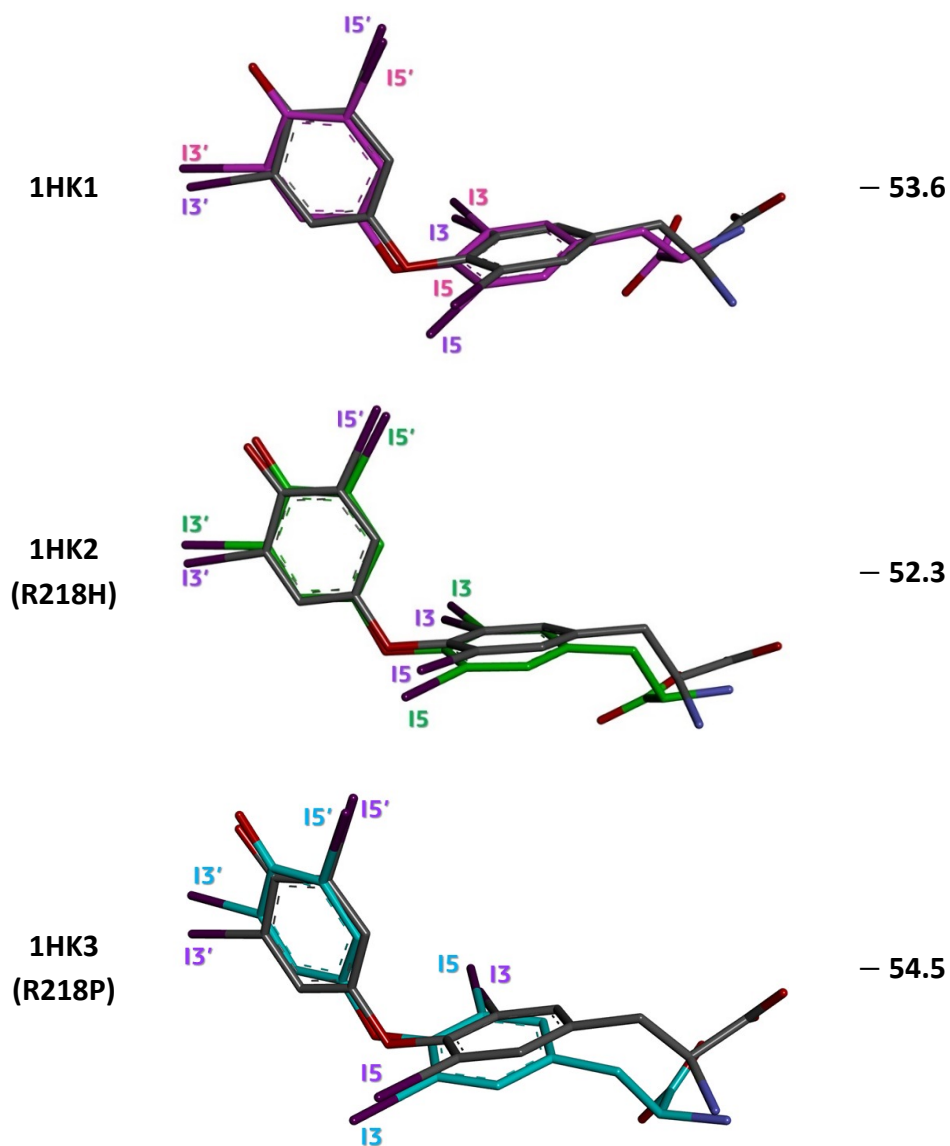


Figura 3.20. Resultados dos experimentos de redocking, nas proteínas 1HK1 (rosa), 1HK2 (verde) e 1HK3 (azul) no sítio Sudlow II para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico em todos os casos.

A Figura 3.21 apresenta as poses e os escores obtidos para o sítio FA5a. Os escores seguem $1HK2 < 1HK1 < 1HK3$. Novamente, a diferença de escores é menor em comparação ao sítio Sudlow I: $\Delta_{\text{escore}} (1HK2-1HK1) = 0.8$ e $\Delta_{\text{escore}} (1HK3-1HK1) = 1.2$.

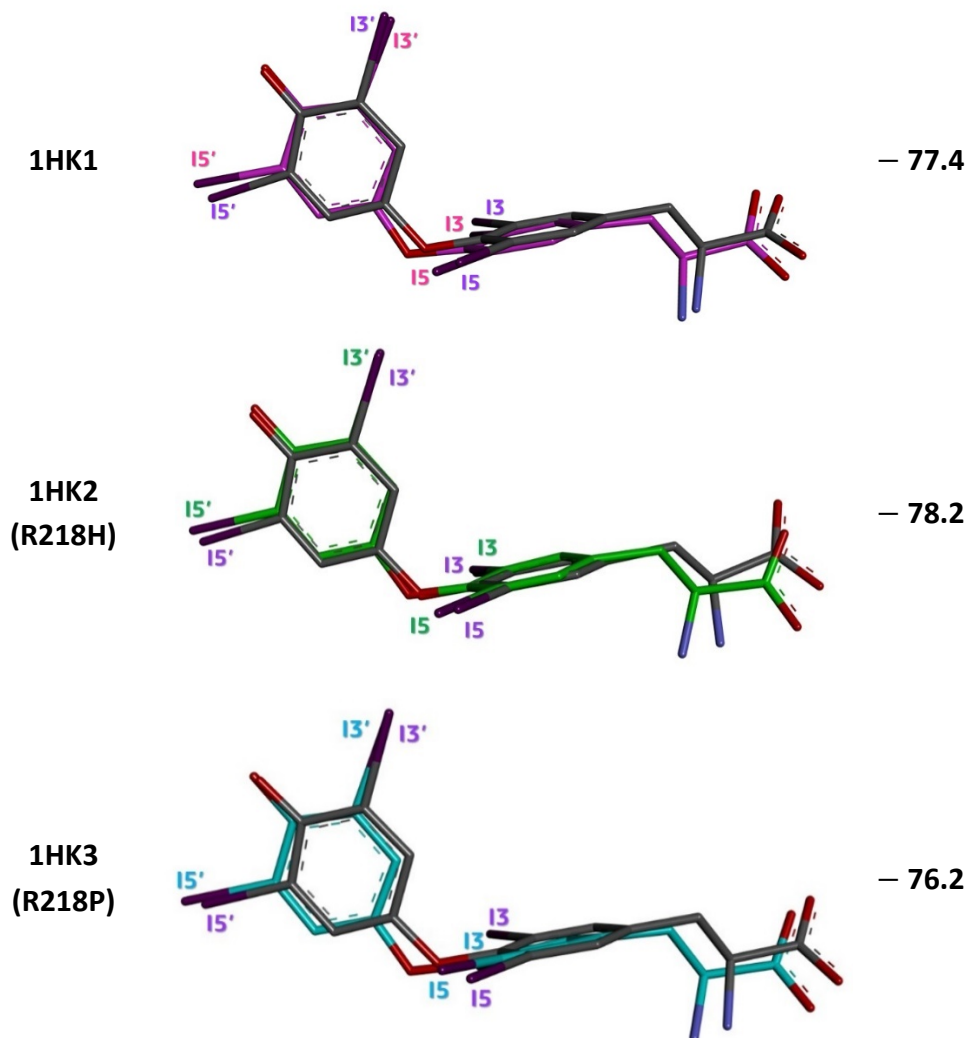


Figura 3.21. Resultados dos experimentos de redocking, nas proteínas 1HK1 (rosa), 1HK2 (verde) e 1HK3 (azul) no sítio FA5a para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico em todos os casos.

O sítio FA5b não apresentou conformações que seguissem as orientações de T4 (RX) nas proteínas 1HK1 e 1HK3 (R218P), devido à sua localização em uma região altamente flexível da estrutura proteica. Essa flexibilidade dificulta a obtenção de uma densidade eletrônica bem definida, comprometendo a precisão do modelo e das interações previstas nesse local. A saída do redocking do ligante T4 (RX) na proteína 1HK2 (R218H) no sítio de ligação FA5b está apresentada na Figura 3.22. Dado que os escores para as regiões fora do sítio Sudlow I foram similares, este valor foi considerado representativo para o sítio FA5b.

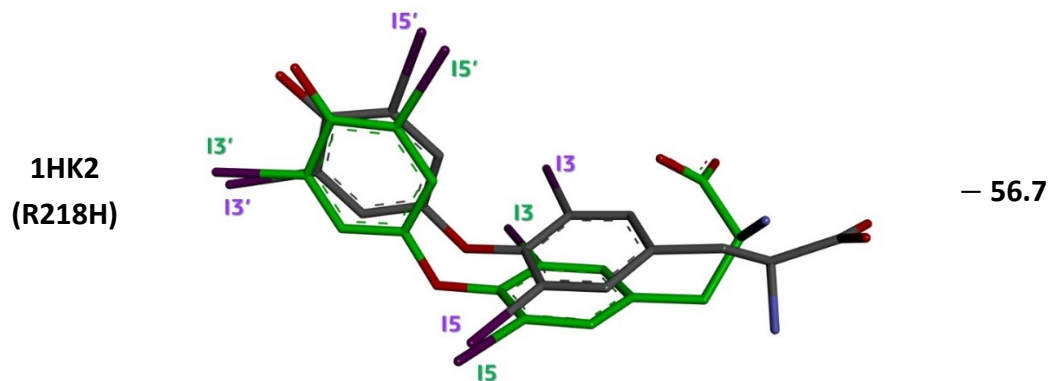


Figura 3.22. Resultados dos experimentos de redocking, na proteína 1HK2 (verde) no sítio FA5b para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico.

A Figura 3.23 apresenta o redocking para as duas proteínas HSA: 1HK4 (nativa) e 1HK5 (R218H, mutante), que contêm ácidos graxos em seus sítios de ligação e possuem apenas um sítio de ligação para o hormônio T4.

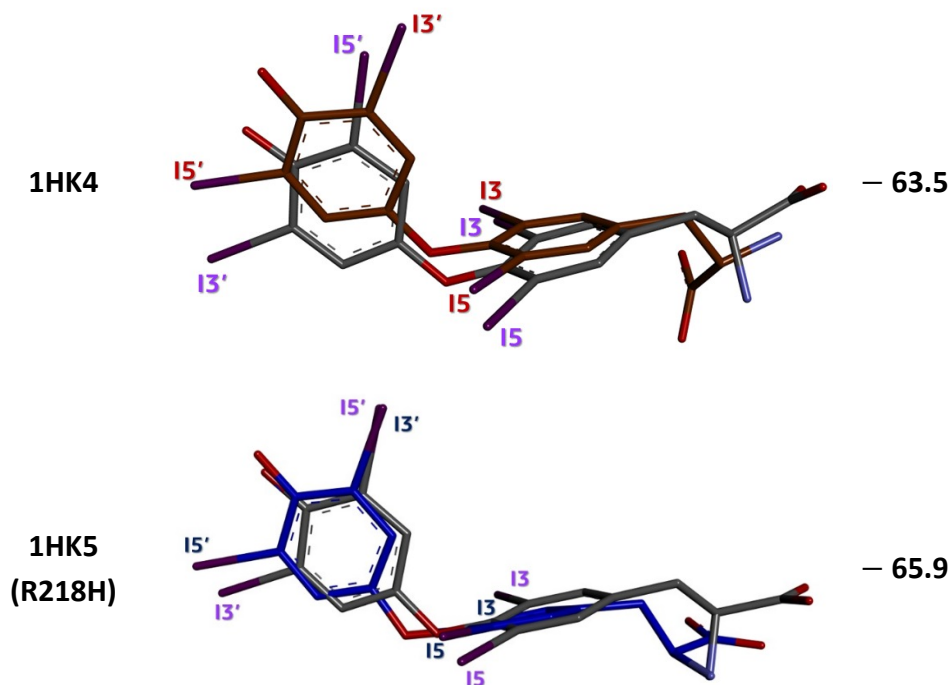


Figura 3.23. Resultados dos experimentos de redocking, na proteína 1HK4 (marrom) e 1HK5 (azul) no Cleft para o hormônio T4 (RX). O ligante em cinza é o ligante cristalográfico.

A Tabela 3.13 apresenta os resultados encontrados na literatura dos valores das constantes de dissociação (K_d) para as proteínas, 1HK1, 1HK2 (R218H), 1HK3 (R218P), 1HK4 e 1HK5 (R218H) (PETITPAS *et al.*, 2003).

Tabela 3.13. Constantes de dissociação para proteínas HSA complexadas com T4. Dados obtidos PETITPAS *et al.*, 2003

proteína	K_d (nM)	ácidos graxos
1HK1 - nativa	2300	livre
1HK2 – R218H	170	livre
1HK3 – R218P	260	livre
1HK4 - nativa	4900	sim
1HK5 – R218H	5720	sim

A interação Proteína P com o Ligante L obedece às leis da Termodinâmica, assim para associar a afinidade de ligação do ligante T4 com as proteínas usando a constante de dissociação (K_d), pode-se utilizar a equação de afinidade de ligação, que é a inversa da constante de dissociação:

$$P + L \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} PL \quad K_{eq} = K_A = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[PL]}{[P][L]} \therefore K_D = \frac{1}{K_A}$$

Na equação de afinidade de ligação, k_1 e k_2 são as constantes de velocidade de associação e dissociação, respectivamente, e as constantes K_A e K_D são as constantes de equilíbrio no sentido de associação e dissociação. Quanto menor o valor de K_D maior a afinidade da interação proteína-ligante (PL).

Estes valores de K_D se referem à situação em que todos os ligantes sofreram a dissociação. Para possibilitar a comparação, foram considerados os escores dos quatro sítios de ligação (Sudlow's I, Sudlow's II, FA5a e FA5b) para o hormônio T4 nos receptores 1HK1, 1HK2 (R218H), 1HK3 (R218P). O valor do escore obtido na proteína 1HK2 (R218H) no sítio FA5b foi replicado para as proteínas 1HK1 e 1HK3 (R218P), que não apresentaram saídas compatíveis com a orientação de T4(RX). A soma desses valores está apresentada na Tabela 3.14.

Tabela 3.14. Resultados das somas dos experimentos de redocking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 nos quatro sítios de ligação para o hormônio T4 (RX)

Ligante	Sítio	Proteínas escores		
		1HK1	1HK2	1HK3
T4 (RX)	Sudlow I	- 62.3	- 69.4	- 67.8
	Sudlow II	- 53.6	- 52.3	- 54.5
	FA5a	- 77.4	- 78.2	-76.2
	FA5b	- 56.7	- 56.7	- 56.7
	Σ	-250.0	-256.6	-255.2

A soma dos escores fica na seguinte ordem: 1HK2 < 1HK3 < 1HK1, sendo compatível com os valores de K_D apresentados na Tabela 3.12. No presente estudo, esse resultado pode estar relacionado principalmente a variação observada no sítio Sudlow I, uma vez que as diferenças nos escores dos demais sítios são relativamente pequenas.

Em relação as proteínas que possuem ácidos graxos, 1HK4 e a 1HK5, os valores de escores foram - 63.5 para 1HK4 e de - 65.9 para a 1HK5 (R218H). Escores mais negativos no redocking podem indicar uma maior afinidade de ligação. Embora não sejam uma medida direta da afinidade, valores mais baixos tendem a sugerir essa característica.

3.6 Estudo de Docking molecular com os ligantes T3 e T3IP

A albumina sérica humana (HSA) desempenha o papel de transporte tanto para os hormônios T4 quanto para o T3. Considerando que o hormônio T3 possui um átomo de iodo a menos que o T4, foram realizadas modificações a partir da estrutura do T4 (RX) para gerar o T3 e os T3IP. Sendo T3 biologicamente ativo e T3-4 (T3 reverso) biologicamente inativo. As moléculas de T3 foram denominadas de forma distinta, identificando posições diferentes para os três átomos de iodo, demonstradas na Figura 2.4 no capítulo 2.

Os resultados dos experimentos de docking com os ligantes T3 e os T3IP nas três proteínas a 1HK1 e nas mutantes 1HK2 (R218H) e 1HK3 (R218P) no sítio de ligação Sudlow I, estão demonstrados na Tabela 3.15. Os escores dos ligantes T3 e T3-2, com o iodo removido do anel A, foram semelhantes e maiores que os escores dos ligantes T3-3 e T3-4,

nos quais o iodo foi removido do anel B. Esses últimos também apresentaram valores próximos entre si.

Tabela 3.15. Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 no Sudlow I para os ligantes T3 e T3IP

(sítio – raio Å)	Ligantes	Proteínas escores		
		1HK1	1HK2 (R218)	1HK3 (R218P)
Sudlow I - 6	T3	-55.8	-66.0	-64.3
	T3-2	-55.6	-65.7	-64.2
	T3-3	-52.4	-58.8	-60.4
	T3-4	-52.3	-58.4	-60.7

A Tabela 3.16 apresenta os resultados do docking com os ligantes T3 e T3IP nas três proteínas HSA no sítio Sudlow II. Os resultados foram semelhantes aos observados no sítio Sudlow I, onde os ligantes T3 e T3-2 apresentaram escores maiores que os ligantes T3-3 e T3-4.

Tabela 3.16. Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 no Sudlow II para os ligantes T3 e T3IP

(sítio – raio Å)	Ligantes	proteínas escores		
		1HK1	1HK2 (R218)	1HK3 (R218P)
Sudlow II- 6				
	T3	-51.8	-50.2	-52.4
	T3-2	-52.1	-51.7	-52.3
	T3-3	-48.5	-44.6	-48.5
	T3-4	-47.9	-43.9	-46.1

Os resultados do docking para o sítio FA5a com os ligantes T3 e T3IP estão apresentados na tabela 3.17. Assim como observado nos outros sítios de ligação, os ligantes T3 e T3-2 exibiram escores semelhantes e maiores que os T3-3 e T3-4.

Tabela 3.17. Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 no FA5a para os ligantes T3 e T3IP

(sítio – raio Å)	ligantes	proteínas escores		
		1HK1	1HK2 (R218H)	1HK3 (R218P)
FA5a - 6	T3	-69.9	-69.3	-66.7
	T3-2	-70.1	-70.0	-66.9
	T3-3	-59.9	-62.6	-52.2
	T3-4	-58.2	-60.8	-53.5

A Tabela 3.18 apresenta os resultados do docking para o sítio FA5b com os ligantes T3 e T3IP. Este sítio não apresentou saídas que seguissem as orientações de T4 (RX) nas proteínas 1HK1 e 1HK3 (R218P), pois está localizado em uma região altamente flexível da estrutura proteica. Na proteína 1HK2 (R218H), no sítio FA5b, os ligantes T3-3 e T3-4 apresentaram escores maiores que os ligantes T3 e T3-2 diferindo dos outros três sítios de ligação.

Tabela 3.18. Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 no FA5b para os ligantes T3 e T3IP

(sítio – raio Å)	ligantes	proteínas escores		
		1HK1	1HK2 (R218H)	1HK3 (R218P)
FA5b-8	T3	—	-52.7	—
	T3-2	—	-53.4	—
	T3-3	—	-61.2	—
	T3-4	—	-60.6	—

Para as duas proteínas HSA, 1HK4 (nativa) e a mutante 1HK5 (R218H), que contêm ácidos graxos em seus sítios de ligação e apresentam apenas um sítio de ligação para o hormônio T4, denominado Cleft, as saídas do redocking do ligante T4 (RX) estão apresentadas na Tabela 3.19. Em todos os ligantes, a mutante 1HK5 (R218H) exibiu escores maiores que a proteína nativa, com os ligantes T3 e T3-2 apresentando escores superiores aos dos ligantes T3-3 e T3-4.

Tabela 3.19. Resultados dos experimentos de docking, nas proteínas 1HK4 e 1HK5 no Cleft para os ligantes T3 e T3IP

(sítio – raio Å)	ligantes	proteínas escores	
		1HK4	1HK5 (R218H)
Cleft-5	T3	-53.1	-56.7
	T3-2	-57.2	-58.9
	T3-3	-48.2	-59.4
	T3-4	-47.6	-56.5

Para verificar a influência de cada um dos ligantes nas proteínas HSA, foram somados os escores dos quatro sítios de ligação nas três proteínas: 1HK1, 1HK2 (R218H) e 1HK3 (R218P). Esses valores foram comparados com os resultados de T4 (RX) e estão apresentados na Tabela 3.20.

Tabela 3.20. Resultados das somas dos quatro sítios das proteínas 1HK1, 1HK2 e 1HK3 com o ligantes T4, T3 e T3 IP

(sítio – raio 10 Å)	Σ de todos os sítios das proteínas HSA		
	1HK1	1HK2- R218H	1HK3 – R218P
T4	-250.0	-256.6	-255.2
T3	-230.2	-238.2	-236.1
T3-2	-231.2	-240.8	-236.8
T3-3	-222.1	-227.2	-223.2
T3-4	-219.0	-220.9	-220.8

Os ligantes T3 (biologicamente ativo) e T3-2 são considerados equivalentes, assim como os ligantes T3-3 e T3-4 (biologicamente inativo), devido à capacidade dessas estruturas de rotacionar em busca da posição de menor energia. Essa flexibilidade estrutural permite que diferentes conformações sejam alcançadas, resultando em interações semelhantes com as proteínas HSA. Os ligantes na forma biologicamente ativa do hormônio tireoidiano T3 e T3-2 apresentaram escores semelhantes e maiores do que os dos ligantes biologicamente inativo o T3-3 e T3-4 nas cinco proteínas HSA. A soma dos escores para T3 segue a ordem: 1HK2 < 1HK3 < 1HK1, a mesma observada para o T4.

Os valores experimentais das constantes de ligação dos hormônios T4 ($Ka = 1 \times 10^{10}$) e T3 $Ka = 1 \times 10^9$, demonstram uma afinidade maior para T4 que foram compatíveis com os

resultados encontrados nos escores apresentados na Tabela 3.20 (Mimoto & Refetoff, 2020). O mesmo ocorreu nas proteínas que apresentam apenas o Cleft, onde a mutante 1HK5 apresentou escores maior que a nativa 1HK4.

3.7. Análise das Interações do docking molecular com o ligante T3

Dada a similaridade das estruturas dos ligantes, T4 e T3 (diferindo por apenas um átomo de iodo), foram realizadas análises das interações dos complexos obtidos no docking molecular para avaliar as diferenças entre eles. As análises das interações foram realizadas de acordo com a Tabela 3.3 da análise de T4 para comparar com o ligante T3.

As interações dos átomos de iodo do hormônio T3 com a proteína 1HK1 estão detalhadas no Apêndice 9, na Tabela 9A. A análise de interação no sítio Sudlow I na proteína 1HK1 com o hormônio T3 revelou interações π com os resíduos L238 e A291, além de ligações de hidrogênio com os aminoácidos K199, R222 e R257 (Figura 3.24). Em comparação ao T4 (Figura 3.13 A), observou-se a ausência da ligação de hidrogênio com Y150 e a presença de uma interação com R222 (HB). O hormônio T4 apresentou uma maior afinidade com um escore de -62.3 que T3 com -55.8.

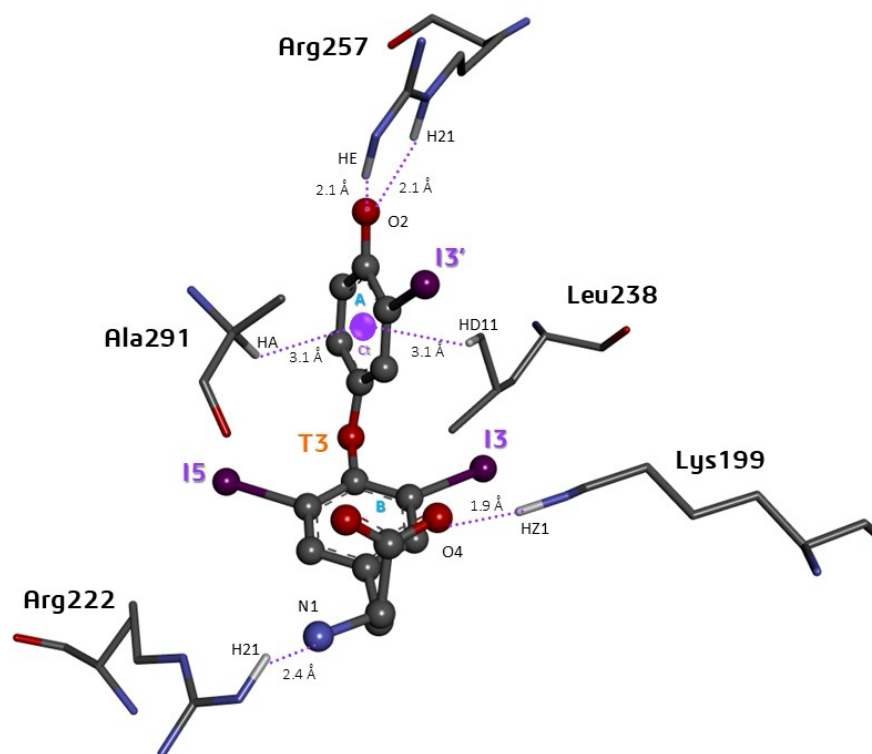


Figura 3.24. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA nativa 1HK1 com o Ligante T3.

As interações de cada iodo de T3 avaliadas para a proteína 1HK1 estão apresentadas na Tabela 3.21. O ligante T3 perdeu a interação com o resíduo carregado positivamente R218 (vdW) e as ligações de hidrogênio do I5' com o resíduo K199 e do I3' com I290, que estavam presentes no T4 (Tabela 3.4). No Apêndice 9, na Tabela 9B descreve detalhadamente as interações do ligante T3 com a proteína 1HK1.

Tabela 3.21. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações dos átomos de iodo

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I							
		Y150	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
1HK1	T3								
B	I3		X		X	X			
	I5			X				X	X
A (OH)	I3'	X					X		X

Na proteína 1HK2 (R218H) T4 também apresentou uma maior afinidade com um escore de -69.4 que T3 com -66.0. A análise de interação no sítio Sudlow I com T3 revelou interações π com os resíduos H218, L238 e A291, além de ligações de hidrogênio com aminoácidos Y150, R222 e R257 (Figura 3.25). Em comparação ao T4 (Figura 3.13 B), observou-se a ausência da ligação de hidrogênio com o resíduo carregado positivamente K199 e a presença de uma interação com R222 (HB). As interações do hormônio T3 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas no Apêndice 10, na Tabela 10A.

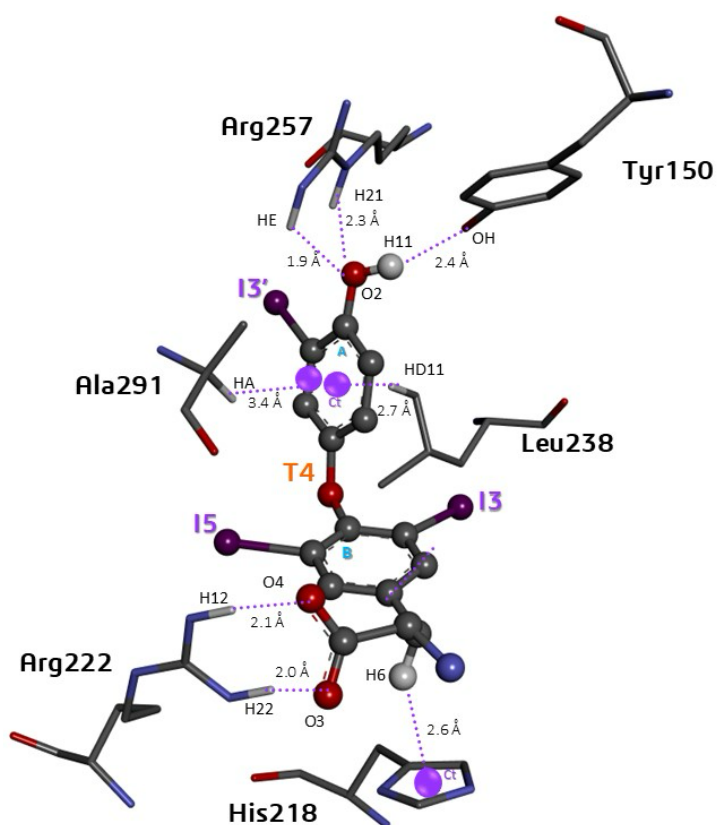


Figura 3.25. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.

As interações de cada iodo de T3 avaliadas para a proteína mutante 1HK2 estão apresentadas na Tabela 3.22. Foi observado que o ligante T3 perdeu a interação com o resíduo Q196 e uma das ligações de hidrogênio com os resíduos Y150, K199 e A291, que estavam presentes no T4 (Tabela 3.5). No Apêndice 10, na Tabela 10B descreve detalhadamente as interações dos átomos de iodo do ligante T3 com a proteína mutante 1HK2.

Tabela 3.22. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações dos átomos de iodo

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I								
		Y150	H218	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
1HK2	T3									
	I3			X		X	X			
B	I5				X				X	X
	I3'					X		X	X	
A (OH)										

A análise de interação no sítio Sudlow I na proteína 1HK3 (R218P) com o hormônio T3 mostrou interações π com os resíduos P218, L238 e A291 e ligações de hidrogênio com os aminoácidos K195, K199, R222 e R257 (Figura 3.26). Em comparação ao T4 (Figura 3.13 C), observou-se a ausência da ligação de hidrogênio com Y150 e a presença de interações com R222 (HB). T4 também apresentou uma maior afinidade com um escore de -67.8 que T3 com -64.3. As interações do hormônio T3 com a proteína mutante 1HK3 estão detalhadas no Apêndice 11, na Tabela 11A.

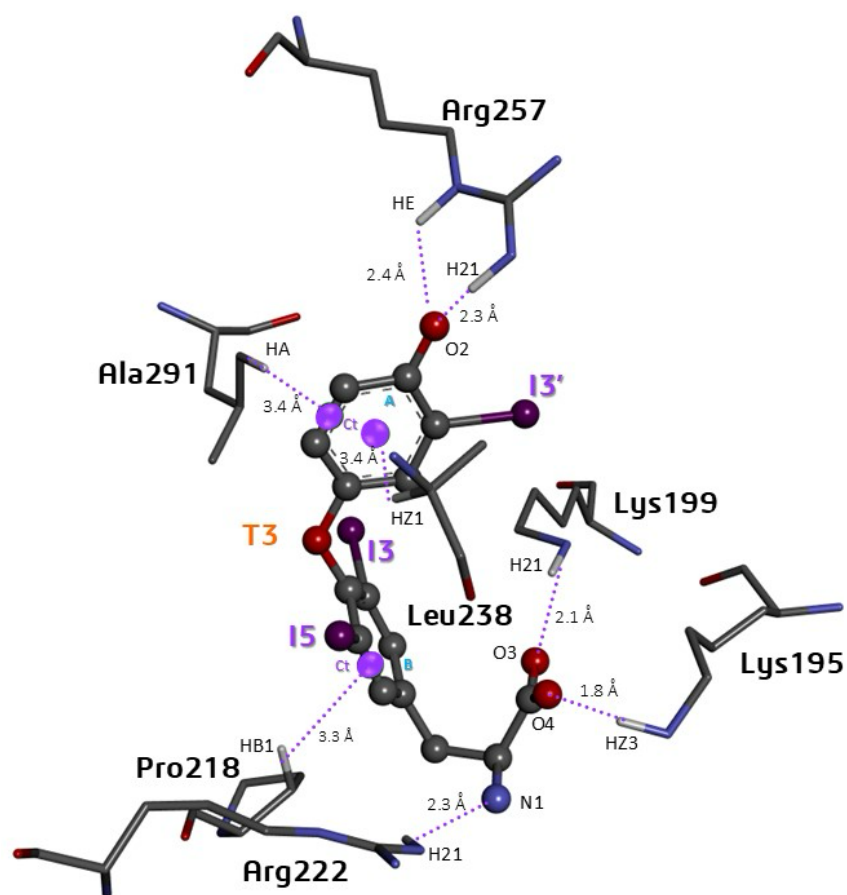


Figura 3.26. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow I da Proteína HSA mutante 1HK3 (R218P) com o Ligante T3.

As interações de cada iodo de T3 avaliadas na mutante 1HK3 estão apresentadas na Tabela 3.23. Verificou-se que o ligante T3 perdeu uma interação com o resíduo Q196, além de uma ligação de hidrogênio com o resíduo carregado positivamente R257, que estavam presentes no hormônio T4 (Tabela 3.6). No Apêndice 11, na Tabela 11B descreve detalhadamente as interações dos átomos de iodo do ligante T3 com a proteína mutante 1HK3.

Tabela 3.23. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás as interações dos átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	Sudlow I							
		Y150	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
1HK3	T3								
B	I3			X				X	X
	I5		X		X				
A (OH)	I3'	X	X			X		X	X

A ordem dos escores de T3 no Sudlow I nas proteínas HSA foi 1HK2 > 1HK3 > 1HK1. Na proteína mutante 1HK2, observou-se um aumento na interação do resíduo H218 (interação π), além de uma ligação de hidrogênio entre o I3' e os resíduos I290 e L238. Em 1HK3, foram identificados um aumento nos resíduos K195 (HB) e P218 (interação π), além de uma ligação de hidrogênio entre o I3' e o resíduo K199, em comparação com a proteína nativa 1HK1.

Em T4 foram analisados somente o Sudlow I nas três proteínas HSA pelo fato de conterem o resíduo 218. Os demais sítios são similares, e para T3 foram seguidas as mesmas análises de interação de T4 (Tabela 3.3).

A Figura 3.27 apresenta a análise das interações no sítio Sudlow II com o hormônio T3 na 1HK2 (R218H), que manteve as interações π com o resíduo L394 e as ligações de hidrogênio com Y411 e S489, conforme identificado para T4 (Figura 3.14). T4 apresentou uma maior afinidade com um escore de -52.3 que T3 com -50.2. As interações do hormônio T3 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas no Apêndice 12, na Tabela 12A.

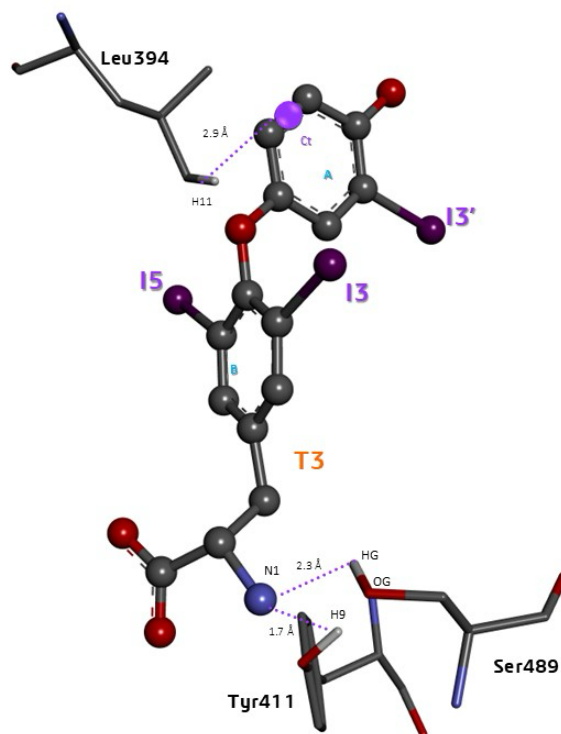


Figura 3.27. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação Sudlow II da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.

As interações de cada iodo de T3 avaliadas na mutante 1HK2 estão apresentadas na Tabela 3.23. Pode-se observar que o ligante T3 perdeu a interação com os resíduos carregados positivamente R410 e K414, além de uma ligação de hidrogênio do I3' com L387 e duas ligações entre I3' e I5' com Y411, que estavam presentes no hormônio T4 (Tabela 3.11). As interações dos iodios de T3 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas no Apêndice 12, na Tabela 12B.

Tabela 3.23. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. lilás as interações dos átomos de iodo

PROTEÍNA 1HK2	LIGANTE	Sudlow II						
		L387	Q390	N391	L394	L407	Y411	S489
B	I3	X	X	X				
	I5				X	X		
A (OH)	I3'							X

T4 apresentou uma maior afinidade com um escore de -78.2 que T3 com -69.3. A Figura 3.28 está representando as interações no sítio FA5a da mutante 1HK2 com o hormônio T3. Observou-se uma interação π com os resíduos F507 e duas ligações de hidrogênio com K524, enquanto em T4 (Figura 3.15) a interação π foi com resíduo F507 e as duas ligações de hidrogênio com T508. As interações do ligante T3 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas no Apêndice 13, na Tabela 13A.

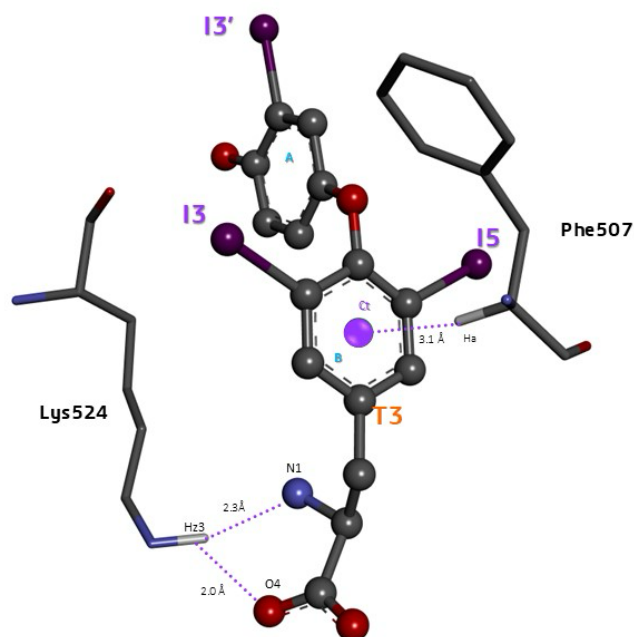


Figura 3.28. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5a da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.

As interações de cada iodo de T3 avaliadas para a proteína 1HK2 (R218H) no sítio FA5a estão apresentadas na Tabela 3.24. Foi observado que o ligante T3 perdeu uma interação entre o I5 e o resíduo K524, que estavam presentes no T4 (Tabela 3.12). As interações dos iodios de T3 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas no Apêndice 13, na Tabela 13B.

Tabela 3.24. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a					
		F507	I513	K524	A528	F551	V555
1HK2	T3						
	I3	X		X	X		
B	I5	X	X			X	X
	I3'					X	
A (OH)	I3'					X	

A análise das interações no sítio FA5b da proteína 1HK2 (R218H) com o hormônio T3 (Figura 3.29) mostrou que a interação π com o resíduo F502, observadas em T4 (Figura 3.16), foi mantida. Além disso, houve uma nova interação π com L575 e uma ligação de hidrogênio com A508. T4 apresentou uma maior afinidade com um escore de -56.6 que T3 com -52.7. As interações do ligante T3 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas no Apêndice 14, na Tabela 14A.

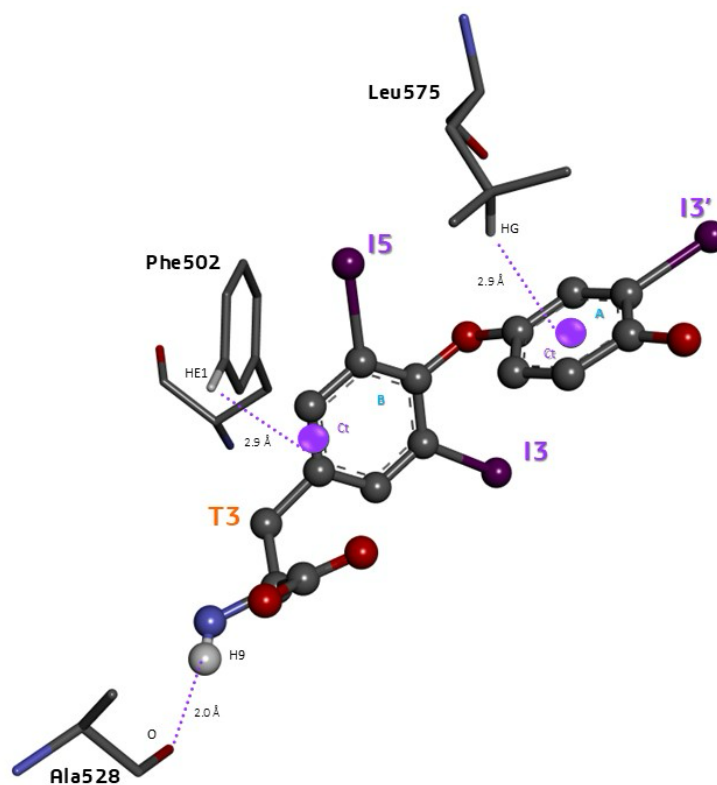


Figura 3.29. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5b da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.

As interações de cada um dos iodos de T3 avaliados na mutante 1HK2 no sítio FA5b estão apresentadas na Tabelas 3.25. O ligante T3 perdeu a interação com os resíduos F507 e V547, e uma das ligações de hidrogênio entre I5' com F502, L532 e H535 e entre I3' com os resíduos A528, L532 e F551 que estavam presentes no hormônio T4 (Tabela 3.13). As interações dos iodos de T3 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas no Apêndice 14, na Tabela 14B.

Tabela 3.25. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodos de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b					
		F502	A528	L532	H535	F551	L575
1HK2	T3						
B	I3				X		
	I5	X				X	X
A (OH)	I3'						

Para a proteína nativa 1HK4, a análise das interações no Cleft com o hormônio T3 é apresentada na Figura 3.30. T4 apresentou uma maior afinidade com um escore de -64.0 que T3 com -54.5. O ligante T3 manteve as interações π com os resíduos Y452 e A191, além de uma das ligações de hidrogênio com K436, observadas em T4 (Figura 3.14 A), e apresentou uma nova interação π com E188. As interações do ligante T3 com a proteína 1HK4 estão detalhadas no Apêndice 15, na Tabela 15A.

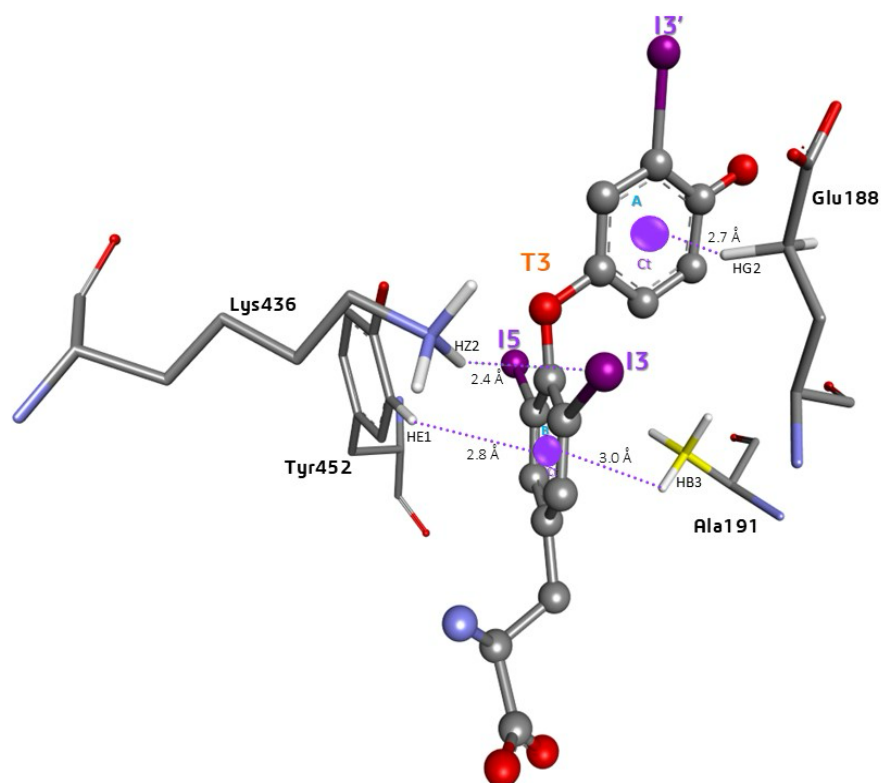


Figura 3.30. Representação das interações π e da ligação de hidrogênio no Sítio de Ligação FA5b da Proteína HSA mutante 1HK2 (R218H) com o Ligante T3.

As interações de cada iodo de T3 avaliadas na proteína 1HK4 no Cleft estão apresentadas na Tabela 3.26. Em comparação ao T4, o ligante T3 perdeu interações com os resíduos D429 e V433, que estavam presentes no T4 (Tabela 3.10). As interações dos iodios de T3 com a proteína mutante 1HK2 estão detalhadas no Apêndice 15, na Tabela 15B.

Tabela 3.26. Análise de Interação do Cleft com a proteína da 1HK4 com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	CLEFT						
		D187	Q188	A191	K195	K436	D451	Y452
1HK4	T3							
B	I3	X	X	X				
	I5					X		
A (OH)	I3'				X		X	X

3.8. Análise das Interações do docking molecular com os ligantes T3IP

Os resultados da dinâmica e do docking molecular demonstraram que T3 e T3-2 são equivalentes, assim como T3-3 e T3-4. Além disso, os ligantes T3 e T3-2 apresentaram maior afinidade em comparação com T3-3 e T3-4. O ligante T3 é biologicamente ativo, enquanto T3-4 é biologicamente inativo. Foi realizada uma análise das interações desses ligantes com a proteína mutante 1HK2 (R218H) nos quatro sítios de ligação: Sudlow I, Sudlow II, FA5a e FA5b. As interações dos ligantes T3IP com a proteína 1HK2 (R218H) estão detalhadas no Apêndice de 16 a 27.

A Tabela 3.27 apresenta as interações no sítio Sudlow I com o ligante T3-2. Comparativamente, os ligantes T3 (Tabela 3.22) e T3-2 demonstraram diferenças, como a ausência do resíduo Y150 e das interações entre o átomo de iodo I3' e o resíduo K199 no ligante T3-2. Em contrapartida, a interação entre o resíduo A291 e o iodo I3' foi observada apenas no ligante T3-2, estando ausente no ligante T3 (Apêndice 16, Tabela 16B). Para os ligantes T3-3 (Tabela 3.28) e T3-4 (Tabela 3.29), foi observada uma diferença na interação com os resíduos específicos da proteína. No caso do ligante T3-3, não foi identificada a interação com o resíduo A291, enquanto essa interação está presente no ligante T4-3. Já para o ligante T3-4, destacam-se a ausência das interações com os resíduos K199 e H242, que, por outro lado, estão presentes no ligante T3-3 (Apêndice 17 e 18, Tabelas 17B e 18B).

Conforme a ordem de afinidade dos escores, T3 biologicamente ativo (Tabela 3.22) possui maior afinidade em comparação ao T3-4 biologicamente inativo (Tabela 3.29), apresentando interações com os resíduos K199 e H242, além das interações com os I3 e I3' com o resíduo L238 e entre I5 e L290, ausentes em T3-4.

Tabela 3.27. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás interações com átomos de iodo

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I							
		H218	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
1HK2	T3-2	H218	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
B	I3			X				X	X
	I5		X		X	X			
A (OH)	I5'							X	

Tabela 3.28. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-3. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás interações com átomos de iodo

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I							
		Y150	H218	K199	R222	L238	H242	R257	I290
1HK2	T3-3	Y150	H218	K199	R222	L238	H242	R257	I290
B	I5				X			X	
A (OH)	I3'	X		X			X		
	I5'								X

Tabela 3.29. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás interações com átomos de iodo

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I							
		Y150	H218	R222	L238	R257	I290	A291	
1HK2	T3-4	Y150	H218	R222	L238	R257	I290	A291	
B	I3			X					
A (OH)	I3'	X				X		X	
	I5'						X		

No sítio Sudlow II, os ligantes T3 (Tabela 3.24) e T3-2 (Tabela 3.30) apresentam interações com os mesmos resíduos, mas diferem em interações dos átomos de iodios. O resíduo S489 interage com o I3' no ligante T3, enquanto essa interação está ausente em T3-2. Por outro lado, as interações entre o I5 e o resíduo N391, bem como entre o I5' e o resíduo L394, estão presentes em T3-2, mas ausentes em T3 (Apêndices 19, na Tabela 19B). Já T3-3 e T3-4 apresentam os mesmos resíduos e interações nesse sítio (Tabelas 3.31 e 3.32). De acordo com os resultados do docking, T3 e T3-2 apresentam maior afinidade em

comparação aos outros dois ligantes, possivelmente devido às interações com L387 e L407, que estão ausentes em T3-3 e T3-4 (Apêndices 20 e 21, Tabelas 20B e 21B).

Tabela 3.30. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2. Em lilás estão as interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	Sudlow II							
		1HK2	T3-2	L387	Q390	N391	L394	L407	Y411
B	I3		X	X	X				
	I5				X	X	X		
A (OH)	I5'					X			

Tabela 3.31. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-3. Em lilás estão as interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	Sudlow II					
		1HK2	T3-3	L387	Q390	N391	Y411
B	I5		X	X	X		
A (OH)	I3'		X				X
	I5'						

Tabela 3.32. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em lilás estão as interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	Sudlow II					
		1HK2	T3-4	L387	Q390	N391	Y411
B	I3		X	X			
A (OH)	I3'		X				X
	I5'					X	

A Tabela 3.33 apresentam a análise de interação do sítio FA5a com o ligante T3-2. T3 (Tabela 3.25) e T3-2 interagem com os mesmos resíduos nesse sítio de ligação (Apêndice 22, Tabela 22B). Já os ligantes T3-3 (Tabela 3.38) e T3-4 (Tabela 3.39) se diferem por uma interação entre o resíduo V555 e o I3' presentes em T3-4 e ausente em T3-3 (Apêndices 23

e 24, Tabelas 23B e 24B). Conforme a ordem de afinidade dos escores, T3 biologicamente ativo (Tabela 3.25) possui maior afinidade em comparação ao T3-4 biologicamente inativo (Tabela 3.35), apresentando interações com os resíduos F507 e K524, ausentes em T3-4.

Tabela 3.33. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodos de T3-2. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em lilás interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a					
		T3-2	F507	I513	K524	A528	F551
B	I3	X			X	X	
	I5	X	X				X
A (OH)	I5'						

Tabela 3.34. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodos de T3-3. Em lilás estão as interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a				
		T506	I513	A528	F551	V555
B	I5			X	X	
A (OH)	I3'		X			
	I5'					

Tabela 3.35. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodos de T3-4. Em lilás estão as interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a				
		T506	I513	A528	F551	V555
B	I3			X	X	
A (OH)	I3'		X			X
	I5'					

A análise das interações do sítio FA5b com os ligantes T3 (Tabela 3.26) e T3-2 (Tabela 3.36), mostraram o T3 interage com os mesmo que T3-2 e as interações com os resíduos

nesse sítio de ligação (Apêndice 25, tabela 25B). Isso é observado também para os ligantes T3-3 (Tabela 3.38) e T3-4 (Tabela 3.39). Apenas neste sítio, o ligante T3-4 biologicamente inativo apresentara uma afinidade maior que T3 biologicamente ativo. O ligante T3-4 interage com o resíduo F507 e apresenta mais interações com os iodos que o ligante T3 (Apêndices 26 e 27, Tabelas 26B e 27B).

Tabela 3.36. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodos de T3-2. Em lilás estão as interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b						
		1HK2	T3-2	F502	A528	L532	H535	F551
B	I3					X		
	I5		X				X	X
A (OH)	I5'							

Tabela 3.37. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodos de T3-3. Em lilás estão as interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b							
		1HK2	T3-3	F502	F507	A528	L532	F551	L575
B	I5				X	X	X	X	
A (OH)	I3'		X						X
	I5'								

Tabela 3.39. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodos de T3-4. Em lilás estão as interações com átomos de iodo

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b							
		1HK2	T3-4	F502	F507	A528	L532	F551	L575
B	I3				X	X	X	X	
A (OH)	I3'								
	I5'		X						X

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES

Este trabalho proporcionou um avanço no entendimento das interações moleculares entre os hormônios tireoidianos T4, T3 e seus isômeros posicionais (T3IP) com a Albumina Sérica Humana (HSA), por meio de uma abordagem *in silico*. As análises de docking, da dinâmica molecular e das interações nos sítios de ligação, revelaram a complexidade e especificidade das interações, destacando os fatores que influenciam a afinidade de ligação e a estabilidade dos complexos formados.

No início deste trabalho foram feitas algumas perguntas:

A primeira pergunta a ser respondida como a HSA consegue diferenciar T4 de T3. Dados da literatura mostram diferentes constantes de afinidade para os dois hormônios em relação à HSA. Os estudos de docking que evidenciam dados estruturais HSA-T4 e HSA-T3 conseguem refletir essa situação?

Diferenças de Afinidade entre T3 e T4: Observou-se que, apesar da semelhança estrutural entre T3 e T4, a presença de um átomo adicional de iodo no T4 contribui para uma afinidade de ligação mais elevada nos sítios de ligação da HSA, especialmente em Sudlow I. Essa diferença é corroborada pelos escores de docking, que indicam uma interação mais favorável entre T4 e os sítios de ligação da proteína nativa e suas variantes mutantes.

A segunda pergunta diz respeito a diferenças encontradas para afinidade entre HSA-T4 para as proteínas nativa (1HK1, sem ácidos graxos e 1HK4, com ácidos graxos) e mutantes (1HK2 e 1HK3, sem ácidos graxos e 1HK5, com ácidos graxos). Os estudos estruturais conseguem, mais uma vez, considerando dados estruturais dos complexos refletir as diferenças?

Impacto das Mutações no Resíduo R218: As mutações no resíduo R218, que resultaram nas variantes R218H e R218P, demonstraram efeitos distintos na afinidade de ligação dos hormônios tireoidianos. As proteínas mutantes 1HK2 (R218H) e a 1HK3 (R218P) apresentaram uma maior afinidade para o T4, em comparação com a proteína nativa (1HK1), devido ao aumento de interações π , ligações de hidrogênio e das interações entre

os átomos de iodo de T4 com os resíduos do sítio de ligação. Esses resultados destacam a importância do resíduo R218 na modulação das interações proteína-ligante.

Influência dos Ácidos Graxos: A presença de ácidos graxos nos complexos cristalográficos das proteínas 1HK4 (nativa) e 1HK5 (R218H) afetou a disponibilidade dos sítios de ligação, limitando a interação com o T4 a um único sítio (Cleft). Os resultados dos experimentos de docking mostraram que a mutante 1HK5 manteve uma maior afinidade de ligação.

A terceira pergunta refere-se aos ligantes T3. O hormônio T3 difere de T4 em um iodo, com posição específica. Como há 4 iodios presentes em T4, foram avaliados 4 isômeros posicionais de T3. Os estudos estruturais podem mostrar se estes compostos são diferentes para a HSA?

Isômeros posicionais de T3 e Flexibilidade Estrutural: A análise dos isômeros posicionais de T3 (T3IP) evidenciou que a flexibilidade estrutural dos ligantes é um fator importante na determinação das interações com a HSA. Os escores de docking dos isômeros T3-2 e T3-4 indicaram que a remoção de um átomo de iodo no anel A ou B influencia de forma diferenciada a afinidade de ligação, com T3 e T3-2 apresentando uma interação maior. Isso sugere que a posição do átomo de iodo pode modular as interações de forma sutil, mas significativa. A análise dos isômeros posicionais de T3 (T3IP) revelou que a flexibilidade estrutural dos ligantes é um fator determinante para as interações com a Albumina Sérica Humana (HSA). O T3, sendo a forma biologicamente ativa dos hormônios tireoidianos, mostrou maior afinidade pela HSA em comparação ao T3-4, que corresponde à forma biologicamente inativa (T3 reverso).

Além disso é possível supor que os resultados aqui obtidos possam contribuir para outros avanços:

Contribuições para Aplicações Terapêuticas: Os achados deste estudo podem ser aplicados no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas para o transporte de hormônios tireoidianos em condições de mutações genéticas ou desordens metabólicas.

A compreensão detalhada das diferenças de afinidade entre T3 e T4 e a influência de mutações na HSA fornece uma base sólida para futuras pesquisas focadas na modulação da biodisponibilidade desses hormônios.

Este trabalho amplia o conhecimento sobre as interações dos hormônios tireoidianos com a HSA, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos de transporte e suas variações em condições de mutação. Os resultados apresentados aqui servem como ponto de partida para investigações experimentais que possam validar as tendências observadas nos estudos *in silico* e explorar novas aplicações no campo da endocrinologia e biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- AL-HARTHI, S., LACHOWICZ, J. I., NOWAKOWSKI, M. E., JAREMKO, M., JAREMKO, L. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 189, 110716, 2019.
- ASCENZI, P., BOCEDI, A., NOTARI, S., FANALI, G., FESCE, R., & FASANO, M. Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 6, n. 4, p. 483-489, 2006.
- ASCENZI, P., DI MASI, A., FANALI, G. Heme-based catalytic properties of human serum albumin. **Cell Death Discovery**, v.1, 15025, 2015.
- ASCENZI, P., DI MASI, A., LEBOFFE, L., FANALI, G., & FASANO, M. The drug-dependent five- to six-coordination transition of the heme-Fe atom modulates allosterically human serum heme-albumin reactivity. **Rendiconti Lincei**, v. 28, p. 207-215, 2017.
- ASCENZI, P., FASANO, M. Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. **Biophysical Chemistry**, v. 148, n. 1–3, p. 16-22, 2010.
- BASSETT, J. H. D., WILLIAMS, G. R. Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance. **Endocrine reviews**, v. 37, n. 2, 135-187, 2016.
- CARTER, D. C., HE, X. M. Structure of human serum albumin. *Science*, v. 249, p. 302-303, 1990.
- CHUGH, H., KUMAR, P., TOMAR, V., KAUR, V., SOOD, D., CHANDRA, R. Interaction of noscapine with human serum albumin (HSA): A spectroscopic and molecular modelling approach, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 372, p.168-176, 2019.
- CLARK, Matthew; CRAMER III, Richard D.; VAN OPDENBOSCH, Nicole. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 982-1012, 1989.

CODY, V. I. V. I. A. N. Structure of thyroxine: role of thyroxine hydroxyl in protein binding. **Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, 37(9), 1685-1689, 1981

DARBY, N. J AND CREIGHTON, THOMAS E., 1940-. **Protein structure** / N.J. Darby and T.E. Creighton IRL Press at Oxford University Press Oxford; New York 1993

Discovery Studio Visualizer and ActiveX Control - Free Life Science Visualization Tools
<http://www.3dsbiovia.com/resource-center/downloads/freeware/index.html>

DSVisualizer - DISCOVERY STUDIO 3.5 - Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.5, San Diego: Accelrys Software Inc., 2012.
<http://accelrys.com/products/discovery-studio> ; DISCOVERY STUDIO VSUALIZER v20.1.0.19295

EBSERH <https://www.gov.br/ebserh/pt-br/comunicacao/noticias/voce-sabe-qual-e-a-importancia-que-a-tireoide-tem-no-seu-organismo>, acessado em 05 de setembro de 2024.

EL MAATY, M. I. A., ABO-ELKHIER, M. M., & ABD ELWAHAAB, M. A. 3D graphical representation of protein sequences and their statistical characterization. **Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications**, 389(21), 4668-4676, 2010

FANALI, G., MAIS, A., TREZZA, V., MARINO, M., FASANO, M., ASCENZI, P. Human serum albumin: From bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 3, p. 209-290, 2012.

FASANO, M., CURRY, S., TERRENO, E., GALLIANO, M., FANALI, G., NARCISO, P., NOTARI, S. & ASCENZI, P. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. **IUBMB life**, v. 57, n. 12, p. 787-796, 2005.

FREIRE, T. S., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., FRIEDMAN, R., CARACELLI, I. Structural and thermodynamic characterization of allosteric transitions in human serum albumin with

metadynamics simulations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 26, n. 7 p. 6436-6447, 2024.

GHUMAN, J., ZUNSZAIN, P. A., PETITPAS, I., BHATTACHARYA, A. A., OTAGIRI, M., & CURRY, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of molecular biology**, v. 353, n. 1, p. 38-52, 2005

GUYTON, ARTHUR C. HALL JE. Tratado de Fisiologia Médica. 12 Edição. **Elsevier**. 2011.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209-215, 1992.

HUANG, S.A.; CASTRONEVES, L. A. **Thyroid Hormone Metabolism**. Thyroid Hormone Metabolism. 1ed. Berlim, Alemanha: Springer Science & Business Media, v. 1, p. 1-16, 2010

JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1992.

JONES, Gareth; WILLETT, Peter; GLEN, Robert C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of molecular biology**, v. 245, n. 1, p. 43-53, 1995.

LINDSEY, R. C., AGHAJANIAN, P., MOHAN, S., Thyroid hormone signaling in the development of the endochondral skeleton. **Vitamins and hormones**, v. 106, p. 351-381, 2018.

LITWACK, G. Micronutrients (Metals and Iodine). **Academic Press: Cambridge**, MA, USA, p. 591-643, 2018.

MAHENDHAR, R., SHAHBAZ, A., RIAZ, M., ANINYEI, M., REICH, D. M., SACHEMECHI, I. Effect of Albumin Polymorphism on Thyroid Hormones: A Case Report and Literature Review. **Cureus**, v. 10, n. 7, e2903, 2018.

MIMOTO, Mizuho S.; REFETTOFF, Samuel. Clinical recognition and evaluation of patients with inherited serum thyroid hormone-binding protein mutations. **Journal of endocrinological investigation**, v. 43, p. 31-41, 2020.

NUNES, MARIA TEREZA. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 639-643, 2003.

PAPPA, T, FERRARA, A. M., REFETTOFF, S. Inherited defects of thyroxine-binding proteins. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 29, n. 5, p. 735-747, 2015.

PDB <https://www.rcsb.org/>

PETITPAS, I., PETERSEN, C. E., HA, C. E., BHATTACHARYA, A. A., ZUNSZAIN, P. A., GHUMAN, J., BHAGAVAN, N. V., CURRY, S. Structural basis of albumin–thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 11, p. 6440-6445, 2003.

RABBANI, G., AHN, S. N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 979-990, 2019.

RCSB. Protein Data Bank. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>. Acesso em: fevereiro, 2024.

RAHIMI, KOSAR; PIAGGI, PABLO M.; ZERZE, GÜL H. Comparison of on-the-fly probability enhanced sampling and parallel tempering combined with metadynamics for atomistic simulations of RNA tetraloop folding. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 127, n. 21, p. 4722-4732, 2023.

SACCO, A. C. S. ; SOUZA, L. M. ; CARACELLI, I. ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Software **WIM** (Weak Interaction Mapping). Programa de Computador. Número do registro: PC2017/004 BR 51 2019 002779-5 WIM - WEAK INTERACTION MAPPING 04/12/2019

Instituição de registro: Agência de Inovação da UFSCar - Aln. PC2017/004 BR 51 2019
002779-5 WIM - WEAK INTERACTION MAPPING 04/12/2019

SACCO, A. C. S. **Mapeamento vetorial de interações eletrostáticas para biomoléculas. 2013. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia** - Universidade Federal de São Carlos. Prof.Dr. Julio Zukerman Schpector, orientador: Profa.Dra. Ignez Caracelli.

SAPUNDZHI, F., PRODANOVA, K., & LAZAROVA, M. (2019, November). Survey of the scoring functions for protein-ligand docking. **In AIP Conference Proceedings** (Vol. 2172, No. 1). AIP Publishing, 2019.

SAPUNDZHI, F., PRODANOVA, K., & LAZAROVA, M. (2019, November). Survey of the scoring functions for protein-ligand docking. **In AIP Conference Proceedings** (Vol. 2172, No. 1). AIP Publishing.

SOUZA, P.C.T. *ET AL.* SOUZA, P. C. T., PUHL, A. C., MARTÍNEZ, L., APARÍCIO, R., NASCIMENTO, A. S., FIGUEIRA, A. C. M., NGUYEN, P., WEBB, P., SKAF, M.S. & POLIKARPOV, I. Identification of a new hormone-binding site on the surface of thyroid hormone receptor. **Molecular endocrinology**, v. 28, n. 4, p. 534-545, 2014.

VENTURINI, D., SOUZA, A. R., CARACELLI, I., MORGON, N. H., SILVA-FILHO, L. C., XIMENES, V. F. Induction of axial chirality in divanillin by interaction with bovine serum albumin. **PLoS One**, v. 12, n. 6, e0178597, 2017.

WOJTCZAK, A., CODY, V., LUFT, J. R., PANGBORN, W. Structure of rat transthyretin (rTTR) complex with thyroxine at 2.5 Å resolution: first non-biased insight into thyroxine binding reveals different hormone orientation in two binding sites. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 57, n. 8, p. 1061-1070, 2001.

YOGUIM, M. I., GRANDINI, G. S., BERTOZO L. C., CARACELLI, I., XIMENES, V. F., SOUZA, A. R. Studies on the Interaction of Rose Bengal with the Human Serum Albumin Protein under Spectroscopic and Docking Simulations Aspects in the Characterization of Binding Sites. **Chemosensors**, v. 10, n. 11, p. 440, 2022.

ZSILA, F. (2013). Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. **Molecular pharmaceutics**, 10(5), 1668-1682.

ZUNSZAIN, P. A., GHUMAN, J., MCDONAGH, A. F., CURRY, S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. **Journal of molecular biology**, v. 381, n. 2, p. 394-406, 2008.

APÊNDICE

1. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com o ligante e os iodios de T4

Tabela 1A. Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com T4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π e em preto interações de van der Waals

HSA-T4 – Sudlow I	
interação	distância Å
TYR150:OH...T4 :H4'	2.4
LYS199:HZ1...T4 :OXT	1.7
ARG218:OH...T4 :H	2.4
LEU238: CH... π T4 (Ct A)	2.9
ARG257:HE...T4:O4'	2.2
ARG257:HH21...T4:O4'	1.9
ALA291: CH... π T4 (Ct A)	3.0

Tabela 1B. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I							
		Y150	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
1HK1	T4-RX								
B	I3		I... HE1 3.2 Å		I...HD21 2.6 Å		I...HE 3.0 Å		
	I5			I... HG1 3.6 Å				I... O 3.3 Å	I... HA 2.8 Å
A (OH)	I3'							I... HB 3.9 Å	
	I5'	I... HE2 3.0 Å	I... HZ2 3.5 Å			I...NE1 3.2 Å			I... HB1 3.6 Å

2. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T4

Tabela 2A. Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com T4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T4 – Sudlow I	
interação	distância Å
TYR150:OH...T4 :H4	2.3
LYS199:HZ1...T4 :OXT	1.7
CH... π – HIS218 CTt: H72	2.2
LEU238: CH... π T4 (Ct A)	2.6
ARG257:HE...T4:O4'	2.3
ARG257:HH21...T4:O4'	2.1
ALA291: CH... π T4 (Ct A)	3.4

Tabela 2B. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I								
		Y150	Q196	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
1HK2	T4-RX									
	I3			I... HE2 3.6 Å		I...HG 3.0 Å				
B	I5	I... HE2 3.3 Å			I... HG2 3.9 Å				I... O 3.2 Å	I... O 3.1 Å
	I3'					I...HD11 3.6 Å		I...HE 2.8 Å	I... HB 3.8 Å	
A (OH)	I5'		I... HE22 3.9 Å	I... HZ2 3.4 Å			I...HE1 3.2 Å			I... HB1 3.6 Å

3. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com o ligante e os iodios de T4

Tabela 3A. Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com T4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T4 – Sudlow I	
interação	distância Å
TYR150:OH...T4:H4'	2.3
LYS195:HZ3...T4 :O	2.1
LYS199:HZ1...T4 :OXT	2.1
PRO218: CH... π T4 (Ct B)	3.0
LEU238: CH... π T4 (Ct A)	2.6
ARG257:HH21...T4:O4'	2.3
ALA291: CH... π T4 (Ct A)	3.2

Tabela 3B. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK3 (R218P) com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I								
		Y150	Q196	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
1HK3	T4-RX									
	I3			I... HE1 3.6 Å		I...HD22 3.1 Å				I... HA 3.2 Å
B	I5				I... HG2 3.8 Å				I... O 3.4 Å	
	I3'							I...HE 3.0 Å	I... HB 3.7 Å	
A (OH)	I5'	I... HE2 3.2 Å	I... HE22 3.9 Å	I... HZ2 3.1 Å			I...HE1 3.1 Å			I... HB1 3.7 Å

4. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T4

Tabela 4A. Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com T4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T4 – Suddlow II	
interação	distância Å
LEU394: CH... π T4 (Ct B)	2.9
TYR411:HH...T4:O4'	1.9
SER489:OG...T4:H4'	2.1
SER489:HG...T4:O4'	1.8

Tabela 4B. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	Sudlow II								
		L387	Q390	N391	L394	L407	R410	Y411	K414	S489
1HK2 B	I3	I...HG 3.1 Å	I...HB1 2.7 Å	I...HN 2.6 Å						
	I5					I...HD2 2.7 Å	I...B3 3.4 Å			
A (OH)	I3'	I...HD21 3.8 Å						I...O 3.9 Å		
	I5'							I...HH 3.9 Å	I...HZ2 2.8 Å	I...HA 3.0 Å

5. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com ligante e os iodios de T4

Tabela 5A. Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com T4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T4 – F5Aa	
interação	distância Å
THR506:O ... T4:HT1	2.5
PHE507: CH... π T4 (Ct B)	2.9
THR508:O ... T4:HT2	2.1

Tabela 5B. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a						
		T506	F507	I513	K524	A528	F551	V555
B	I3		I... HD2 3.9 Å		I... O 3.3 Å	I... HN 3.8 Å		
	I5		I... O 3.6 Å				I... HE1 2.7 Å	I... HG22 3.9 Å
A	I3'			I... HG12 3.5 Å	I... HB1 3.0 Å			
(OH)	I5'						I HD1 3.1 Å	

6. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T4

Tabela 6A. Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com T4. Em vermelho as interações π e em preto interações de van der Waals

HSA-T4 – FA5b	
interação	distância Å
PHE502: CH... π T4 (Ct A)	3.6
ALA528: O... T4:O4'	2.6
LEU532: CH... π T4 (Ct A)	2.7
LEU532: N... T4:O4'	2.6

Tabela 6B. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA 1HK2	LIGANTE	FA5b							
	T4-RX	F502	F507	A528	L532	H535	V547	F551	L575
B	I3					I... HD2 3.4 Å	I... HG11 3.9 Å		
	I5	I... HZ 3.6 Å						I... HE2 2.7 Å	I... HG 3.5 Å
A (OH)	I3'			I... HB1 2.9 Å	I... HG 3.2 Å		I... HG13 3.4 Å	I... HB2 3.8 Å	
	I5'	I... HD1 3.0 Å	I... HZ 3.2 Å		I... HA 3.1 Å	I... HB1 3.5 Å			

7. Análise de Interação do Cleft da proteína nativa 1HK4 com o ligante e os iodios de T4

Tabela 7A. Interações do Cleft da proteína 1HK4 com ligante T4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T4 – CLEFT	
interação	distância Å
LYS190:HZ1...T4 :OXT	2.7
ALA191: CH... π T4 (Ct A)	2.8
LYS436:HD22...T4:N	2.9
LYS436:OD1...T4:H8	2.3
LYS436:OD1...T4:H9	2.7
TYE452: CH... π T4 (Ct A)	3.1

Tabela 7B. Análise de Interação do Cleft da proteína 1HK4 com os iodios do hormônio T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em vermelho os resíduos carregados negativamente

PROTEÍNA	LIGANTE	CLEFT								
		D187	Q188	A191	K195	D429	V433	K436	D451	Y452
B	I3	I...O 3.8 Å		I...N 3.7 Å						
	I5					I...O 3.2 Å	I...HN 3.7 Å			
A (OH)	I3'				I...HZ1 3.0 Å				I...O 3.7 Å	I...N 3.9 Å
	I5'		I...N 3.7 Å					I...HZ2 2.4 Å		

8. Análise de Interação do Cleft da proteína 1HK5 (R218H) com o ligante e os iodios de T4

Tabela 8A. Interações do Cleft da proteína 1HK5 (R218H) com o ligante T4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T4 – CLEFT	
interação	distância Å
A191: CH... π T4 (Ct A)	2.7
ASN429:OD1...T4:H8	2.1
TYE452: CH... π T4 (Ct A)	3.4

Tabela 8B. Análise de Interação do Cleft da proteína 1HK5 (R218H) com os iodios do hormônio T4. Em azul são os resíduos carregados positivamente e em vermelho os resíduos carregados negativamente

PROTEÍNA	LIGANTE	CLEFT								
		D187	Q188	A191	K195	D429	V433	K436	D451	Y452
1HK5	T4-RX									
	I3	I...O 3.9 Å		I...N 3.7 Å						
B	I5					I...O 3.5 Å	I...HN 3.7 Å			
	I3'				I...HZ1 3.1 Å				I...O 3.6 Å	
A (OH)	I5'	I...O 4.0 Å	I...N 3.8 Å					I...HZ2 3.4 Å		

9. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com o ligante e os iodios de T3

Tabela 9A. Interações do sítio Sudlow I da proteína 1HK1 com ligante T3. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T3 – Sudlow I	
interação	distância Å
LYS199:HZ1...T4 :O4'	1.9
ARG222:H21...T4 :N1	2.4
LEU238: CH... π T4 (Ct A)	3.1
ARG257:HE...T4:O2	2.1
ARG257:HH21...T4:O2	2.1
ALA291: CH... π T4 (Ct A)	3.1

Tabela 9B. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK1 com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I							
		Y150	K199	R222	L238	H242	R257	I290	A291
B	I3		I... HE1 2.9 Å		I...HD21 2.5 Å	I...HD2 3.9 Å			
	I5			I... HG1 2.6 Å				I...HB 3.5 Å	I... HA 3.5 Å
A (OH)	I3'	I... HE2 2.6 Å					I...H21 2.8 Å		I... HB3 2.7 Å

10. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3

Tabela 10A. Interações do sítio Sudlow I da proteína 1HK2 (R218H) com ligante T3. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T3 – Sudlow I	
interação	distância Å
TYR150:OH...T4 :H11	2.4
ARG222:HH12...T4 :O4	2.1
ARG222:HH22...T4 :O3	2.0
CH... π – HIS218 CTt: H72	2.6
LEU238: CH... π T4 (Ct A)	2.7
ARG257:HE...T4:O2	1.9
ARG257:HH21...T4:O2	2.3
ALA291: CH... π T4 (Ct A)	3.4

Tabela 10B. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I								
		Y150	H218	R222	K199	L238	H242	R257	I290	A291
B	I3				I...HE1 3.4 Å	I...HG 2.5 Å	I...HD2 3.8 Å			
	I5			I...HG2 3.3 Å					I...O 3.6 Å	I...HA 3.4 Å
A (OH)	I3'					I...HD11 3.7 Å		I...HE 3.3 Å	I...HB 3.8 Å	

13. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3

Tabela 13A. Interações do sítio FA5a da proteína 1HK2 (R218H) com ligante T3. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T3 – FA5a	
interação	distância Å
PHE507: CH... π T4 (Ct B)	3.1
LYS524:HZ3 ... T4:N1	2.3
LYS524:HZ3 ... T4:O4	2.0

Tabela 13B. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a					
		F507	I513	K524	A528	F551	V555
B	I3	I... HD2 3.7 Å		I...HB2 3.5 Å	I... HB3 2.7 Å		
	I5	I... HB2 3.1 Å	I... HD11 2.9 Å			I... HE1 2.5 Å	I... HG22 3.6 Å
A (OH)	I3'					I... HB2 3.3 Å	

14. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3

Tabela 14A. Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com T3. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π e em preto interações de van der Waals

HSA-T3 – FA5b	
interação	distância Å
PHE502: CH... π T4 (Ct B)	2.8
ALA528: H9... T4:O	2.0
LEU532: N... T4: N1	3.2
LEU575: CH... π T4 (Ct B)	2.9

Tabela 14B. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b					
		F502	A528	L532	H535	F551	L575
1HK2	T3						
	I3				I... HD2 3.8 Å		
B	I5	I... HZ 3.4 Å				I... HE2 3.0 Å	I... HG 3.0 Å
	I3'						
A (OH)							

15. Análise de Interação do Cleft da proteína nativa 1HK4 com o ligante e os iodios de T3

Tabela 15A. Interação do Cleft da proteína 1HK4 com T3. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T4 – CLEFT	
interação	distância Å
ALA191: CH... π T4 (Ct A)	3.0
LYS436:HZ2...T4:I3	2.9
TYE452: CH... π T4 (Ct A)	2.7

Tabela 15B. Análise de Interação do Cleft com a proteína da 1HK4 com os iodios de T3. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	CLEFT						
		D187	Q188	A191	K195	K436	D451	Y452
1HK2	T3							
B	I3	I...HB1 3.6 Å	I...HN 3.6 Å	I...HB1 3.5 Å				
	I5							
A (OH)	I3'				I...HZ1 3.0 Å		I...HB2 3.4 Å	I...HA 3.3 Å

18. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-4

Tabela 18A. Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com T3-4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T3-4– Suddlow I	
interação	distância Å
ARG222:HH12...T4: O4	2.0
ARG222:HH22...T4: O3	2.1
CH... π – HIS218 CTt: H72	3.1
LEU238: CH... π T4 (Ct A)	3.4
ARG257: HE...T4:O2	1.5
ARG257: HH21...T4:O2	2.4

Tabela 18B. Análise de Interação do Sítio Sudlow I da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEINA	LIGANTE	Sudlow I						
		Y150	H218	R222	L238	R257	I290	A291
1HK2	T3-4							
B	I3			I ... HG2 2.3 Å				
A	I3'	I ... HE2 2.3 Å				I ... HE 2.4 Å		I ... HB3 2.7 Å
(OH)	I5'						I ... HB 3.0 Å	

19. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-2

Tabela 19A. Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com T3-2. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T3-2– Suddlow II	
interação	distância Å
LEU394: CH... π T4 (Ct B)	3.2
TYR411:OH...T4:H9	1.7
SER489:HG...T4:N1	2.3

Tabela 19B. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2

PROTEÍNA	LIGANTE	Sudlow II						
		L387	Q390	N391	L394	L407	Y411	S489
B	I3	I...HA 2.4 Å	I...HB1 2.4 Å	I...HN 3.2 Å				
	I5			I...HB1 3.9 Å	I...HD22 2.8 Å	I...HD2 2.7 Å		
A (OH)	I5'				I...HD12 2.7 Å			

20. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-3

Tabela 20A. Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com T3-3. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T3-3– Suddlow II	
interação	distância Å
LEU387:CH $\cdots\pi$ T4 (Ct B)	2.9
TYR411:OH \cdots T4:H10	1.9
SER489:HG \cdots T4:N1	2.3
SER489:OG \cdots T4:H9	2.1

Tabela 20B. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-3

PROTEÍNA	LIGANTE	Sudlow II				
		L387	Q390	N391	Y411	S489
1HK2	T3-3					
B	I5	I \cdots HG 3.7 Å	I \cdots HB2 2.7 Å	I \cdots HB2 2.7 Å		
A	I3'	I \cdots HD 3.4 Å				I \cdots HB2 2.5 Å
(OH)	I5'					

21. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-4

Tabela 21A. Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com T3-4. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T3-4– Suddlow II	
interação	distância Å
LEU387: CH... π T4 (Ct B)	3.1
ASN391:HD21...T4:O4	1.7
TYR411:OH...T4:H9	2.1

Tabela 21B. Análise de Interação do Sítio Sudlow II da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	Sudlow II				
		L387	Q390	N391	Y411	S489
1HK2	T3-4					
B	I3	I...HG 2.8 Å	I...HB1 2.9 Å			
A	I3'	I...HD 3.7 Å				I...HB2 2.5 Å
(OH)	I5'			I...HB2 2.7 Å		

22. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-2

Tabela 22A. Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com T3-2. Em verde as ligações de hidrogênio e em vermelho as interações π

HSA-T3-2 – F5Aa	
interação	distância Å
PHE507: CH... π T4 (Ct B)	2.8
LYS524:HZ3 ... T4:N1	2.1
LYS524:HZ3 ... T4:O4	2.0

Tabela 22B. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a					
		F507	I513	K524	A528	F551	V555
1HK2 B	I3	I... HD2 3.4 Å		I...HB2 3.9 Å	I... HB3 2.8 Å		
	I5	I... HB2 3.4 Å	I... HD11 2.8 Å			I... HE1 2.6 Å	I... HG22 3.4 Å
A (OH)	I5'						

23. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-3

Tabela 23A. Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com T3-3. Em cinza as interações de vdw e em vermelho as interações π

HSA-T3-3 – FA5a	
interação	distância Å
THR506:O ... T4:O3	3.1
VAL555: CH... π T4 (Ct A)	2.8

Tabela 23B. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-3

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a				
		T506	I513	A528	F551	V555
1HK2	T3-3					
B	I5			I... HB1 3.5 Å	I... HD1 3.1 Å	
A	I3'		I... O 3.5 Å			
(OH)	I5'					

24. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-4

Tabela 24A. Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com T3-4. Em cinza as interações de vdw e em vermelho as interações π

HSA-T3-4 – FA5a	
interação	distância Å
THR506:O ... T4:O3	3.2
VAL555: CH... π T4 (Ct A)	2.6

Tabela 24B. Análise de Interação do Sítio FA5a da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5a				
		T506	I513	A528	F551	V555
1HK2	T3-4					
B	I3			I... HB1 3.9 Å	I... HB2 2.8 Å	
A	I3'		I... O 3.5 Å			I... HG12 2.8 Å
(OH)	I5'					

25. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-2

Tabela 25A. Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com T3-2. Em cinza as interações de vdw, as ligações de hidrogênio em verde e as interações π em vermelho

HSA-T3-2 – FA5b	
interação	distância Å
PHE502: CH... π T4 (Ct A)	2.9
ALA528: H9... T4:O	2.0
LEU532: N... T4: N1	3.2
LEU575: CH... π T4 (Ct B)	2.9

Tabela 25B. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-2. Em azul são os resíduos carregados positivamente

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b					
		F502	A528	L532	H535	F551	L575
1HK2	T3-2						
	I3				I... HD2 3.7 Å		
B	I5	I... HZ 3.5 Å				I... HE2 3.0 Å	I... HG 3.3 Å
	I5'						
A (OH)							

26. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-3

Tabela 26A. Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com T3-3. Em vermelho as interações π

HSA-T3-3 – FA5b	
interação	distância Å
PHE502: CH... π T4 (Ct B)	3.4
LEU575: CH... π T4 (Ct B)	2.9

Tabela 26B. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-3

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b					
		F502	F507	A528	L532	F551	L575
1HK2	T3-3						
B	I5		I... HE2 3.1 Å	I... O 3.7 Å	I... HG 3.3 Å	I... HD2 3.9 Å	
A	I3'	I... HZ 3.5 Å					I... O 3.3 Å
(OH)	I5'						

27. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com o ligante e os iodios de T3-4

Tabela 27A. Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com T3-4. Em vermelho as interações π

HSA-T3-4 – F5b	
interação	distância Å
PHE502: CH... π T4 (Ct B)	3.4
LEU532: CH... π T4 (Ct B)	3.3

Tabela 27B. Análise de Interação do Sítio FA5b da 1HK2 (R218H) com os iodios de T3-4

PROTEÍNA	LIGANTE	FA5b					
		F502	F507	A528	L532	F551	L575
1HK2	T3-4						
B	I3		I... HE2 3.2 Å	I... O 3.6 Å	I... HG 3.1 Å	I... HD2 3.9 Å	
A	I3'						
(OH)	I5'	I... HZ 3.3 Å					I... HD11 2.5 Å