

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**ESTUDO DA BETA-LACTOGLOBULINA COMO VEÍCULO PARA O
TAMOXIFENO**

Arthur de Siqueira Brahm

Pelotas, 2015

ARTHUR DE SIQUEIRA BRAHM

Estudo da beta-lactoglobulina como veículo para o tamoxifeno

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto

Orientador de Estágio: Prof Dr. Jon Waltho

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B794e Brahm, Arthur de Siqueira

Estudo da beta-lactoglobulina como veículo para o tamoxifeno / Arthur de Siqueira Brahm ; Luciano da Silva Pinto, orientador ; Jonathan Waltho, coorientador. — Pelotas, 2015.

45 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Proteínas. 2. Lipocalinas. 3. Fármacos. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Waltho, Jonathan, coorient. III. Título.

CDD : 572.6

Arthur de Siqueira Brahm

Estudo da beta-lactoglobulina como veículo para o tamoxifeno

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30/11/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto, doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (2008).

Profa. Dra. Lucielli Savegnago, doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (2007).

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos, doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (2011).

Agradecimentos

À minha família, primeiramente, por me proporcionarem uma vida e terem se dedicado para que ela seja desprovida de necessidade e rica em oportunidades e crescimento. Sou eternamente grato a todas coisas que vocês fizeram por mim.

Ao curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, por esses últimos 5 anos que formam uma parte inesquecível e importante da minha vida, hoje e para sempre. Aos professores que se esforçaram e foram além do necessário para estimular e ensinar seus alunos, tanto na sala de aula quanto no laboratório. Seus esforços não passarão despercebidos. Em especial, aos professores que me orientaram em estágio ao longo da faculdade pela dedicação e por todo crescimento que não existiria sem vocês.

Aos colegas que fizeram parte desses anos, que se fizeram presentes desde os momentos de tensão e esforço até os de comemoração e descanso. Sem dúvida a faculdade não seria o mesmo se não fosse pela presença de vocês.

Aos amigos que vieram antes da faculdade e permaneceram companheiros através deste período de grande mudança e novidades, mantendo-se constantes fontes de amizade e de confiança.

A todos que me receberam e me acolheram na Universidade de Manchester e possibilitaram que eu fizesse um trabalho em uma área nova em um ambiente novo e que em menos de três meses me proporcionaram uma experiência de valor imprescindível.

“Eu não vim fazer um discurso”.

Gabriel García Márquez

Resumo

BRAHM, Arthur de Siqueira. **Estudo da beta-lactoglobulina como veículo para fármacos**. 2015. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A beta-lactoglobulina é uma proteína presente no leite de diversas espécies que naturalmente transporta íons e moléculas menores em sua estrutura. O objetivo deste trabalho foi estudar através de espectrometria de ressonância magnética nuclear o potencial da beta-lactoglobulina como um veículo de fármacos. Para se avaliar esse potencial foram utilizadas a beta-lactoglobulina, o tamoxifeno, uma importante droga anticâncer e altamente hidrofóbicas, e a proteína calmodulina como competidora da beta-lactoglobulina pelo tamoxifeno. As duas proteínas foram expressas de forma recombinante em *Escherichia coli* utilizando um meio enriquecido com nitrogênio ^{15}N e foram purificadas através de cromatografias de afinidade, troca aniônica e exclusão molecular, com um rendimento de 4-8 mg por litro e 5-10 mg por litro para a beta-lactoglobulina e para a calmodulina respectivamente. Os experimentos de ressonância magnética nuclear foram realizados utilizando-se técnicas unidimensionais e bidimensionais visando confirmar a interação dos compostos testados com a beta-lactoglobulina. Foi verificada através de técnicas bidimensionais de espectrometria a capacidade de ligar o tamoxifeno às proteínas na presença de um veículo orgânico, o DMSO, e que ele por si não altera a estrutura das proteínas. Foi realizado o experimento em ambiente aquoso para demonstrar que a beta-lactoglobulina era capaz de solubilizar o tamoxifeno sem a presença de um veículo orgânico, demonstrado pela ligação do tamoxifeno à calmodulina. Neste experimento foi detectado tamoxifeno ligado tanto a beta-lactoglobulina quanto à calmodulina em quantidades significantes, indicando que a beta-lactoglobulina conseguiu agir como veículo e solubilizar o tamoxifeno. A quantidade de tamoxifeno ligado à beta-lactoglobulina indica que a proteína talvez esteja ligando a droga com força demais para um veículo, a ponto de afetar a sua ligação a outras moléculas. Mais pesquisas são necessárias, mas demonstramos um resultado promissor.

Palavras-chaves: proteínas, lipocalinas, fármacos.

Abstract

BRAHM, Arthur de Siqueira. **Study of beta-lactoglobulin as a vehicle for drugs.** 2015. 45f. Course Completion Work – Undergraduate course in Biotechnology. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Beta-lactoglobulin is a protein presente in milk of several species that naturally transport ions and smaller molecules in its structures. The objective of this work was to study through nuclear magnetic resonance spectrometry the potential of beta-lactoglobulin as a drug vehicle. To evaluate this potential were utilized beta-lactoglobulin, tamoxifeno, na importante anticâncer and highly hydrophobic, and the protein calmodulina as a competitor for tamoxifeno binding with beta-lactoglobulin. The two proteins were expressed in a recombinant manner in *Eschericia coli* utilizing a nitrogen enriched médium, and were purified through afiinity, anion-exchange and size exclusion chromatography. The yield were 4-8 mg per liter for beta-lactoglobulin and 5-10 mg per liter for calmodulin. The nuclear magnetic ressonance experiments were done through unidimensional and bidimensional techniques, trying to confirm the interaction of the tested compounds with beta-lactoglobulin. It was verified through this espectrometry the capacity of tamoxifeno to bind to the proteins in the presence of an organic vehicle and that the vehicle by itself did not alter the strutcture of the proteins. The experiment done in an aqueous environment confirmed the presence of tamoxifen bound to calmodulin in the presence of beta-lactoglobulin and absence of an organic vehicle, confirming the action of the protein as a vehicle. The amount of tamoxifen bound to beta-lactoglobulin indicates that the protein might be binding to beta-lactoglobulin too strongly, to the point that it is affecting its binding to other molecules. More research is necessary, but we demonstrate a promising result.

Key-words: proteins, lipocalins, drugs,

Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura tridimensional da beta-lactoglobulina	17
Figura 2 O dímero da beta-lactoglobulina	18
Figura 3 Sinais emitidos e processados pela espectrometria.....	23
Figura 4 SDS-PAGE da primeira cromatografia da calmodulina	30
Figura 5 SDS-PAGE da segunda cromatografia da calmodulina	31
Figura 6 SDS-PAGE da primeira cromatografia da beta-lactoglobulina	31
Figura 7 SDS-PAGE da segunda cromatografia da beta-lactoglobulina	32
Figura 8 Espectro da calmodulina	34
Figura 9 Espectro da calmodulina e da calmodulina ativada.....	34
Figura 10 Espectro da calmodulina ativada com tamoxifeno na presença DMSO e da calmodulina	34
Figura 11 Espectro da calmodulina ativada na presença do DMSO.....	34
Figura 12 Espectro da beta-lactoglobulina	34
Figura 13 Espectro da beta-lactoglobulina complexada com tamoxifeno com DMSO e da beta-lactoglobulina	34
Figura 14 Espectro da beta-lactoglobulina e da beta-lactoglobulina na presença do DMSO	34
Figura 15 Espectro da calmodulina ativada, beta-lactoglobulina e tamoxifeno e da calmodulina ativada complexada com tamoxifeno.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1 Lista de experimentos.....	29
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

RMN – Ressonância magnética nuclear

DMSO – Dimetilsulfóxido

PG – Propileno glicol

β -LG – Beta-lactoglobulina

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

CaM – Calmodulina

kDa – Kilodalton

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

TROSY - *Transverse relaxation optimized spectroscopy*

μ L – Microlitro

μ g – Micrograma

L – Litro

g – Grama

RPM – Rotações por minuto

IPTG - Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

mM – Milimolar

mL – Mililitro

mg – Miligrama

MHz – Megahertz

SUMÁRIO

1 Introdução Geral	13
2 Objetivos	14
2.1 Objetivos específicos.....	14
2.1.1 Expressão e purificação.....	14
2.1.2 Espectrometria por RMN.....	14
3 Revisão Bibliográfica	15
3.1 Veículos para fármacos.....	15
3.2 Beta-lactoglobulina.....	16
3.3 Calmodulina.....	20
3.4 Tamoxifeno.....	21
3.5 Ressonância Magnética Nuclear.....	22
4 Materiais e métodos	25
4.1 Clonagem dos genes.....	25
4.2 Expressão e purificação.....	25
4.2.1 Calmodulina.....	26
4.2.2 Beta-lactoglobulina.....	27
4.3 Espectrometria por RMN.....	28
5 Resultados	30
5.1 Expressão e purificação das proteínas.....	30
5.2 Espectrometria por RMN.....	32
6 Discussão	35
7 Conclusão	39
8 Referências Bibliográficas	40

1 Introdução Geral

Muitos fármacos são hidrofóbicos e não são capazes de serem dissolvidas em água, o que dificulta sua pesquisa e desenvolvimento. Para resolver este problema são utilizados veículos, compostos orgânicos liofílicos, que ajudam os fármacos a se dissolverem. No entanto, esses veículos não representam o ambiente químico e biológico encontrados em um organismo e quando administrados *in vivo* apresentam efeitos pleiotrópicos.

Para garantir que fármacos sejam desenvolvidas em ambientes mais próximos dos seres vivos e que elas possam ser administradas de forma dirigida e controlada, procuram-se veículos que são capazes de dissolver fármacos em ambientes aquosos. As proteínas surgem como uma alternativa natural e segura para estes veículos orgânicos. Muitas delas já apresentam ligantes naturais e sua toxicidade e efeitos biológicos já foram amplamente estudados. Uma destas proteínas é a beta-lactoglobulina, uma das principais proteínas do leite bovino e que naturalmente já carrega consigo moléculas menores ao serem consumidas.

O potencial ligante da beta-lactoglobulina já é conhecido e neste estudo foi proposto analisar este potencial com o objetivo de demonstrar sua capacidade de agir como um veículo de fármacos. Para isto foi utilizado o tamoxifeno, uma importante droga anticâncer hidrofóbica que age como um antagonista para os receptores do estrogênio, e a calmodulina, uma proteína com capacidade de ligar compostos hidrofóbicos, para demonstrar que a beta-lactoglobulina é capaz de se ligar a moléculas hidrofóbicas e solubilizá-las sem prendê-las irreversivelmente. Através de análises de espectrometria por ressonância magnética nuclear foram estudadas a cinética e interação dos fármacos com as proteínas estudadas.

2 Objetivos

Estudar a beta-lactoglobulina como veículo de entrega de fármacos hidrofóbicos através da utilização de espectrometria de ressonância magnética nuclear, utilizando o tamoxifeno como modelo.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Expressão e purificação

A expressão da calmodulina e da beta-lactoglobulina de forma recombinante em *Escherichia coli* utilizando meio de crescimento enriquecido com nitrogênio ^{15}N , e sua purificação utilizando cromatografias de afinidade, troca-aniônica e exclusão molecular.

2.1.2 Espectrometria por RMN.

As proteínas foram utilizadas para experimentos de espectrometria por ressonância magnética nuclear, onde foi estudada a cinética da ligação do tamoxifeno individualmente com cada uma das proteínas e em um ambiente com a calmodulina e a beta-lactoglobulina sem veículos orgânicos. Esse estudo foi feito através de técnicas unidimensionais e bidimensionais de ressonância magnética nuclear.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Veículos para fármacos

Um fármaco é uma substância química usada para o tratamento, cura, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou usada para melhorar o bem-estar físico e mental (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2010). Muitos fármacos são hidrofóbicos, tendo dificuldade em se dissolver em água, necessitando de um veículo, uma substância sem ação terapêutica que ajuda a droga a se solubilizar em água (KELAVA et al., 2010). Um veículo deve ser não tóxico, não imunogênico, biocompatível, biodegradável e capaz de consistentemente dissolver a droga sem afetar suas qualidades terapêuticas (SCOTT et al., 2008).

O uso de veículos é essencial para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Os mais utilizados atualmente são solventes orgânicos lipofílicos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), o propileno glicol (PG) e o etanol. Apesar da sua popularidade eles apresentam certos problemas. Em experimentos *in vitro* eles não representam com fidelidade a composição química de um organismo biológico. Já *in vivo* eles possuem efeitos pleiotrópicos como neuroprotetor e imunossupressor (DMSO), anticonvulsivo e nefrotóxico (PG), hipotensivo e vasoconstritor (etanol), entre outros, podendo afetar experimentos e gerar resultados pouco confiáveis (KELAVA et al, 2011).

Também é interessante procurar veículos que possam ser usados em sistemas de liberação controlada de fármacos, como os sistemas que utilizam nanoestruturas para guiar e reger a liberação de fármacos em um organismo ((MUKHIDINOV et al., 2012). Os métodos tradicionais de administração de fármacos não permitem uma distribuição controlada e dirigida do composto ativo. Isto gera um problema porque uma dose maior da droga é exigida para o efeito terapêutico e depende-se da circulação, que distribui a droga indiscriminadamente pelo organismo. O principal motivo para criar sistemas de liberação controlada de fármacos é manter uma concentração constante da droga dentro da sua janela

terapêutica, minimizando efeitos adversos, e dirigir o composto ativo ao tecido desejado (LANGER, 1998).

Em busca de veículos que cumpram esses papéis diversas alternativas de origem biológica são investigadas, como toxóides bacterianos, exossomos, aptâmeros e outros (JOHNSEN et al., 2014; DE HAAN e HIRST, 2002; KRUSPE et al., 2014). Entre estes outros veículos em potencial, se destacam as proteínas, que oferecem biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, alta afinidade por fármacos, estruturas tridimensionais com sítios de ligação variados e abundantes fontes. Proteínas que já foram investigadas e demonstraram potencial para esta função incluem o colágeno, a gelatina, a caseína e a beta-lactoglobulina (β -LG) (ELZOGHBY et al., 2012).

3.2 Beta-lactoglobulina

Proteínas provenientes do leite agem naturalmente como veículos e para moléculas menores, uma característica desenvolvida para garantir a entrega de micro e macronutrientes. Essas proteínas são capazes de cumprir esse papel devido à sua capacidade de ligar moléculas altamente hidrofóbicas (LIVNEY et al., 2009). A β -LG corresponde a 50% das proteínas do soro do leite e 12% das proteínas totais do leite bovino (HALPIN e RICHARDSON, 1985). Ela pertence à família das lipocalinas, proteínas que apresentam diversas funções, a maioria das quais envolve ligação de moléculas menores (FLOWER et al., 2000).

A β -LG é uma globulina pequena e solúvel. Cada um dos seus monômeros consiste em 162 resíduos de aminoácidos e ela possui um peso molecular de 18,3 kDa. Os resíduos constituem 8 fitas- β antiparalelas, uma α -hélice na superfície exterior da proteína e uma nona fita- β flanqueando a primeira (Figura 1). Essa última fita constitui uma importante porção da proteína porque permite a dimerização da proteína. As 8 fitas- β antiparalelas formam o cálice, a estrutura principal da beta-lactoglobulina e seu principal sítio de ligação hidrofóbico. O revestimento altamente hidrofóbico do cálice acomoda moléculas lineares, que ligam suas porções

hidrofóbicas a esse revestimento e expõem suas partes hidrofílicas ao solvente (KONTOPIDIS, 2004).

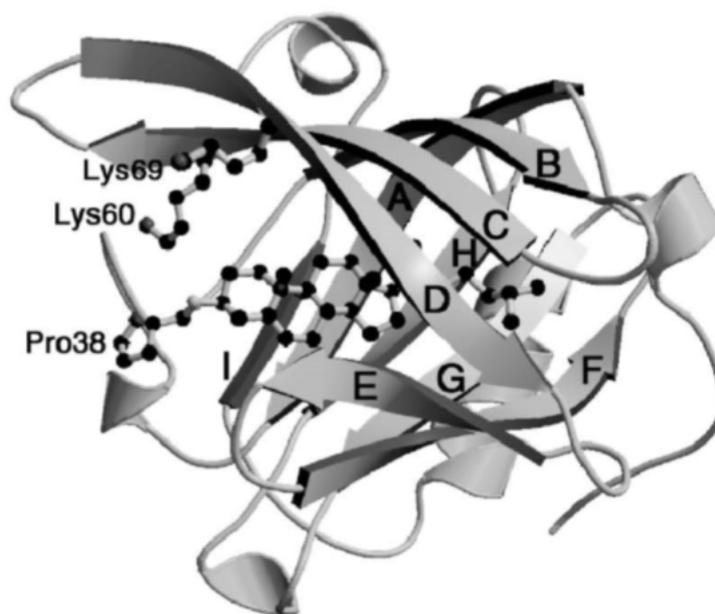


Figura 1: Estrutura tridimensional da β -LG complexada com colesterol no seu cálice, com indicações de A-H para as fitas- β . O colesterol e as cadeias laterais dos aminoácidos Pro38, Lys69 e Lys60 estão representadas no modelo de bolas e varetas. Imagem de KONTOPIDIS et al., 2004.

A estrutura da β -LG é considerada um barril- β , uma grande folha beta que se contorce para formar uma estrutura fechada na qual a primeira fita está ligada à última por uma volta, uma estrutura em que a cadeia peptídica inverte sua orientação (WIMLEY, 2003). A fita- β A se curva de tal forma que sua porção C-terminal fica em posição antiparalela em relação à fita- β H e forma uma interação antiparalela entre elas (KONTOPIDIS, 2004).

A volta entre as fitas E-F funciona como um portão de acesso ao cálice. Em condições de baixo pH, ela se encontra em seu estado fechado e ligantes não conseguem acessar o sítio de ligação, mas em condições de pH alto ela está aberta e o sítio fica exposto. A fita I em conjunto com a volta A-B forma a interface de dímero (Figura 2), a porção da proteína que permite a ligação de dois monômeros (HAVEA et al., 2001; KONTOPIDIS, 2004).

A fita I estabelece uma interação antiparalela com a fita I de um outro monômero, formando as pontes de hidrogênio que unem o dímero. A fita I está

disponível para formar essa interação pois possui uma volta altamente flexível com α -hélice no exterior da proteína, embora não existe interação direta entre as α -hélice de diferentes monômeros (BROWNLOW et al., 1997). A outra interação, proveniente da volta A-B, é proveniente do pareamento de íons dos aminoácidos Asp33 de um monômero e Arg40 do outro. Experimentos de mutagênese dirigida que inviabilizam estas interações resultam em β -LG estritamente monomérica (SAKURAI e GOTO, 2005).

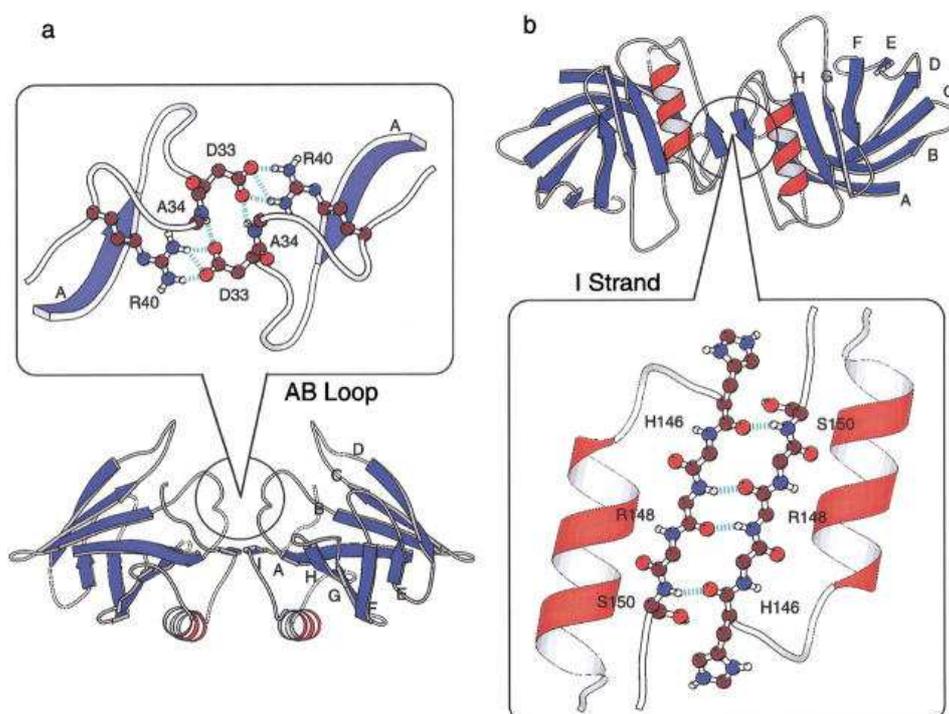


Figura 2: O dímero da β -LG e sua interface de dímero, estimada a partir de coordenadas de cristalografia de raio-X. Visão lateral (a) e visão superior (b) tendo a fita I como ponto de referência. Estão destacadas e ampliadas as ligações entre as fitas A-B (a) e duas fitas I (b), onde as pontes de hidrogênio estão visíveis. Imagem de SAKURAI e GOTO, 2001.

As propriedades ligantes da β -LG são estudadas desde que o seu primeiro ligante, o SDS, foi identificado (MCMEEKIN et al., 1949). Outros ligantes foram estudados desde então assim como o mecanismo de ligação. Os experimentos inicialmente focaram inicialmente no cálice, mas estudos de ressonância magnética nuclear identificaram um segundo sítio de ligação mais fraco que o principal no cálice da proteína (KONTOPIDIS et al., 2004). As evidências indicam que este segundo sítio hidrofóbico é uma fenda próxima da alfa-hélice no exterior da proteína

(SHPIELGMAN, 2014). Além desta fenda, a β -LG possui sulcos hidrofóbicos no exterior que servem para estabilizar a sua estrutura e que mais tarde foram identificados como sítios secundários de ligação. Estes sulcos são menos específicos que o cálice, mas ainda assim capazes de ligar moléculas. O ligante mais comum da proteína é a lactose, que não se liga ao cálice (DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ et al., 2013). Estes sítios secundários já foram implicados na ligação de ligantes específicos, como o flurbiprofeno (BARBIROLI et al., 2010), e fazem com que a β -LG seja capaz de ligar compostos de interesse farmacêutico com variadas estruturas químicas, como compostos fluorados, pirimidinas e biguanidas (EBERINI et al., 2008; MERHABAN et al., 2013; SAHIHI e GHAYEB, 2014).

Não são percebidos ligantes naturais no sítio quando se purifica a proteína nativa, mas esse fato é explicado porque a concentração natural de ácidos graxos ligados ao cálice é baixa demais para ser detectada em experimentos de densidade eletrônica (PEREZ et al., 1989). Apesar disso, um grande número de ligantes hidrofóbicos de ocorrência natural já foram determinados. É conhecida a afinidade especial dela por ácidos graxos como o ácido palmítico, ácido linoléico e o ácido bromododecanóico (SAWYER e KONTOPIDIS, 2000; JIANG e LIU et al., 2010). Outro aspecto natural da β -LG ainda não muito pesquisado é a proteína em sua forma de dímero, considerada por muitos pesquisadores como a forma biologicamente relevante da proteína (YANG et al., 2008).

A β -LG demonstra potencial tanto como um veículo *in vitro*, facilitando a dissolução de compostos hidrofóbicos em água, como veículo *in vivo*, como uma molécula que pode ser utilizada para facilitar a administração controlada e dirigida de fármacos. Experimentos que incorporaram a β -LG para encapsulação e entrega de fármacos demonstraram que a proteína é altamente estável e capaz de carregar compostos hidrofóbicos eficientemente em condições experimentais (GUNASEKARAM et al., 2007). Microcápsulas de pectina associada a β -LG demonstraram a capacidade de formar uma matriz polimérica em torno de micropartículas de óleo e encapsular efetivamente fármacos. Isto resulta em uma

emulsão estável que sob condições experimentais se demonstrou capaz de transportar rifampicina, um importante antibiótico (MUKHIDINOV et al., 2012).

Uma das qualidades que fazem da β -LG um veículo *in vivo* em potencial é a sua estabilidade frente ambientes ácidos. Sob pH 2 ela se desassocia de forma reversível, porém a sua estrutura nativa se mantém intacta. A estrutura nativa da proteína também é consideravelmente resistente à degradação pela pepsina, uma importante enzima proteolítica do estômago. Por causa destas características é possível detectar β -LG em sua estrutura nativa em ambientes com pH ácido, como o intestino delgado (ASTWOOD et al., 1996). O fato da β -LG ser resistente à degradação enzimática, ser uma proteína abundante em uma matéria-prima barata, termostável e facilmente purificada, tornam ela um substrato biológico de obtenção fácil e prática (MCAPLINE e SAWYER, 1990).

3.3 Calmodulina

A calmodulina (CaM) é uma proteína conservada, expressada em todas células eucarióticas, que liga Ca^{2+} e age como mensageira em numerosas vias de sinalização dependentes de cálcio (COHEN e KLEE, 1988). A CaM possui aproximadamente 148 aminoácidos e tem peso molecular de 16,7 kDa. Ela possui quatro domínios com estruturas de hélice-volta-hélice, cada uma carregando no seu centro uma sequência de 12 aminoácidos onde se liga um íon Ca^{2+} . A proteína possui dois domínios globulares simétricos separados por uma ligação flexível, cada um contendo dois domínios hélice-volta-hélice (CHOU et al., 2001).

Ela funciona como um segundo mensageiro que regula a atividade de várias cascatas sinalizadoras através de proteínas como quinases, canais de íons, bombas de íons, óxido-nítrico sintase, adenilato ciclase e fosfodiesterase. A CaM- Ca^{2+} , a proteína complexada com cálcio (sua forma ativa da proteína), regula estas cascatas através de interações que desativam as porções destas proteínas responsáveis pela auto-inibição (CHIN e MEANS, 2000).

Experimentos de espectrometria por ressonância magnética nuclear com a CaM-Ca²⁺ determinaram que a ligação flexível entre os dois domínios globulares é essencial para a plasticidade da proteína. Esta ligação permite que a molécula seja capaz de assumir diferentes conformações dependendo da função que ela precisa cumprir. Quando o cálcio se liga na proteína ela passa por uma drástica mudança conformacional que expõe sítios hidrofóbicos ricos em metionina (VILLARROEL et al., 2014). Na apo-CaM as duas hélices da estrutura hélice-volta-hélice estão em uma posição antiparalela, enquanto na CaM-Ca²⁺ as hélices estão em um ângulo quase perpendicular e mais distantes entre si. Essas mudanças conformacionais são essenciais para a atividade mensageira da CaM. A ligação do cálcio também altera o resto da estrutura da proteína, expondo cadeias laterais negativas e grupos carbonil que formam uma estrutura que facilita a ligação do cálcio (BABU et al, 1985; ZHANG et al., 1995).

3.4 Tamoxifeno

O câncer de mama é o surgimento e proliferação de células tumorais no tecido mamário. Mundialmente, é o câncer invasivo mais comum em mulheres, representando 25.2% da ocorrência de câncer total no sexo feminino e sendo responsável por 522 mil mortes em 2012 (STEWART e WILD, 2014). Dos diversos tratamentos disponíveis, um é o tratamento hormonal, cuja principal droga é o tamoxifeno (BURSTEIN et al., 2014). Ele é uma droga amplamente usada que está presente na Lista de Medicamento Essenciais da OMS (WHO, 2013).

O tamoxifeno é um antagonista do receptor de estrogênio, podendo ser utilizado para o tratamento do câncer de mama positivo para o receptor de estrogênio (BIG 1-98 COLLABORATIVE GROUP et al., 2009). Ele é uma pró-droga, possuindo pouca afinidade pelo receptor de estrogênio na sua forma inicial, necessitando ser metabolizado. Ele é transformado pelo citocromo P450 no fígado e torna-se os seus metabólitos ativos, o 4-hidroxitamoxifeno e o N-desmetil-4-

hidroxitamoxifeno, que possuem uma afinidade até 100 vezes maior pelo receptor (DESTA et al., 2004).

O 4-hidroxitamoxifeno se liga aos receptores de estrogênio nas células tumorais e produz um complexo nuclear que diminui a síntese de DNA nas células e inibe o efeito de fatores de crescimento. É um potente agente não-esteroidal que faz com que as células se mantenham nas fases G0 e G1 do ciclo celular (SHANG et al., 2000; WANG et al., 2004).

Apesar do seu potencial terapêutico e amplo uso, o tamoxifeno possui problemas de solubilidade, sendo praticamente insolúvel em água. A 20°C a solubilidade do tamoxifeno em água é menor que 0.01% (Sigma-Aldrich, 2015). Para contornar este problema utiliza-se o citrato de tamoxifeno em formulações terapêuticas, mas isto também tem suas falhas pois para alcançar o efeito terapêutico é necessária uma dose da droga que causa efeitos adversos (SHETE et al., 2014).

3.5 Ressonância magnética nuclear

Os núcleos dos átomos são compostos de nêutrons e prótons. Estas moléculas subatômicas possuem uma propriedade quântica intrínseca denominada spin, uma forma de momento angular, uma espécie de movimento em torno do próprio eixo. Se o número de prótons e nêutrons no núcleo de um átomo são iguais, não há um spin nuclear para este átomo, sendo declarado o spin zero (DEMTRÖDER, 2002). Quando há um número de prótons ou neutros desemparelhados no núcleo é superior a zero, há um spin nuclear neste átomo. Quando estes núcleos que possuem um spin são colocados em um campo magnético, os elétrons orbitando em torno do núcleo geram um campo magnético contrário ao campo aplicado sobre o átomo, o que irá resultar em uma diferença no campo magnético efetivo agindo sobre o átomo. Este efeito denomina-se *chemical shift*. A análise do *chemical shift* forma a base da técnica de espectrometria por ressonância magnética nuclear (RMN). A espectroscopia consiste em medir o

chemical shift, aplicando um campo magnético em uma amostra, estimulando os núcleos da amostra com uma onda de rádio e captando o sinal que eles enviam de volta à medida que retornam ao seu estado desestimulado. Este sinal que é recebido de volta será determinado pelo *chemical shift*, assim podendo-se estudar as estruturas químicas e suas interações através do espectro gerado. A partir deste que os núcleos estimulados produzem enquanto relaxam é possível deduzir a identidade do isótopo, com quais outros átomos ele está interagindo e como eles estão interagindo. No entanto, o sinal é fraco em relação ao barulho (sinais de outros átomos além dos de interesse) que a amostra produz, então são necessárias várias estimulações (ou escaneamentos) para se obter uma proporção de sinal/barulho onde é possível interpretar os resultados. O sinal é então decomposto com uma transformação de Fourier, uma operação matemática que desconstrói o sinal nas frequências que o compõe (Figura 3). A partir dessa frequência é construído um espectro que demonstra o *chemical shift* detectado, uma representação visual das interações atômicas da amostra (HORNAK, 2011).

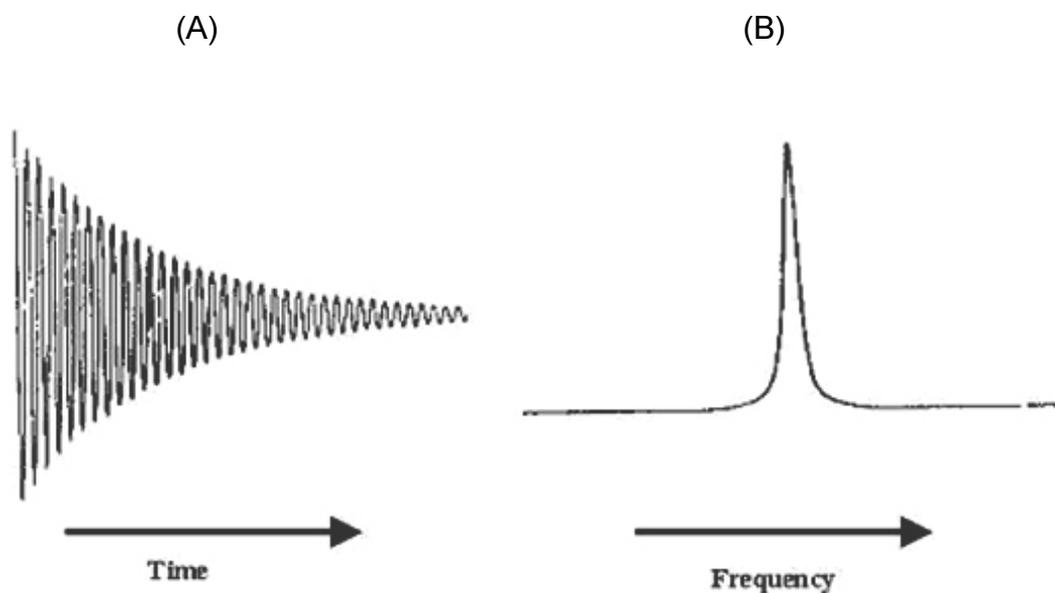


Figura 3: (A) o sinal emitido por um átomo excitado à medida que ele retorna ao seu estado desestimulado, descrito em função do tempo. (B) o sinal processado pela transformação de Fourier, descrito em função de frequência. Imagem de ALBERT, 2006.

Apesar de ser utilizado inicialmente para compostos orgânicos simples, a RMN é utilizada para a pesquisa de biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas

desde a década de 60. Em 1982 a primeira proteína com sua estrutura resolvida por RMN foi anunciada, a inibidora de protease IIA, uma globulina presente no plasma bovino (WÜTRICH, 2001).

O desenvolvimento da RMN bidimensional, que estimula dois tipos de átomos invés de um, possibilitou o estudo de estruturas de proteínas em larga escala. Técnicas como a *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC), na qual um próton (^1H) é estimulado e transfere sua magnetização para um átomo secundário, como ^{13}C ou ^{15}N , que então devolve a magnetização ao próton, de onde o sinal será captado, e a *Transverse relaxation optimized spectroscopy* (TROSY), que utiliza sinais ignorados em experimentos de HSQC e garante maior sensibilidade e resolução para moléculas maiores, permitem o estudo de estruturas tridimensionais de proteínas de forma confiável (BODENHAUSEN e RUBEN, 1980; PERVUSHIN et al., 1997). O uso de RMN é uma ferramenta importante para estudar o potencial de proteínas como veículos, permitindo a análise da interação da proteína com a droga em um nível molecular, tendo sido utilizado para o estudo da albumina, caseína, lectinas, entre outras (ELZOGHBY et al, 2012; KRATZ, 2014).

4 Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofísica do Instituto de Biotecnologia de Manchester na Universidade de Manchester, sob supervisão do Prof. Dr. Jon Waltho.

4.1 Clonagem dos genes

O gene da CaM e da β -LG em sua forma dímero foram inseridos em plasmídeos pET-21a e pET-11b respectivamente. Esses plasmídeos foram denominados pET-21a/cam e pET-11b/blg. A inserção foi realizada utilizando os sítios de ligação *NdeI/BamHI* pela GenScript (Piscataway, EUA). As sequências utilizadas nessas construções são provenientes do GenBank, código M27319.1 para a CaM e código X14712.1 para a β -LG.

Os plasmídeos foram transformados em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star e expressados de acordo com técnica adaptada de WHITEHEAD (1997) e PONNIAH et al. (2010). Começou-se com 100 μ l de uma suspensão de células competentes em concentração de estoque foi descongelada na bancada. Foi adicionado 1 μ l de solução contendo 0,2 μ g de plasmídeo nesse tubo, que foi posteriormente colocado no gelo por vinte minutos. Após vinte minutos o tubo foi colocado por 1 minuto no banho maria a 42 °C, e no fim desse minuto de volta no gelo por 2 minutos. Após, foi adicionado 900 μ l de meio SOC (20 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 4,8 g/L MgSO₄, 3,6 g/L dextrose, 0,5g/L NaCl, 0,2 g/L KCl) no tubo. O conteúdo foi transferido para um erlenmeyer e colocado em um shaker a 37 °C durante uma hora. Ao término dessa hora 100 μ l da suspensão foi plaqueada em uma placa com meio LB sólido (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura, 15 g/L ágar, pH 7), contendo 100 μ g/mL de ampicilina como agente seletivo. As placas foram colocadas em uma estufa a 37 °C por 12 horas.

4.2 Expressão e purificação

A expressão em larga escala das proteínas foi feita em meio M9 enriquecido com sulfeto de amônio ^{15}N (6 g/L Na_2HPO_4 , 3 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L NaCl , 1 mg de tiamina, 3 g de glicose, 1 mL de 1M MgSO_4 , 0,1 mL de 1M CaCl_2 , 1 g de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.4). Este meio foi utilizado pois a RMN exige que as proteínas possuam obrigatoriamente nitrogênio ^{15}N nos seus aminoácidos. As pré-culturas foram preparadas com colônias isoladas das placas de LB e colocadas em um erlenmeyer com 20 mL de meio M9, em um shaker a 37 °C, 180 RPM por 12 horas. As culturas foram preparadas utilizando 10 mL das pré culturas adicionadas a 990 mL de meio M9.

4.2.1 Calmodulina

As culturas de células expressando CaM foram postas em um shaker a 30 °C, 180 RPM até alcançarem a $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0.05, então a expressão foi induzida com 1 mM de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), a temperatura alterada para 37 °C, e colocada no shaker por 12 horas. No outro dia as culturas foram centrifugadas a 5000 RPM, 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com água destilada, centrifugado novamente sob as mesmas condições e o sobrenadante descartado. Este pellet foi ressuspenso em Tris 50 mM com 1mM EDTA pH 7.5 e usado instantaneamente ou congelado a -80 °C.

A CaM foi purificada utilizando duas colunas: uma coluna de afinidade de fenil-sefarose e uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-25, ambas da GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido).

A amostra com células foi sonicada com cinco pulsos de um minuto em amplitude máxima, com trinta segundos de intervalo entre eles. A amostra foi centrifugada a 20000 RPM, 4 °C por 20 minutos e o pellet foi descartado. A coluna de fenil-sefarose foi equilibrada com cinco volumes de coluna de tampão 1 (20 mM imidazol, 20 Mm NaCl , 1 mM EDTA, pH 7.0). A amostra foi passada pela coluna que

então foi limpa com 100 mL de tampão 1 e com tampão 2 (50 mM tris, 1 mM CaCl_2 , 500 mM NaCl, pH 7.5) até nada mais ser detectado saindo da coluna por espectrofotometria. A coluna foi então eluída com cinco volumes de coluna de tampão 3 (50 mM tris, 1 mM EDTA, pH 7.5). O pico desta eluição foi dialisado em água miliQ por 12 horas e passado na coluna de exclusão molecular.

A coluna de exclusão molecular foi equilibrada com dois volumes de coluna de água miliQ. 5 mL de uma solução de NaCl saturada foi injetada na coluna e após correr um volume de coluna, a amostra foi injetada. Após deixar novamente correr um volume de coluna, mais 5 mL da solução de 5 M NaCl foram injetados, desta vez como eluente. O pico observado foi coletado e novamente dialisado em água miliQ por 12 horas para remover o sal, resultando em uma amostra final da CaM suspensa em água. A proteína foi identificada após as cromatografias por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE). Foi utilizado um gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie Brilhante R-250.

4.2.2 Beta-lactoglobulina

As culturas de células expressando β -LG foram postas em um shaker a 37 °C, 180 RPM até alcançar a $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0.5-0.7, então a expressão foi induzida com 0.5 mM de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), a temperatura alterada para 25 °C e colocada no shaker por 12 horas. No outro dia as culturas foram centrifugadas a 5000 RPM, 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com água destilada, centrifugado novamente sob as mesmas condições e o sobrenadante descartado. Este pellet foi ressuspenso em Bis-Tris 20 mM pH 6.5 e usado instantaneamente ou congelado a -80 °C.

A β -LG foi purificada utilizando duas colunas: uma coluna de troca aniônica Source Q e uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-25, ambas da GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido).

A amostra com células foi sonicada com cinco pulsos de um minuto em amplitude máxima, com trinta segundos de intervalo entre eles. A amostra foi

centrifugada a 20000 RPM, 4 °C por 20 minutos e o pellet foi descartado. A coluna de troca aniônica foi equilibrada com cinco volumes de coluna de Bis-Tris 20 mM pH 6,5. A amostra foi passada pela coluna e após a coluna foi limpa com Bis-Tris 20 mM pH 6,5 até nada mais ser detectado saindo da coluna por espectrofotometria. A eluição foi feita com um gradiente de cinco tampões diferentes, Bis-Tris 20 mM pH 6,5 com 0,05 M; 0,1 M; 0,2 M; 0,25 M e 1 M de NaCl. Os tampões foram adicionados em ordem crescente e utilizados aproximadamente cinco volumes de coluna para cada tampão. O pico desta purificação foi dialisado em água miliQ e passado pela coluna de exclusão molecular.

A coluna de exclusão molecular foi equilibrada com dois volumes de coluna de água miliQ. 5 mL de uma solução de 5 M NaCl foi injetada na coluna e após correr um volume de coluna, a amostra foi injetada. Após deixar novamente correr um volume de coluna, mais 5 mL da solução de NaCl foram injetados, desta vez como eluente. O pico observado foi coletado e novamente dialisado em água miliQ para remover o sal, resultando em uma amostra final da β -LG suspensa em água. A proteína foi caracterizada após ambas cromatografias por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE). Foi utilizado um gel de concentração de 12% corado com Comassie Brilhante R-250.

4.3 Espectrometria por RMN

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro Brüker (Massachusetts, EUA) de frequência 800 MHz. Os experimentos foram realizados de acordo com as condições experimentais de WHITEHEAD (1997). As amostras foram preparadas em um tubo eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado a elas clorofórmio deuterado, em temperatura ambiente e depois foram transferidas para o tubo de RMN. No espectrômetro, os experimentos foram realizados a 300 K. Em geral foram adquiridos quatro escaneamentos, porém algumas vezes foi necessário usar números maiores para atingir a resolução desejada (Tabela 1).

Tabela 1: Experimentos de RMN e as condições experimentais de cada um. Foram feitos experimentos unidimensionais (1D) e bidimensionais (HSQC e TROSY). Cada experimento foi gravado com quatro escaneamentos (quatro sinais captados pelo espectrômetro após estimular os núcleos na amostra) exceto quando notado na tabela.

Experimento	Condições	Objetivo
001	1D – CaM 0.5 mM	Adquirir um espectro da calmodulina recombinante
002	HSQC – CaM 0.5 Mm	
003	1D – CaM 0.5 mM + CaCl 3Mm	Comprovar a integridade e o dobramento correto da calmodulina ativada
004	HSQC – CaM 0.5 mM + CaCl 3mM	
005	1D - CaM 0.25 mM + CaCl 1.5 mM + 0.25 mM tamoxifeno + 1% DMSO	Demonstrar a capacidade da calmodulina ativada de se ligar ao tamoxifeno
006	HSQC - CaM 0.25 mM + CaCl 1.5 mM + tamoxifeno 0.25 mM + 1% DMSO [32 escaneamentos]	
007	1D - CaM 0.25 mM + CaCl 1.5 mM + 1% DMSO	Demonstrar que o DMSO não interfere na estrutura da calmodulina (controle dos experimentos 005 e 006)
008	HSQC - CaM 0.25 mM + CaCl 1.5 mM + 1% DMSO	
009	1D - β -LG 0.2 mM	Adquirir um espectro da beta-lactoglobulina recombinante
010	HSQC - β -LG 0.2 mM [8 escaneamentos]	
011	1D - β -LG 0.1 mM + tamoxifeno 0.4 mM + 1.6% DMSO	Comprovar a capacidade da beta-lactoglobulina de ligar tamoxifeno
012	TROSY - β -LG 0.1 mM + tamoxifeno 0.4 mM + 1.6% DMSO [32 escaneamentos]	
013	1D - β -LG 0.1 mM + 1.6% DMSO	Demonstrar que o DMSO não interfere na estrutura da beta-lactoglobulina (controle dos experimentos 011 e 012)
014	TROSY - β -LG 0.1 mM + 1.6% DMSO	
015	1D – CaM 0.28 mM + tamoxifeno 0.28 mM + β -LG 0.1 mM	Demonstrar a capacidade da beta-lactoglobulina de solubilizar o tamoxifeno sem ligar ele irreversivelmente
016	HSQC – CaM 0.28 mM + tamoxifeno 0.28 mM + β -LG 0.1 mM [32 escaneamentos]	

5 Resultados

5.1 Expressão e purificação das proteínas

Após ambas as cromatografias da CaM uma banda apareceu na altura correspondente ao seu peso molecular, 16,7 kDa (Figura 4 e 5). Após a primeira cromatografia da CaM foi detectada uma outra banda mais fraca logo acima da banda correspondente à CaM, que após a cromatografia de exclusão molecular não foi mais vista. No caso da beta-lactoglobulina apareceram duas bandas de altura ligeiramente diferente em torno da altura do peso molecular da β -LG, 18,3 kDa (Figura 6 e 7) após ambas as cromatografias. Essas bandas também estão presentes na amostra total após ser passada pela primeira cromatografia na coluna de troca aniônica, indicando que uma quantidade visível de β -LG não está se aderindo à coluna.

As proteínas purificadas foram dialisadas em água MiliQ e após foram concentradas utilizando tubos concentradores Vivaspin 500 MWCO 3000 GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). As purificações obtiveram um rendimento final de 4-8 mg/L para a β -LG e 5-10 mg/L para a CaM, determinado por espectrofotometria.

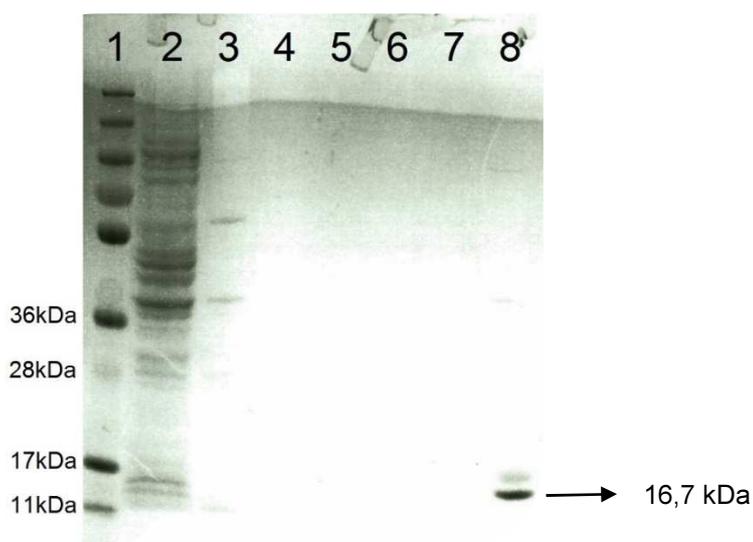


Figura 4: Análise por SDS-PAGE da expressão da proteína recombinante CaM purificada em coluna de afinidade fenil-sefarose. (1) - Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, da Crystalgen (Commack, EUA). (2) - Pellet da cultura expressando CaM sonicada. (3) -

Amostra total após ser passado pela coluna. (4 e 5) – Lavagem da coluna com tampão 1. (6) – Lavagem da coluna com tampão 2. (7) – Eluição com tampão 3. (8) – Pico da eluição, contendo uma banda na altura do peso molecular da calmodulina e outra banda mais fraca logo acima.

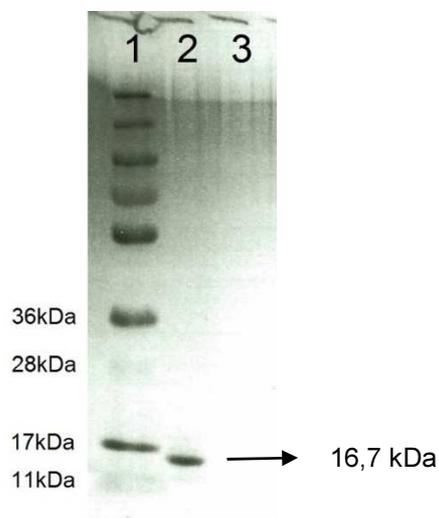


Figura 5: SDS-PAGE da cromatografia da CaM purificada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-25. (1) - Marcador de peso molecular. (2) – Pico da eluição com a solução de 5M NaCl contendo a calmodulina purificada. (3) – Continuação da eluição com a solução de 5 M NaCl.

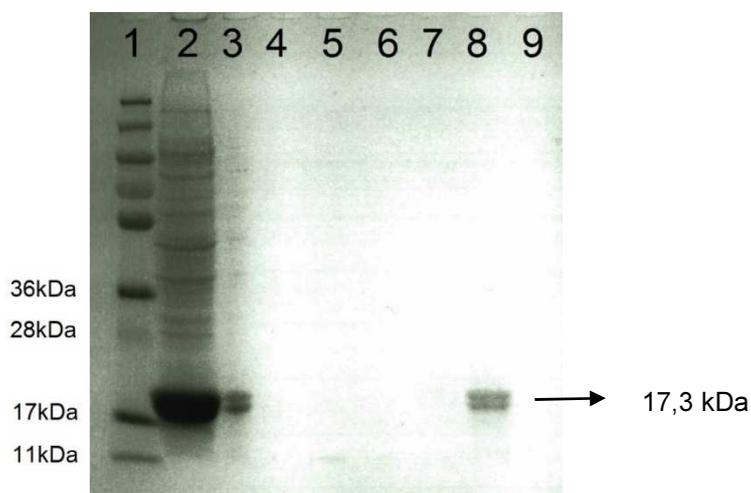


Figura 6: Análise por SDS-PAGE da expressão da proteína recombinante β -LG purificada pela coluna de troca aniônica SourceQ. (1) - Marcador de peso molecular. (2) – Pellet da cultura expressando a β -LG sonicada. (3) – Amostra total após ser passado pela coluna. (4) – Eluição com tampão com 0.05 M NaCl. (5) – Eluição com tampão com 0.1 M NaCl. (6) – Eluição com tampão com 0.2 M NaCl. (7) – Eluição com tampão com 0.25 M NaCl. (8) – Pico da eluição, detectado entre a última e penúltima eluição, contendo a beta-lactoglobulina. (9) Eluição com tampão com 1 M NaCl.

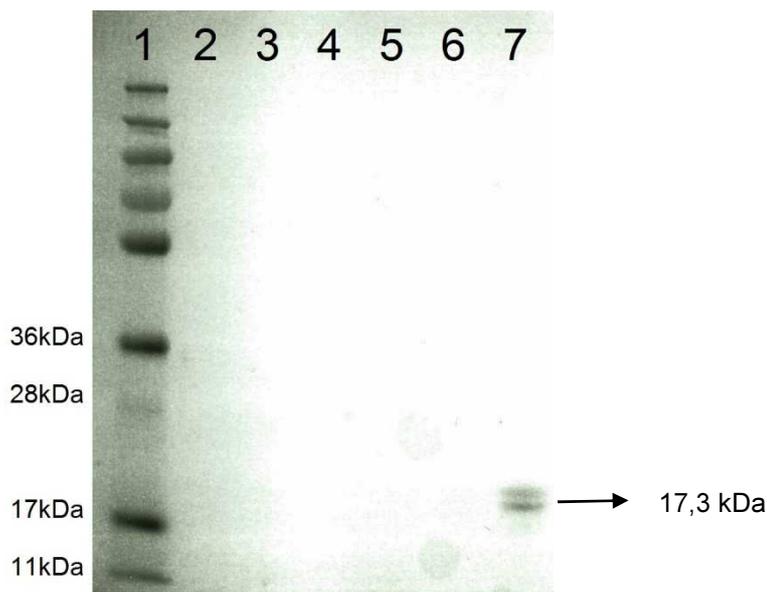


Figura 7: SDS-PAGE da cromatografia da β -LG pela coluna de exclusão molecular Sephadex G-25. (1) - Marcador de peso molecular. (2-6) - Picos pequenos detectados no gradiente crescente de eluição da coluna de troca aniônica. (7) – Pico grande detectado entre as duas últimas etapas da eluição da coluna de troca aniônica, contendo a beta-lactoglobulina.

5.2 Espectrometria por RMN

Os experimentos de RMN comprovaram a integridade e o dobramento correto da CaM-Ca^{2+} , a sua capacidade e a da β -LG de ligar o tamoxifeno, e a capacidade da β -LG de solubilizar o tamoxifeno e possibilitar que ele se ligue á CaM-Ca^{2+} na ausência do DMSO como veículo. Os espectros foram processados utilizando o software Topspin da Brüker.

O espectro da CaM (Figura 8) indica que a proteína está íntegra e propriamente dobrada. No próximo espectro (Figura 9) está a comparação do espectro da CaM com o da CaM-Ca^{2+} , indicando significativa diferença entre a proteína em sua forma ativada com cálcio e sua forma apo-proteica.

O espectro da CaM-Ca^{2+} complexada com tamoxifeno na presença do DMSO é diferente que o da CaM por si (Figura 10), mas similar ao espectro da CaM-Ca^{2+} indicando a ligação do tamoxifeno na calmodulina ativada. Como controle para esse experimento foi realizada uma espectrometria da CaM-Ca^{2+} apenas com o DMSO

(Figura 11), que, embora não possua uma boa resolução, está mais próximo do espectro da CaM-Ca²⁺ sem tamoxifeno do que com tamoxifeno, indicando que as diferenças vistas no espectro prévio são por causa da ligação do tamoxifeno e não do veículo em que ele foi dissolvido.

O espectro da β -LG (Figura 12) também não possui uma resolução ideal, mas é suficiente para dizer que a proteína está íntegra e bem-dobrada, própria para os experimentos. Assim como foi feito com a calmodulina, foi verificada a ligação do tamoxifeno à β -LG na presença do DMSO (Figura 13) onde foram detectados um alto grau de similaridades entre o espectro da proteína e o da proteína ligada ao tamoxifeno. Essa similaridade no espectro indicaria que o tamoxifeno está se ligando à β -LG e assim o seu sinal está similar ao dela e não produzindo muitos picos distintos. Assim como antes, foi feito um experimento controle (Figura 14) onde se vê que o DMSO não causa mudanças significantes na estrutura da proteína.

O espectro do experimento principal (Figura 15) mostra o resultado do experimento envolvendo a β -LG, a CaM-Ca²⁺ e o tamoxifeno, sem a presença do DMSO, representado pelo espectro azul. Esse espectro demonstra picos similares ao da β -LG ligada ao tamoxifeno assim como da CaM-Ca²⁺ ligada ao tamoxifeno, indicando que a droga está se ligando a ambas proteínas em um ambiente aquoso sem um veículo orgânico.

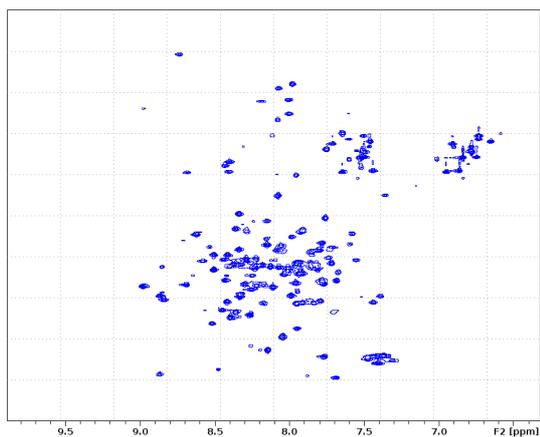


Figura 8: Espectro bidimensional da CaM.

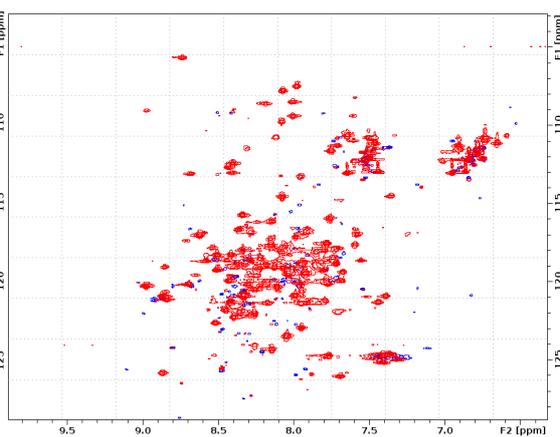


Figura 9: Espectro CaM (vermelho) + CaM-Ca²⁺ (azul).

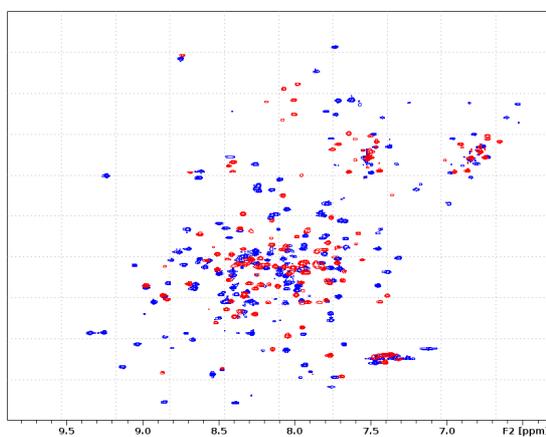


Figura 10: Espectro da CaM-Ca²⁺ com tamoxifeno na presença de DMSO (azul) + CaM (vermelho).

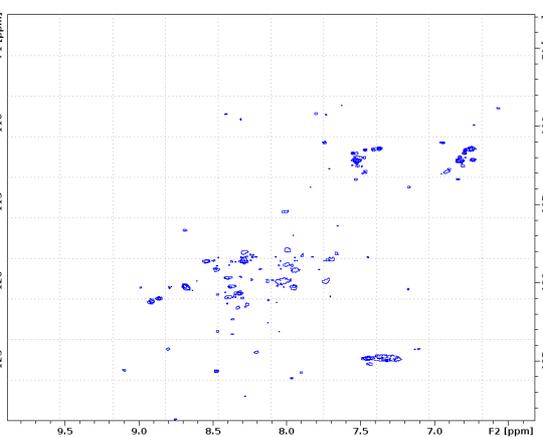


Figura 11: Espectro da CaM-Ca²⁺ na presença do DMSO.

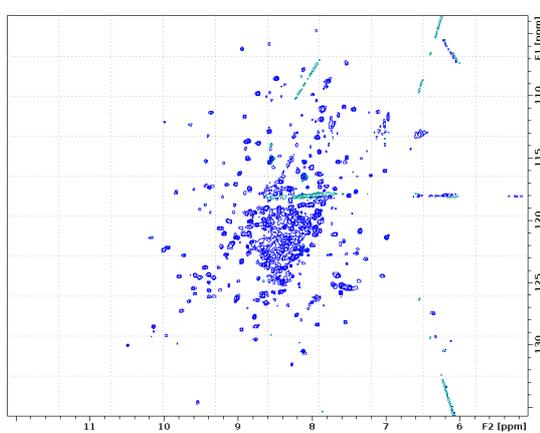


Figura 12: Espectro β -LG.

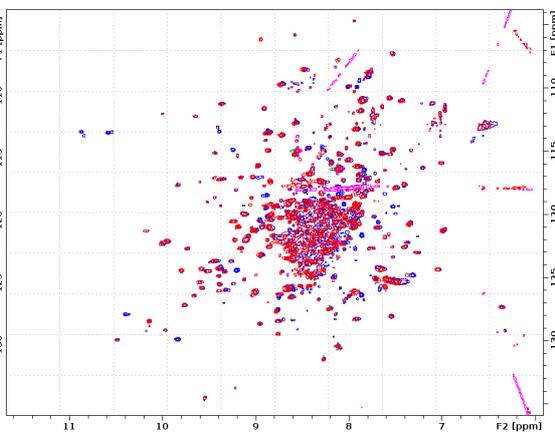


Figura 13: β -LG complexada com tamoxifeno na presença de DMSO (azul) + β -LG (vermelho).

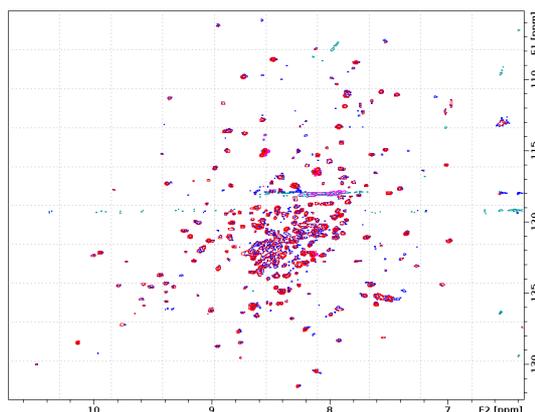


Figura 14: Espectro da β -LG (vermelho) + β -LG na presença de DMSO (azul).

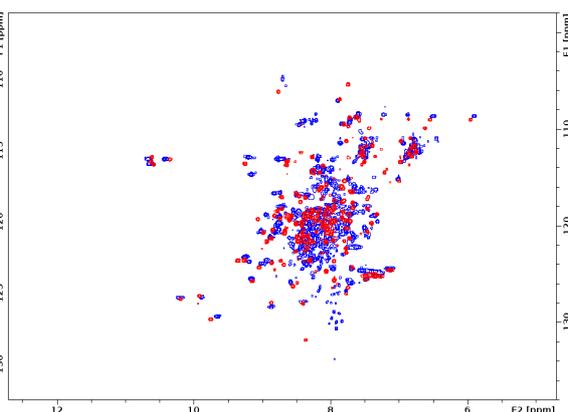


Figura 15: Espectro da CaM-Ca²⁺, β -LG e tamoxifeno (azul) comparado com CaM-Ca²⁺ complexada com tamoxifeno na presença de DMSO (vermelho).

6 Discussão

Veículos são essenciais para o desenvolvimento de fármacos e suas aplicações. Eles precisam ser capazes de solubilizar compostos hidrofóbicos sem afetar sua atividade e sem terem um efeito em si, e também podem ser utilizados para sistemas de liberação controlada de fármacos (SCOTT et al., 2008). Considerando as limitações dos que são atualmente utilizados, a descoberta de novos veículos é de grande importância para a pesquisa farmacêutica (KELAVA et al., 2010).

A β -LG, sendo uma proteína própria para o consumo humano, sem atividade terapêutica em si e com afinidade por compostos hidrofóbicos, surge como uma molécula em potencial para cumprir este papel. O primeiro passo para avaliar seu potencial como veículo é investigar sua capacidade de ligar fármacos e soltar essa molécula quando necessário (KONTOPIDIS, 2004). No presente estudo a capacidade da β -LG como veículo foi testado com um experimento de RMN no qual o tamoxifeno foi utilizado como ligante e a CaM como a biomolécula que compete com o veículo pelo ligante. Ambas as proteínas foram produzidas por expressão recombinante em *E. coli*, sendo a β -LG expressa.

Embora as proteínas tenham sido expressadas, certas partes do processo ainda precisam ser aprimoradas. Em especial, a sonicação da amostra pode ser realizada com uma amplitude menor e por menos tempo, sendo necessários experimentos para determinar os padrões ideais do processo. A amostra após a sonicação utilizada neste estudo estava quente, mesmo estando em um frasco refrigerado durante o processo. Vendo que a CaM precisa estar corretamente dobrada para se ligar na coluna de afinidade de fenil-sefarose (WHITEHEAD, 1997), o calor produzido pela sonicação poderia ter degradado uma porção da proteína e impossibilitado que ela se ligasse à coluna durante a cromatografia.

Apesar dos níveis menores que os esperados de rendimento, a expressão da CaM ocorreu como descrito na literatura por WHITEHEAD (1997). A expressão da β -LG no entanto, mostrou algo inesperado. Esperava-se apenas uma banda no SDS-PAGE da proteína purificada, no entanto se visualiza no gel duas bandas com peso molecular ligeiramente diferente, mesmo após a cromatografia por exclusão molecular. A presença das bandas após ambas purificações e a similaridade em intensidade entre elas exclui a possibilidade de contaminação por uma outra proteína. Embora a β -LG seja expressa de forma recombinante em bactérias desde 1990 (BATT et al., 1990), esse sistema nunca se mostrou o ideal para a produção da proteína. O ambiente redutor do citosol da maioria das cepas de *E. coli* previne a formação de ligações dissulfeto, importantes para a estruturação tridimensional da proteína. Mais importante, a *E. coli* também adiciona resíduos excessivos na porção C-terminal da proteína (PONNIAH et al., 2010), o que explicaria a diferença de peso molecular entre os monômeros da proteína.

O potencial da β -LG como veículo foi comprovado neste estudo através dos experimentos com RMN. Primeiro foi verificada a integridade e o dobramento das proteínas recombinantes. Embora a resolução do espectro da CaM não seja ideal, nele e no espectro da CaM (Figura 8 e 12), vemos picos bem definidos e com espaço entre eles. Considerando que cada pico neste espectro simboliza o pareamento de um ^1H e um ^{15}N nos aminoácidos da proteína, o espaçamento e

definição desses picos indica que a proteína está com sua estrutura tridimensional propriamente dobrada.

O espectro da CaM-Ca²⁺ também não demonstrou a resolução ideal (Figura 9), mas é possível detectar uma mudança nos picos em relação à apo-CaM, o que é esperado considerando o efeito significativo que o cálcio causa na estrutura da proteína. Também foi detectada uma mudança notável na CaM-Ca²⁺ ligada ao tamoxifeno em relação à apo-CaM, indicando uma alteração drástica na estrutura da proteína (Figura 10). Visto que a Figura 11 sugere que o DMSO não causa uma mudança significativa na estrutura da CaM, as mudanças vistas na Figura 10 devem ter sido causadas pelo tamoxifeno, servindo como evidencia que ele é se liga nos sítios hidrofóbicos da CaM-Ca²⁺.

Na Figura 12 observamos um espectro da β -LG em água. Na Figura 13 vemos a β -LG interagindo com o tamoxifeno na presença do DMSO. O DMSO foi usado pois o intuito deste experimento era apenas visualizar a ligação do tamoxifeno na proteína e não verificar o potencial dela em ajudar na solubilização dele. Esta figura indica que mesmo havendo muitas similaridades entre a β -LG com e sem o tamoxifeno, é possível visualizar vários picos azuis um pouco deslocados dos vermelhos e alguns em lugares inéditos. Esse fato sugere pouca alteração na estrutura da proteína, porém ainda assim alteração, o que corrobora com a hipótese de que o tamoxifeno se liga no cálice da proteína, não causando uma grande mudança conformacional, mas mesmo assim ligado. O controle deste experimento (Figura 14) mostra que o DMSO altera a estrutura da proteína, mas de uma forma não muito significativa e que não compromete o resultado do experimento anterior. Os picos azuis não alinhados neste experimento são menores e mais próximos dos vermelhos.

O experimento central deste estudo está representado na Figura 15, onde está representado como o espectro azul. Este espectro difere dos outros espectros contendo a β -LG e, como o espectro vermelho com que ele é comparado demonstra, ele se aproxima dos espectros da CaM-Ca²⁺ ligada ao tamoxifeno. Esta aparência indica que neste experimento há tamoxifeno ligado à β -LG, mas também ligado à

CaM-Ca²⁺, tudo ocorrendo na ausência de DMSO ou outro veículo orgânico. Picos completamente ausentes em outros experimentos envolvendo a β -LG e o tamoxifeno aparecem aqui. No entanto, a diferença entre os espectros indica que embora haja tamoxifeno se ligando a CaM-Ca²⁺, ainda uma quantidade significativa está presa na β -LG, sugerindo que embora ela foi capaz de solubilizar o tamoxifeno e permitir que ele se ligue na CaM-Ca²⁺, elas estão competindo pelo ligante.

O experimento foi bem-sucedido, porém ainda é prematuro. O próximo passo seria uma espectrometria tridimensional no que também se analisaria o ¹³C, o que forneceria informação sobre quais picos estão relacionados a quais aminoácidos. Desta forma é possível investigar quais aminoácidos estão interagindo com o ligante de forma individual (CHEMWIKI, 2015). Com essas informações é possível começar o desenvolvimento de uma β -LG com aminoácidos diferentes em seus sítios de ligação, modelando a proteína de acordo com as necessidades do ligante.

7 Conclusão

Os experimentos aqui feitos indicam que a capacidade da beta-lactoglobulina de ligar compostos menores, já utilizado na natureza, também pode ser aplicado como uma solução biotecnológica para um problema da pesquisa farmacêutica. Embora os resultados sejam iniciais, a beta-lactoglobulina recombinante foi capaz de solubilizar o tamoxifeno em um ambiente aquoso e permitir que ele se ligasse á calmodulina, cumprindo o papel de um veículo.

8 Referências Bibliográficas

2D NMR Introduction. **ChemWiki**. Disponível em <http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_e_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/NMR%3A_Experimental/2D_NMR/2D_NMR_Introduction>. Acessado em 18/11/2015.

ALBERT, M. S. About HP Gas MRI. **Harvard Hyperpolarized Gas Laboratory**. Disponível em: <<http://www.spl.harvard.edu/archive/HypX/about.html>>. Acessado em 18/11/2015.

ASTWOOD, J.D.; LEACH, J.N.; FUCHS, R.L. Stability of food allergens to digestion in vitro. **Natural Biotechnology**, v. 14, p. 1269-1273, 1996.

BABU, Y.S.; SACK, J.S.; GREENHOUGH, T.J.; BUGG, C.E.; MEANS, A.R.; COOK, W.J. Three-dimensional structure of calmodulin. **Nature**, v. 315, n. 6014, p. 37-40, 1985.

BIG 1-98 COLLABORATIVE GROUP; MOURIDSEN, H.; GIOBBIE-HURDER, A.; GOLDBIRSCHE, A.; THÜRLIMANN, B.; PARIDAENS, R.; SMITH, I.; MAURIAC, L.; FORBES, J.; PRICE, K.N.; REGAN, M.M.; GELBER, R.D.; COATES, A.S. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 8, p. 766-776, 2009.

BARBIROLI, A.; BERINGHELLI, T.; BONOMI, F.; DONGHI, D.; FERRANTI, P.; GALIANO, M.; IAMETTI, S.; MAGGIONI, D.; RASMUSSEN, P.; SCANU, S.; VILARDO, M.C. Bovine β -lactoglobulin acts as an acid-resistant drug carrier by exploiting its diverse binding region. **Biological Chemistry**, v. 391, p. 21-32, 2010.

BATT, C.A.; RABSON, L.D.; WONG, D.W.; KINSELLA, J.E. Expression of recombinant bovine beta-lactoglobulin in Escherichia coli. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 949-55, 1990.

BODENHAUSEN, G.; RUBEN, D.J. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. **Chemical Physics Letters**, v. 69, v. 1, p. 185-189, 1980.

BROWNLOW, S.; CABRAL, J.H.M.; COOPER, R.; FLOWER, D.R.; YEWDALL, S.J.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A.C.T.; SAWYER, L. Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 angstrom resolution – Still an enigmatic lipocalin. **Structure**, v. 5, p. 481-495, 1997.

BURSTEIN, H.J.; TEMIN, S.; ANDERSON, H.; BUCHHOLZ, T.A.; DAVIDSON, N.E.; GELMON, K.E.; GIORDANO, S.H.; HUDIS, C.A.; ROWDEN, D.; SOLKY, A.J.; STEARNS, V.; WINER, E.P.; GRIGGS, J.J. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 21, p. 2255-2269, 2014.

CHIN, D.; MEANS, A.R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, v. 10, p. 322-328, 2000.

CHOU, J.J.; LI, S.; KLEE, C.B.; BAX, A. Solution structure of Ca(2+)-calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 11, p. 990-997, 2001.

COHEN, P.; KLEE, C.B. **Calmodulin**. New York: Elsevier, 1988.

DE HAAN L.; HIRST, T.R. Bacterial toxins as versatile delivery vehicles. **Current Opinions in Drug Discovery and Development**, v. 5, n. 2, p. 269-278, 2002.

DEMTRÖDER, W. **Atoms, Molecules and Photons: An Introduction to Atomic- Molecular- and Quantum Physics (1st ed.)**. New York: Springer, 2002.

DESTA, Z.; WARD, B.A.; SOUKHOVA, N.V.; FLOCKHART, D.A. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v. 310, n. 3, 1062–1075, 2004.

DOMÍNGUEZ-RAMIREZ, L.; DEL MORAL-RAMIREZ, E.; CORTES-HERNANDEZ, P.; GARCIA-HRAIBAY, M.; JIMENEZ-GUZMAN, J. Beta-Lactoglobulin's Conformational Requirements for Ligand Binding at the Calyx and the Dimer Interphase: a Flexible Docking Study. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

EBERINI, I.; ROCCO, A.G.; MANTEGAZZA, M.; GIANAZZA, E.; BARONI, A.; VILARDO, M.C.; DONGHI, D.; GALLIANO, M.; BERINGHELLI, T. Computational and experimental approaches assess the interactions between bovine β -lactoglobulin and synthetic compounds of pharmacological interest. **Journal of Molecular Graphical Modelling**, v. 26, p. 1004–13, 2008.

ELZIGHBY, A.O.; SAMY, W.M.; ELGINDY, N.A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 1, p. 38-49, 2012.

FDA, **Pharmacists Pharma Journal**. Disponível em: <http://www.pharmacistspharmajournal.org/2010/11/definitions-of-drug-radioactive-drug_11.html#.Viw2CTZdHid>. Acessado em 18/11/2015.

FLOWER, D.R. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. **Biochimica et Biophysica Acta -Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1482, p. 327-336, 2000.

GUNASEKARAM, S.; SANGHOON, K.; XIAO, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p. 31-40, 2007.

HALPIN, M.I.; RICHARDSON, T. Selected functionality changes of betalactoglobulin upon esterification of side-chain carboxyl groups. **Journal of Dairy Sciences**, v. 68, p. 3189–3198, 1985.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. Characterization of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 483–497, 2001.

HORNAK, J. **NMR. NMR**. Disponível em <<https://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>>. Acessado em 18/11/2015.

JIANG, H.R.; LIU, N. Self-assembled β -lactoglobulin–conjugated linoleic acid complex for colon cancer-targeted substance. **Journal of Dairy Sciences**, v. 92, p. 3931–39, 2010.

JOHNSEN, K.B.; GUDBERGSSON, J.M.; SKIV, M.N.; PILGAARD, L.; MOOS, T.; DUROUX, M. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles – endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1846, n. 1, p. 75-87, 2014.

KELAVA, T.; CAVAR, I.; CULO, F. Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, n. 10, p. 980-987, 2010.

KELAVA, T.; CAVAR, I.; CULO, F. Biological actions of drug solvents. **Periodicum Biologorum**, v. 113, n. 3, p. 311-320, 2011.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited Review: beta-lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 785-796, 2004.

KRATZ, F. A clinical update of using albumin as a drug vehicle – a commentary. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p.331-336, 2014.

KRUSPE, S.; MITTELBERGER, F.; SZAMEIT, K.; HAHN, U. Aptamers as drug delivery vehicles. **ChemMedChem**, v. 9, n. 9, p. 1998-2011, 2014.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. **Nature**, v. 392, n. 6679, p. 5-10, 1998.

LIVNEY, Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives, **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, p. 78-83, 2010.

MCALPINE, A.S.; SAWYER, L. Beta-lactoglobulin: a protein drug carrier? **Biochemical Society Transcripts**, v. 18, p. 879, 1998.

MCMEEKIN, T. L.; POLIS, B.D.; DELLA-MONICA, E.S.; CUSTER, J.H. A crystallization complex of β -lactoglobulin with dodecyl sulphate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 3606–3609, 1949.

MUKHIDINOV, K.; KASYMOYA, G.F.; USMANOVA, S.R.; MURZAGULOVA, K.B.; KIM, M.E.; YANOVICH, A.V. Production Of Rifampicin-Containing Microcapsules Based On Apple Pectin Complexes With B-Lactoglobulin. **Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal**, v. 46, p. 46–49, 2012.

PEREZ, M.D.; DIAZ DE VILLEGAS, C.; SANCHEZ, L.; ARANDO, P.; ENA, J.M.; CALVO, M. Interaction of fatty acids with β -lactoglobulin and albumin from ruminant milk. **Journal of Biochemistry**, v. 106, p. 1094–1097, 1989.

PEVUSHIN, K.; RIEK, R.; WIDER, G.; WÜTHRICH, K. Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole–dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. **PNAS**, v. 94, n. 23, p. 12366-12371, 1997.

PONNIAH, K.; LOO, T.S.; EDWARDS, P.J.; PASCAL, S.M.; JAMESON, G.B.; NORRIS, G.E. The production of soluble and correctly folded recombinant bovine beta-lactoglobulin variants A and B in *Escherichia coli* for NMR studies. **Protein Expression and Purification**, v. 70, n. 2, p. 283-289, 2010.

SAHIHI, M.; GHAYEB, Y. Binding of biguanides to β -lactoglobulin: molecular-docking and molecular dynamics simulation studies. **Chemical Papers**, v. 68, p. 1601–1607, 2014.

SAKURAI, K.; GOTO, Y. Dynamics and mechanism of the Tanford transition of beta-lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, p. 483-96, 2005.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, beta-lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1-2, p. 136-148, 2000.

SCOTT, R.C.; CRABBE, D.; KRYNSKA, B.; ANSARI, R.; KIANI, M.F. Aiming for the heart: targeted delivery of drugs to diseased cardiac tissue. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, p. 459–470, 2008.

SHANG, Y.; HU, X.; DIRENZO, J.; LAZAR, M.A.; BROWN, M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. **Cell**, v. 103, n. 6, p. 843-852, 2000.

SHETE, H.K.; SELKAR, N.; VANAGE, G.R.; PATRAVALE, V.B. Tamoxifen nanostructured lipid carriers: Enhanced *in vivo* antitumor efficacy with reduced adverse drug effects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 468, n. 1-2, p.1-14, 2014.

SHPIGELMAN, A.; SHOHAM, Y.; ISRAELI-LEV, G.; LIVNEY, Y.D. β -Lactoglobulin–naringenin complexes: Nano-vehicles for the delivery of a hydrophobic nutraceutical. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 214-224, 2014.

STEWART, B.W.; WILD, C.P. **World Cancer Report**. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2014.

VILLAROEL, A.; TAGLIALATELA, M.; BERNARDO-SEISDEDOS, G.; ALAIMO, A.; AGIRRE, J.; ALBERDI, A.; GOMIS-PEREZ, C.; SOLDOVIERI, M.V.; AMBROSINO, P.; MALO, C.; ARESO, P. The ever-changing moods of calmodulin: how structural plasticity entails transductional adaptability. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 15, p. 2717-2735, 2014.

WANG, D.Y.; FULTHORPE, R.; LISS, S.N.; EDWARDS E.A. Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 2, p. 402–411, 2004.

WHITEHEAD, Brian. **Structural studies of calmodulin-drug complexes**. Dissertação (phD em Biofísica) - University of Sheffield, Sheffield, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO** (World Health Organization). Disponível em <http://www.who.int/topics/essential_medicines/en/>. Acessado em 18/11/2015.

WÜTHRICH, K. The way to NMR structures of proteins. **Nature Structural Biology**, v. 8, p. 923-925, 2001.

WIMLEY, W.C. The versatile beta-barrel membrane protein. **Current Opinion on Structural Biology**, v. 13, n. 4, p.404-411, 2003.

ZHANG, M.; TANAKA, T.; IKURA, M. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. **Nature Structural Biology**, v. 2, n. 9, p. 758-767, 1995.