



UNIVERSIDADE
FERNANDO
PESSOA

ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DE VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE MMP20 E A SUA ASSOCIAÇÃO COM AMELOGÉNESE IMPERFEITA

[Bioinformatic analysis of genetic variations in the MMP20 gene and its association with
amelogenesis imperfecta]

Dissertação de Mestrado

[Mestrado integrado de medicina dentária]

Etienne Humblot

Orientador:

Doutor Rúben Miguel Pereira Fernandes

Co-Orientadora:

Doutora Irina de Sousa Moreira

Junho 2025

ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DE VARIAÇÕES GENÉTICAS NO GENE MMP20 E A SUA ASSOCIAÇÃO COM AMELOGÉNESE IMPERFEITA

[Bioinformatic analysis of genetic variations in the MMP20 gene and its association with amelogenesis imperfecta]

Dissertação de Mestrado

[Mestrado integrado de medicina dentaria]

Etienne Humblot

Orientador:

Doutor Rúben Miguel Pereira Fernandes

Co-Orientadora:

Doutora Irina de Sousa Moreira

Junho 2025

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão ao meu orientador, Rúben Miguel Pereira Fernandes, assim como à minha coorientadora, Irina de Sousa Moreira, pela orientação, disponibilidade e conselhos ao longo de todo este trabalho.

Um agradecimento muito especial à Raquel Gouveia, cuja ajuda preciosa foi determinante para a realização desta dissertação. Graças ao seu acompanhamento paciente, às suas explicações técnicas e ao seu apoio constante, pude realizar as análises e dominar as ferramentas necessárias.

Agradeço também aos meus pais, aos meus sogros, às minhas duas avós e à minha irmã mais nova, pelo apoio moral e emocional ao longo destes cinco anos de estudos. Agradeço igualmente aos meus amigos, cuja presença e cujo apoio foram fundamentais ao longo deste percurso. Recordo com particular emoção os meus dois avôs, que faleceram durante este período, e que permanecem vivos na minha memória.

RESUMO

A amelogenese imperfeita é uma patologia hereditária que afeta a formação do esmalte dentário, na qual mutações no gene *MMP20* foram identificadas como uma das principais causas. Esta dissertação investiga o impacto de oito variantes patogênicas de *MMP20* sobre a estrutura, a dinâmica e o potencial funcional da proteína, utilizando abordagens de modelagem molecular, dinâmica molecular (MD) e *docking in silico*. Após a modelagem tridimensional das formas selvagem e mutadas da proteína, foram realizadas simulações de dinâmica molecular de 100 ns (com 3 réplicas por sistema). As análises estruturais (RMSD, RMSF, SASA, pontes de hidrogênio) permitiram identificar perturbações variadas conforme a mutação, afetando a estabilidade global, a flexibilidade local e a geometria do sítio catalítico. Uma fase de *docking* molecular, envolvendo nove ligantes inibidores de MMPs, foi então conduzida para explorar a acessibilidade funcional das formas mutadas. A análise visual dos complexos revelou que algumas mutações, como E209Q, Q376X e S237Y, permitem a manutenção de uma ligação cataliticamente relevante, apesar das alterações estruturais. Outras, como H226Q e H204R, provocam uma desorganização do centro catalítico, comprometendo as interações com os inibidores. Este trabalho destaca o potencial de resiliência ou de fragilidade local do sítio ativo, dependendo da natureza da mutação, e sublinha a importância de abordagens estruturais *in silico* para a estratificação de variantes patogênicas. Os resultados obtidos abrem perspectivas para o reposicionamento de ligantes ou para uma personalização terapêutica nas formas genéticas de amelogenese imperfeita associadas ao gene *MMP20*.

Palavras-chave: amelogenese imperfeita, *MMP20*, mutação patogênica, dinâmica molecular, *docking* molecular.

ABSTRACT

Amelogenesis imperfecta is a hereditary disorder affecting enamel formation, with MMP20 gene mutations recognized as a major molecular cause. This thesis investigates the structural, dynamic, and functional impact of eight pathogenic MMP20 variants using molecular modeling, molecular dynamics (MD) simulations, and in silico docking approaches. Three-dimensional models of both wild-type and mutated MMP20 were generated, followed by 100-ns MD simulations (in triplicate) to assess the impact of each mutation. Structural analyses (RMSD, RMSF, SASA, hydrogen bonds) revealed divergent effects depending on the mutation, altering global stability, local flexibility, and catalytic site geometry. A molecular docking phase involving nine MMP inhibitor ligands was conducted to explore the functional accessibility of the mutated forms. Visual inspection of the complexes revealed that certain mutations, such as E209Q, Q376X, and S237Y, allow the maintenance of catalytically relevant binding despite structural alterations. In contrast, mutations like H226Q and H204R lead to disorganization of the catalytic center, compromising interactions with the inhibitors. This work highlights the structural resilience or vulnerability of the active site depending on the mutation and demonstrates the value of computational approaches to functionally stratify pathogenic variants. These findings pave the way for ligand repurposing strategies and mutation-specific therapeutic targeting in genetic forms of amelogenesis imperfecta linked to MMP20.

Keywords: amelogenesis imperfecta, MMP20, pathogenic mutation, molecular dynamics, molecular docking.

INDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Material e métodos	2
2. METODOLOGIA.....	5
2.1. Caracterização do gene <i>MMP20</i>	5
2.1.1. Estrutura genética do gene <i>MMP20</i>	5
2.1.2. Estrutura tridimensional da proteína MMP20	5
2.1.3. Expressão e função biológica da MMP20	10
2.1.4. Mutações identificadas e implicações patogénicas	11
3. RESULTADOS.....	15
3.1. Análise por dinâmica molecular das mutações do gene <i>MMP20</i>	15
3.1.1. Objetivos da análise in silico	15
3.1.2. Avaliação da integridade espacial e da estabilidade estrutural dos sistemas simulados.....	16
3.1.3. Parâmetros estruturais analisados	18
3.1.4. Resultados das análises estruturais	19
3.1.4.1. RMSD: estabilidade conformacional global.....	19
3.1.4.2. Pontes de hidrogénio (H-bonds).....	21
3.1.4.3. Análise da superfície acessível ao solvente (SASA) global e por resíduo	22
3.2. <i>Docking</i> molecular: avaliação das interações entre ligante e MMP20.....	32
3.2.1. Objetivo do <i>docking</i> molecular	32
3.2.2. Ligantes selecionados	33
3.2.3. Análise das interações ligante-proteína: abordagem visual e computacional.....	35
3.2.3.1. NNGH.....	36
3.2.3.1.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	36

3.2.3.1.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	38
3.2.3.2. SB-3CT	39
3.2.3.2.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	39
3.2.3.2.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	40
3.2.3.3. Minociclina	41
3.2.3.3.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	41
3.2.3.3.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	43
3.2.3.4. Marimastat	44
3.2.3.4.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	44
3.2.3.4.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	45
3.2.3.5. Gm6001	46
3.2.3.5.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	46
3.2.3.5.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	47
3.2.3.6. Doxiciclina-d6	48
3.2.3.6.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	48
3.2.3.6.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	50
3.2.3.7. Curcumina	50
3.2.3.7.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	50
3.2.3.7.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	52
3.2.3.8. Batimastat	53
3.2.3.8.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	53
3.2.3.8.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	54
3.2.3.9. Andrografolida.....	55
3.2.3.9.1. Análise das interações nos diferentes sistemas.....	55
3.2.3.9.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD	56
4. DISCUSSÃO	59

4.1. Interpretação dos efeitos estruturais das mutações.....	59
4.2. Comparação com os trabalhos anteriores sobre a dinâmica molecular da MMP20	61
4.3. Implicações terapêuticas dos resultados de docking	62
4.4. Limitações e perspectivas.....	63
5. CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representação tridimensional da proteína humana MMP20 (AlphaFold AF-O60882-F1) colorida por domínio funcional. O péptido sinal está representado a magenta, o propéptido a azul-claro (incluindo o motivo cysteine switch), e o domínio catalítico a verde. Os resíduos coordenadores do zinco catalítico, assim como o próprio ião, estão a deepsalmon; o zinco estrutural e os seus resíduos coordenadores, a azul-marinho; os iões de cálcio e os resíduos associados, a ciano. A região de charneira aparece a amarelo. Os subdomínios Hemopexina 1, 2, 3 e 4 estão coloridos, respetivamente, a laranja, roxo, rosa-vivo e azul, com o resíduo de charneira (390) a cinzento. A ponte dissulfure entre C296 e C483 encontra-se assinalada a vermelho 6

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Distribuição dos tipos de mutação de acordo com sua classificação clínica para o gene <i>MMP20</i>	13
Gráfico 2 Evolução do RMSD médio das estruturas da MMP20 (WT e mutantes)	16
Gráfico 3 Perfil das flutuações RMSF (Root Mean Square Fluctuation) por resíduo para a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e as suas oito variantes	20
Gráfico 4 Representação em diagrama de caixas (boxplot) do número de ligações de hidrogénio internas observadas nas simulações de dinâmica molecular para o tipo selvagem (WT) e oito variantes da proteína MMP20.....	22
Gráfico 5 Evolução temporal da SASA global (nm ²) das variantes ao longo da simulação	24
Gráfico 6 Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante dupla A304G_A349V.....	25
Gráfico 7 Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante H226Q	26
Gráfico 8 Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante Y454X	27
Gráfico 9 Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante Q376X	28
Gráfico 10 Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante S237Y	29
Gráfico 11 Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante Q374H	30
Gráfico 12 Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante H204R	31
Gráfico 13 Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante E209Q	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Avaliação de artefactos decorrentes das condições periódicas (mindist).....	71
Anexo B. Tabelas de seleção das poses para o docking molecular	77
Anexo C. Resíduos e iões envolvidos nas interações proteína-ligante (BINANA)	83
Anexo D. Representações estruturais dos complexos proteína-ligante obtidos por docking molecular	87

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

3'UTR	Região 3' Não Traduzida de um Ácido Ribonucleico Mensageiro
Å	Angstrom
AI	Amelogénese Imperfeita
AMELX	Amelogenina
BB-94	Batimastat
Cys100	Cisteína Crucial 100
ENAM	<i>ENAM</i> elina
GM6001	Ilomastat
H-bonds	Ponte de Hidrogénio
K	Kelvin
kb	Quilobases
kDa	QuiloDalton
Ki	Constante de Inibição
LGA Algorithm)	Algoritmo Genético Lamarckiano (do inglês Lamarckian Genetic
M	Número de Moles
MD	Dinâmica Molecular
microARNs	Micro Ácido Ribonucleico
MMP-1	Metaloproteinases de Matriz 1
MMP-13	Metaloproteinases de Matriz 13
MMP-2	Metaloproteinases de Matriz 2
MMP20	Metaloproteinases de Matriz 20
MMP-3	Metaloproteinases de Matriz 3
MMP-7	Metaloproteinases de Matriz 7
MMP-8	Metaloproteinases de Matriz 8
MMP-9	Metaloproteinases de Matriz 9
MMPs	Metaloproteinases de Matriz

Msx2	<i>Msh Homeobox 2</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (do inglês National Center for Biotechnology Information)
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
nm²	Nanometro ao Quadrado
NNGH	N-Isobutil-N-(4-Metoxifenilsulfonil)Glicilhidroxâmico
NPT	Conjunto Isotérmico-Isobárico
ns	Nanosegundo
NVT	Conjunto Canônico
PDB	Banco de Dados de Proteínas (do inglês Protein Data Bank)
PDBQT	Banco de Dados de Proteínas com Informações de Carga Parcial (do inglês Protein Data Bank with Partial Charge)
PTMs	Modificações Pós-Traducionais
rcoulomb	Raio de corte Coulomb
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD (Deviation)	Raiz do Desvio Quadrático Médio (do inglês Root Mean Square Deviation)
RMSF (Fluctuation)	Raiz da Flutuação Quadrática Média (do inglês Root Mean Square Fluctuation)
RNA	Ácido Ribonucleico
Runx2	Fator de Transcrição 2 Relacionado com o Nanismo (do inglês Runt-related transcription factor 2)
rvdw	Raio de Corte van der Waals
SASA	Análise da Superfície Acessível ao Solvente
SB-3CT	Inibidor Seletivo das Metaloproteinases de Matriz
SDM	Mutador Direcionado ao Local (do inglês Site-Directed Mutator)

TGFBR1	Receptor de Fator de Crescimento Transformador Beta 1
TGF-β1	Factor de Crescimento Transformante Beta 1
WT	Tipo Selvagem (do inglês Wild Type)
$\Delta\Delta G$	Variação da Energia Livre de Gibbs Associada a uma Mutação

1. INTRODUÇÃO

A amelogenese imperfeita (AI) é uma afeção hereditária que perturba o desenvolvimento normal do esmalte dentário. Além de ser um simples defeito estético, afeta profundamente a vida quotidiana das pessoas afetadas: dentes sensíveis, frágeis, por vezes dolorosos, com uma aparência alterada que pode afetar a confiança desde a infância. Apesar de ser evitável no plano sintomático, esta patologia permanece hoje mal diagnosticada, pouco conhecida pelo grande público e frequentemente subestimada pelos sistemas de saúde (Coffield et al., 2005).

Do ponto de vista biológico, a AI assenta numa origem genética multifatorial, com mutações identificadas em vários genes responsáveis pelas etapas-chave da formação do esmalte, nomeadamente AMELX, ENAM e MMP20 (Crawford et al., 2007). Entre eles, o gene *MMP20* tem atraído uma atenção crescente. Ele codifica uma enzima essencial, a metaloproteinase MMP20, também chamada de ENAMelina, que intervém no início do processo de mineralização do esmalte. Quando esta enzima não funciona corretamente, devido a mutações, as proteínas da matriz dentária não são eliminadas como deveriam ser (Seymen et al., 2015).

Este disfuncionamento é a origem de formas ditas “de baixa maturidade” de AI, frequentemente associadas a um esmalte mais mole, mais escuro e que se desgasta facilmente. No entanto, ainda hoje, o elo preciso entre certas mutações de MMP20 e suas consequências na estrutura da proteína permanece obscuro. Melhor compreender estes mecanismos é, portanto, crucial, tanto para melhorar o diagnóstico quanto para abrir caminho a novas soluções terapêuticas (Kim et al., 2005).

É nessa perspetiva que se inscreve este trabalho. Graças às ferramentas de modelagem bioinformática, torna-se possível explorar em detalhe o impacto de mutações específicas na estrutura tridimensional de MMP20. Este trabalho visa modelar estas mutações, analisar seus efeitos através da simulação de dinâmica molecular e explorar pistas de correção terapêutica, nomeadamente via *docking* molecular. Em suma, esta pesquisa situa-se na intersecção da genética, da biologia estrutural e da medicina de precisão, com um único objetivo: melhor compreender para melhor tratar.

1.1. Material e métodos

No âmbito deste estudo, as mutações conhecidas do gene *MMP20* foram recolhidas a partir da base de dados ClinVar. A estrutura tridimensional da proteína *MMP20* foi posteriormente obtida através do modelo AlphaFold disponível na UniProt, que apresentava um nível de confiança suficiente para a análise estrutural. Como este modelo não incluía os iões de zinco e cálcio necessários à função catalítica, foi recuperada uma estrutura cristalográfica parcial no formato PDB, correspondente ao domínio catalítico com os iões (2JSD), a qual foi alinhada com o modelo AlphaFold utilizando o software PyMOL, de forma a integrar os iões na estrutura completa.

Foram selecionadas oito mutações associadas à amelogenese imperfeita hipomaturação do tipo 2A2, todas do tipo *nonsense* ou *missense*, a partir dos dados da base ClinVar, e aplicadas manualmente no modelo selvagem utilizando o PyMOL. As respetivas estruturas foram depois preparadas para a simulação de dinâmica molecular através da plataforma CHARMM-GUI (Jo et al., 2008; Brooks et al., 2009), utilizando o campo de forças CHARMM36m (Lee et al., 2016). Cada sistema foi solvatado numa caixa de água retangular, com uma distância mínima de 15 Å entre qualquer átomo da proteína e as bordas da caixa, neutralizado com iões NaCl a uma concentração de 0,15 M, e parametrizado com o referido campo de forças. Durante a geração dos ficheiros, foi configurada uma fase de *equilibration* sob o conjunto NVT, utilizando o termóstato de Nosé-Hoover para estabilizar a temperatura a 300 K, seguida de uma fase NPT com o baróstato de Parrinello-Rahman para estabilizar a pressão a 1 bar. A escolha dos parâmetros de temperatura e de neutralização iónica foi inspirada nos trabalhos de Nikolopoulos et al. (2021).

As simulações foram posteriormente conduzidas com o motor GROMACS (Abraham et al., 2015, 2025), seguindo um protocolo padrão em três etapas: uma minimização de energia destinada a relaxar a estrutura inicial, uma fase de inicialização de acordo com as condições de equilíbrio definidas, e por fim uma fase de produção com duração de 100 nanosegundos.

Para garantir a fiabilidade dos resultados, foram realizadas três réplicas independentes para cada sistema, o que permitiu obter dados mais representativos. Foi realizada uma análise da distância mínima (em nm) para cada trajetória, com o objetivo de verificar a ausência de contato artificial entre a proteína e suas imagens periódicas. Em seguida, o RMSD (*Root Mean Square Deviation*), calculado com a ferramenta `gmx rms` do

GROMACS, foi utilizado para inspecionar a estabilidade estrutural ao longo do tempo e definir, para cada réplica, a partir de que momento (em ns) as análises seguintes seriam realizadas. As análises estruturais finais foram então conduzidas com base nesses segmentos estáveis e incluíram: a superfície acessível ao solvente (SASA), o SASA por resíduo, o número de ligações de hidrogénio (*H-bonds*) e o RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), este último calculado com o pacote Bio3D no RStudio.

Para o estudo dos ligantes através de *docking* molecular, foram extraídas três poses de cada sistema a partir das trajetórias de dinâmica molecular, de forma a ter em conta a flexibilidade estrutural induzida pelas mutações. Inicialmente, os ficheiros foram convertidos para o formato Mol2 com o auxílio da ferramenta Open Babel (O'Boyle et al., 2011), de forma a garantir que as ligações químicas entre os átomos e as cargas elétricas de cada átomo estivessem corretamente definidas. Os complexos ligante-recetor foram preparados com recurso à ferramenta AutoDock Tools 1.5.7, através da geração dos ficheiros de entrada necessários para o AutoDock 4.2, nomeadamente os ficheiros PDBQT dos recetores e dos ligantes (Morris et al., 2009). Após a configuração dos ficheiros, a primeira etapa consistiu na execução do programa AutoGrid4 para calcular os mapas de potencial de grelha em torno do sítio ativo.

O *docking* foi posteriormente realizado em modo rígido, utilizando o algoritmo *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) implementado no AutoDock 4.2 (Morris et al, 2009), permitindo avaliar a afinidade de ligação entre o ligante e as diferentes conformações do recetor. A análise dos resultados baseou-se em quatro aspetos principais. Primeiro, a descrição visual dos complexos e a medição das distâncias entre o ligante e o zinco catalítico, realizadas com o auxílio do PyMOL. Em seguida, a identificação dos resíduos envolvidos na interação com o ligante, feita por meio da ferramenta BINANA (Durrant & McCammon, 2011). Para esta análise, foram considerados apenas os resíduos localizados a uma distância inferior ou igual a 2,5 Å em relação ao ligante. Por fim, a comparação com a estrutura de referência 2JSD (Arendt et al, 2007), que representa o domínio catalítico da MMP20 em complexo com o ligante NNGH. Esta interação foi determinada experimentalmente por espectroscopia de RMN.

Análise bioinformática de variações genéticas no gene MMP20 e a sua associação com amelogenese imperfeita

2. METODOLOGIA

2.1. Caracterização do gene *MMP20*

Nesta primeira parte, apresentaremos o gene *MMP20*, nomeadamente a sua estrutura genética e a estrutura da proteína *MMP20*. Por fim, abordaremos as mutações identificadas neste gene e as suas implicações patogénicas.

2.1.1. Estrutura genética do gene *MMP20*

Entre as muitas metaloproteinases de matriz (MMPs), o gene *MMP20* ocupa um lugar especial.

Tal como os outros membros desta família, participa na degradação controlada dos componentes da matriz extracelular, uma função essencial em processos como a remodelação dos tecidos ou a cicatrização (Visse & Nagase, 2003).

No entanto, este gene destaca-se claramente pela sua especialização. Com efeito, ao contrário da maioria das MMPs, a sua expressão é quase exclusivamente limitada aos tecidos dentários em desenvolvimento, mais precisamente aos ameloblastos durante a amelogénese (Llano et al., 1997).

No ser humano, o gene *MMP20* localiza-se no cromossoma 11q22.3, numa região genómica rica em genes relacionados com metaloproteinases. Abrange aproximadamente 21 quilobases (kb) e é composto por 10 exões (NCBI, 2024).

O gene codifica uma pró-proteína de 483 aminoácidos, com uma massa molecular de cerca de 54 kDa, que ainda necessita de sofrer diversas modificações antes de atingir a sua forma enzimaticamente ativa (UniProt, 2024).

2.1.2. Estrutura tridimensional da proteína *MMP20*

A proteína *MMP20* é inicialmente sintetizada sob a forma de um precursor inativo denominado pro-*MMP20*.

Tal como acontece com outras metaloproteinases matriciais, esta forma inicial requer determinadas modificações pós-traducionais para se tornar funcional.

A ativação desta enzima depende principalmente da clivagem do domínio propeptídico, que atua temporariamente como um inibidor ao bloquear o acesso ao sítio catalítico. Quando proteases específicas removem este propéptido, o domínio catalítico fica então livre para atuar.

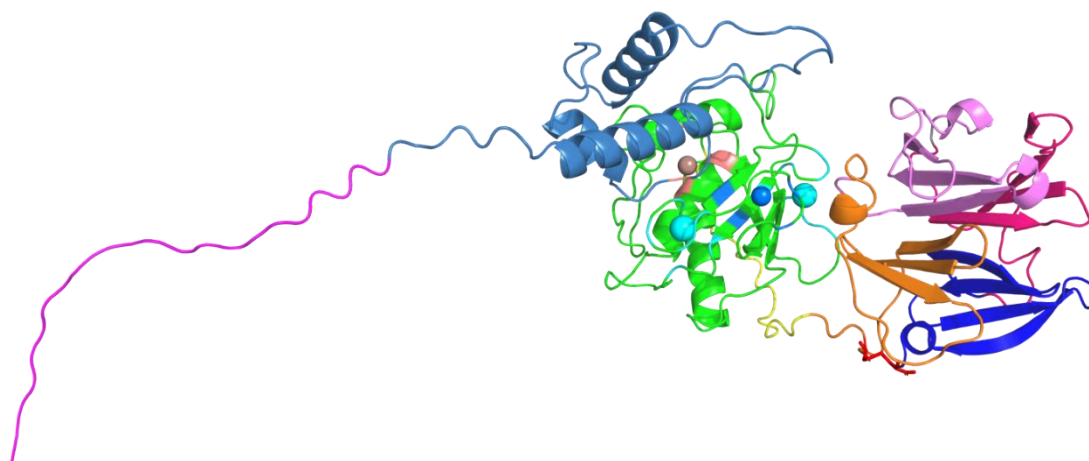
Este mecanismo de ativação, comum a todas as MMPs, garante um controlo rigoroso da sua atividade, tanto no espaço como no tempo. Isto permite evitar qualquer degradação acidental ou não específica dos componentes da matriz extracelular (Bartlett & Simmer, 1999).

A estrutura tridimensional da proteína MMP20 utilizada neste estudo provém de um modelo preditivo gerado pelo AlphaFold (AF-O60882-F1). Esta predição foi enriquecida com a integração das posições dos iões metálicos, extraídas de uma estrutura experimental parcial obtida por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (PDB ID: 2JSD), através de alinhamento estrutural.

O conjunto foi posteriormente analisado com o software PyMOL e colorido por domínios e funções, de modo a simplificar a visualização e a compreensão (Figura 1).

Figura 1

Representação tridimensional da proteína humana MMP20 (AlphaFold AF-O60882-F1) colorida por domínio funcional. O péptido sinal está representado a magenta, o propéptido a azul-claro (incluindo o motivo cysteine switch), e o domínio catalítico a verde. Os resíduos coordenadores do zinco catalítico, assim como o próprio ião, estão a deepsalmon; o zinco estrutural e os seus resíduos coordenadores, a azul-marinho; os iões de cálcio e os resíduos associados, a ciano. A região de charneira aparece a amarelo. Os subdomínios Hemopexina 1, 2, 3 e 4 estão coloridos, respetivamente, a laranja, roxo, rosa-vivo e azul, com o resíduo de charneira (390) a cinzento. A ponte dissulfure entre C296 e C483 encontra-se assinalada a vermelho.



O péptido sinal, representado a magenta, estende-se dos resíduos 1 a 22. Este desempenha um papel central na orientação correta da proteína dentro dos vários compartimentos celulares.

Imediatamente após este péptido sinal, encontra-se o propéptido, localizado entre os resíduos 23 e 107 e representado a azul-claro. Este propéptido contém uma região específica denominada motivo «*cysteine switch*», que se estende dos resíduos 98 a 105. Este motivo particular inclui, nomeadamente, uma cisteína crucial (C100), que intervém diretamente na regulação da atividade enzimática (UniProt, 2024). Na forma inativa da enzima (zimogénio), esta cisteína interage com o ião de zinco situado no sítio catalítico, impedindo assim qualquer atividade enzimática prematura.

Este mecanismo específico, denominado «*cysteine switch*», constitui um meio altamente preciso de controlar o momento e o local em que a enzima se torna ativa. Quando o propéptido é finalmente removido por proteases, a cisteína liberta-se do ião de zinco, tornando o sítio ativo acessível e plenamente funcional. Este processo garante, assim, uma ativação direcionada da MMP20, evitando qualquer degradação accidental ou inadequada da matriz extracelular (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990).

O domínio catalítico da MMP20, compreendido entre os resíduos 113 e 272, constitui a região central da enzima, onde ocorre a atividade catalítica. Na visualização tridimensional, esta parte da proteína foi destacada com uma coloração verde, facilitando a sua identificação no conjunto da estrutura.

No centro deste domínio encontra-se um ião de zinco catalítico, absolutamente essencial para a função enzimática. Este ião é coordenado por três resíduos de histidina (H226, H230 e H236), que integram o motivo altamente conservado HEXXHXXGXXH (Visse & Nagase, 2003), bem como por a cisteína (C100). Estes quatro resíduos foram igualmente coloridos em *deepsalmon*, à semelhança do zinco catalítico, de modo a evidenciar a sua contribuição direta para a configuração do sítio ativo. Este conjunto estrutural é fundamental para ativar uma molécula de água, que atuará como nucleófilo na reação de hidrólise das ligações peptídicas dos substratos, processo central na atividade enzimática das MMPs.

Perto do sítio catalítico principal, foi também observado um segundo ião de zinco. Ao contrário do primeiro, que está diretamente envolvido na reação enzimática, este segundo ião de zinco não participa na atividade catalítica propriamente dita.

A sua função consiste essencialmente em estabilizar a estrutura tridimensional da proteína MMP20. Na representação molecular, este íão de zinco está ilustrado em azul-marinho, assim como os resíduos de aminoácidos responsáveis pela sua coordenação: H176, D178, H191 e H204. Estes aminoácidos, contribuem de forma clara para a preservação da integridade estrutural da enzima. Este modo de coordenação, que envolve histidinas e um resíduo de aspartato, é frequentemente observado em muitas metaloproteinases, onde desempenha um papel significativo na manutenção da conformação ativa e estável da proteína (Jacobsen et al., 2010).

Além disso, dois íões de cálcio, representados em ciano na estrutura modelada, foram incorporados para ilustrar a sua contribuição para a estabilidade local do domínio catalítico.

O primeiro íão de cálcio é coordenado pelos resíduos E164, A165, D166, E197, G198, G200 e D202.

O segundo interage com os resíduos D183, G184, R186, T188, D206 e E209.

Esta fixação de íões de cálcio é indispensável para a estabilização da conformação ativa da enzima e permite evitar a sua autohidrólise, como foi demonstrado em vários estudos sobre metaloproteinases semelhantes (Gossas & Danielson, 2006).

A região de charneira, que liga o domínio catalítico ao domínio C-terminal (resíduos 273 a 292), foi representada a amarelo para ilustrar a sua potencial flexibilidade estrutural. Esta flexibilidade poderá facilitar os movimentos interdomínios necessários para a função da enzima.

Na extremidade C-terminal, o domínio hemopexina está dividido em quatro subdomínios sucessivos, coloridos de forma distinta para facilitar a sua identificação:

- Hemopexina 1 (resíduos 293-343), a laranja
- Hemopexina 2 (resíduos 344-389), a roxo
- Hemopexina 3 (resíduos 391-439), a rosa vivo
- Hemopexina 4 (resíduos 440-483), a azul

Estas subunidades participam ativamente no reconhecimento e na ligação específica de substratos como a amelogenina e a ameloblastina, sublinhando o seu papel essencial na função biológica da MMP20 durante a amelogenese (Lee et al., 2010).

Por fim, o resíduo 390, representado a cinzento, desempenha o papel de ponto de charneira entre os subdomínios Hemopexina 2 e Hemopexina 3. A sua posição intermédia confere-lhe um papel-chave na organização dinâmica e modular do domínio C-terminal da proteína.

Além disso, uma ponte dissulfureto intramolecular ligante os resíduos de cisteína C296 e C483 foi colorida a vermelho. Esta ponte une as extremidades do domínio hemopexina e desempenha um papel essencial na estabilização da sua estrutura tridimensional. Ao limitar a flexibilidade excessiva da região terminal, promove um dobramento estável dos quatro subdomínios.

Esta configuração poderá ser indispensável para permitir uma interação eficaz com os substratos proteicos. Este tipo de ponte dissulfureto, conservado em vários membros da família das metaloproteinasas, é conhecido por reforçar a resistência mecânica e a durabilidade estrutural dos domínios ricos em hemopexina (Lee et al., 2010).

Paralelamente, várias modificações pós-traducionais (PTMs) foram identificadas através de abordagens *in silico*.

Uma dessas modificações, uma O-GlcNAcilação predita ao nível do resíduo S67, localizado no propéptido da MMP20, poderá desempenhar um papel na maturação, estabilidade ou até na localização da proteína (York et al., 2020).

Outros tipos de modificações, como a fosforilação, a acetilação e a ubiquitinação, também foram preditos. No entanto, até à data, nenhuma destas modificações foi confirmada experimentalmente para esta metaloproteinase (Hornbeck et al., 2015).

Embora estes dados permaneçam especulativos, sugerem a existência de um nível de regulação pós-traducional ainda pouco explorado, que poderá influenciar as propriedades estruturais ou funcionais da MMP20.

Em suma, a MMP20 apresenta uma organização genética e proteica finamente ajustada à sua função na formação do esmalte.

Esta arquitetura particular constitui uma chave de leitura valiosa para interpretar os efeitos patogénicos de certas mutações.

O estudo deste gene permite também lançar as bases para uma compreensão mais aprofundada das anomalias de mineralização, como as observadas em patologias como a amelogenese imperfeita.

2.1.3. Expressão e função biológica da MMP20

A metaloproteinase MMP20 apresenta uma expressão espaço-temporal altamente específica, em contraste com a maioria dos outros membros da família das metaloproteinases matriciais.

No ser humano, assim como noutros mamíferos, a sua expressão está essencialmente restrita aos tecidos dentários em desenvolvimento (Llano et al., 1997), e mais especificamente aos ameloblastos, as células responsáveis pela secreção do esmalte durante a amelogênese (Bartlett & Simmer, 1999).

A expressão de MMP20 inicia-se precocemente, logo na fase secretora, e prolonga-se durante as primeiras etapas da fase de maturação. Esta regulação temporal estrita reflete uma orquestração precisa dos eventos de diferenciação celular ao longo da amelogênese. É parcialmente controlada por fatores de transcrição específicos dos ameloblastos, como Runx2 e Msx2, bem como por certas vias de sinalização. Nomeadamente, foi demonstrado que o TGF- β 1, através do seu recetor TGFBR1, é capaz de induzir a expressão de MMP20 nos ameloblastos, sugerindo uma regulação transcricional direta por esta via (Gao et al., 2009).

No entanto, esta expressão não se mantém constante ao longo de toda a amelogênese. Com efeito, atinge o seu pico durante a fase secretora e diminui progressivamente à medida que ocorre a transição para a fase de maturação (Bartlett & Simmer, 1999). À medida que os ameloblastos alteram o seu fenótipo e que as necessidades de remodelação enzimática da matriz diminuem, a expressão de MMP20 torna-se cada vez mais reduzida, até se tornar praticamente indetetável no final da maturação (Lu et al., 2008). Esta dinâmica reflete a evolução funcional dos ameloblastos, que passam de um papel de secreção e transformação da matriz orgânica para uma participação mais intensa na mineralização terminal.

Do ponto de vista funcional, a MMP20 intervém principalmente na clivagem de duas proteínas principais da matriz do esmalte: a amelogenina e a ameloblastina.

A amelogenina, que representa cerca de 90 % das proteínas do esmalte em formação, é fragmentada pela MMP20 para ser eliminada e libertar o espaço necessário ao crescimento dos cristais.

A ameloblastina, essencial para a adesão dos ameloblastos à superfície do esmalte, é também um substrato da MMP20, o que sugere um papel desta enzima na remodelação

das interações célula-matriz durante a diferenciação dos ameloblastos (Chun et al., 2010). Além disso, a MMP20 parece contribuir para a preparação do esmalte imaturo para a fase de maturação, degradando nomeadamente as proteínas estruturais residuais e permitindo a infiltração progressiva dos íons minerais (Kim et al., 2005). Esta função é corroborada por observações histológicas em pacientes portadores de mutações no gene *MMP20*, cujo esmalte permanece parcialmente orgânico, poroso e vulnerável à degradação mecânica (Wright et al., 2015).

Em suma, a expressão localizada da MMP20 nos ameloblastos, combinada com a sua capacidade de clivar substratos essenciais da matriz do esmalte, sublinha o seu papel central na génese de um esmalte dentário saudável, denso e funcional.

O seu mau funcionamento constitui, portanto, uma via principal para a patologia hereditária conhecida como amelogenese imperfeita, que será abordada na secção seguinte.

2.1.4. Mutações identificadas e implicações patogénicas

O estudo das mutações que afetam o gene *MMP20* apresenta um interesse particular no contexto das anomalias hereditárias que afetam o esmalte dentário, especialmente a amelogenese imperfeita (AI).

Para compreender melhor a diversidade e as características específicas dessas mutações, realizamos uma extração completa dos dados disponíveis na base ClinVar.

Essa análise nos permitiu identificar um total de 174 mutações diferentes relacionadas ao gene *MMP20*, provenientes de contribuições clínicas internacionais.

A análise das consequências moleculares das 174 mutações identificadas na base ClinVar evidencia uma predominância das variantes de sentido trocado (*missense variants*), que representam, sozinhas, cerca de 48% do total (84 mutações).

Essas alterações provocam a substituição de um aminoácido por outro na sequência proteica.

Dependendo da localização do resíduo afetado, especialmente nos domínios catalítico ou hemopexina, essas substituições podem afetar a conformação tridimensional da proteína, perturbar a coordenação dos íons metálicos (zinco ou cálcio) ou alterar o reconhecimento

dos substratos da matriz amelária (Kim et al., 2005).

Trabalhos sobre a estrutura da MMP20 destacaram, entre outras coisas, o impacto potencial dessas mutações na estabilidade funcional da proteína (Lee et al., 2010).

Do ponto de vista clínico, essas mutações são particularmente difíceis de interpretar, pois seu efeito não é necessariamente devastador. Assim, uma modificação mínima pode ser suficiente para perturbar a atividade enzimática, sem necessariamente causar uma degradação evidente da proteína (Jacobsen et al., 2010). Por essa razão, elas representam um desafio central para a bioinformática estrutural e funcional, especialmente por meio da modelagem molecular e das simulações dinâmicas (Wright et al., 2015).

Além dessas mutações de sentido trocado, também são identificadas várias outras categorias de variantes, menos frequentes, mas igualmente interessantes:

- 55 mutações intrônicas, localizadas nas regiões não codificantes do gene. Embora não afetem diretamente a sequência da proteína, algumas podem perturbar os sites de *splicing* ou modificar a estrutura secundária do RNA pré-mensageiro, resultando em uma transcrição aberrante (Baralle & Baralle, 2005). A previsão de seu impacto continua sendo complexa e geralmente requer ferramentas especializadas ou validações experimentais.

- 19 mutações sinónimas, que não modificam o aminoácido codificado. Historicamente consideradas "silenciosas", essas mutações são hoje reconhecidas por seu potencial efeito na cinética de tradução, no dobramento co-traducional ou na estabilidade do RNAm (Chamary et al., 2006). Em um contexto tão finamente regulado quanto a amelogenese, esses efeitos subtis podem ter consequências significativas.

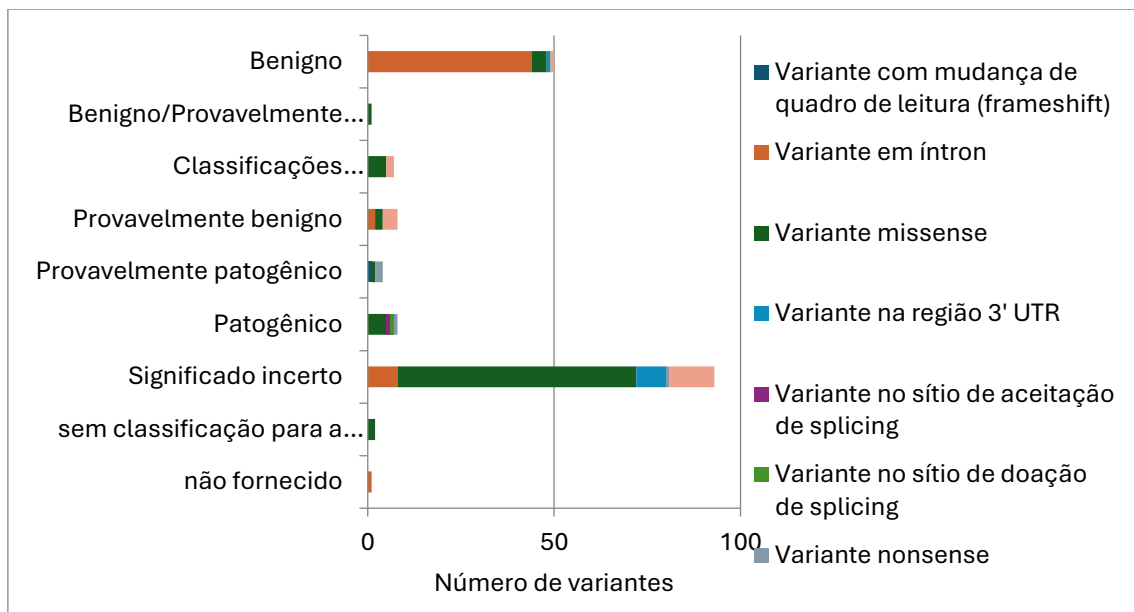
- 9 mutações na região 3'UTR, uma área não traduzida, mas crucial para a regulação pós-transcricional do gene. Essas mutações podem afetar a ligação de microRNAs, a estabilidade do RNA mensageiro ou até mesmo a eficiência de sua tradução, modulando assim, de forma indireta, a expressão de MMP20 (Bartel, 2009).

- 4 mutações de tipo sem sentido (*nonsense*), que introduzem um codão prematuro. Essas variantes levam à produção de proteínas truncadas, frequentemente desprovidas do domínio hemopexina ou incapazes de se dobrar corretamente. Essas proteínas geralmente são instáveis, rapidamente degradadas pelo sistema de vigilância celular (*nonsense-mediated decay*) ou não funcionais (Frischmeyer & Dietz, 1999). O seu impacto sobre o fenótipo é, em geral, mais acentuado e mais facilmente detetável do que o das variantes de sentido trocado.

O Gráfico a seguir ilustra a distribuição dos principais tipos de consequências moleculares entre as mutações do gene *MMP20* registadas no ClinVar:

Gráfico 1

Distribuição dos tipos de mutação de acordo com sua classificação clínica para o gene MMP20.



Apesar de sua diversidade, grande parte dessas mutações é classificada como variantes de significância incerta, devido à falta de dados funcionais ou clínicos suficientes.

Esse constatado destaca a necessidade de abordagens complementares. Em particular, o uso de ferramentas bioinformáticas, que permitiriam aprimorar a interpretação dessas variantes e compreender melhor seu impacto na estrutura e na função da *MMP20*.

Nessa perspectiva, a segunda parte deste trabalho é dedicada à análise *in silico* de oito mutações específicas selecionadas a partir dos dados do ClinVar.

Análise bioinformática de variações genéticas no gene MMP20 e a sua associação com amelogenese imperfeita

3. RESULTADOS

3.1. Análise por dinâmica molecular das mutações do gene *MMP20*

3.1.1. Objetivos da análise *in silico*

À luz dos dados clínicos recolhidos sobre o gene *MMP20*, e nomeadamente das numerosas mutações cujo impacto patogénico permanece incerto, torna-se essencial dispor de ferramentas que permitam compreender melhor as consequências funcionais dessas alterações ao nível molecular. Entre essas ferramentas, a simulação de dinâmica molecular (MD) constitui uma abordagem privilegiada para explorar a estabilidade, a flexibilidade e as modificações estruturais induzidas por mutações pontuais numa determinada proteína (Hollingsworth & Dror, 2018).

Atualmente, apenas um estudo explorou os efeitos das mutações do gene *MMP20* associadas à amelogenese imperfeita através da simulação de dinâmica molecular. Nesse trabalho, Nikolopoulos et al. (2021) analisaram o impacto de dois variantes na estrutura do domínio catalítico, evidenciando perturbações locais suscetíveis de afetar a atividade enzimática. Este estudo demonstra a relevância das simulações *in silico* para uma melhor compreensão das consequências funcionais das mutações patogénicas.

Esta segunda parte do estudo tem como objetivo principal examinar, através de simulações *in silico*, o efeito de oito mutações do gene *MMP20* na estrutura e dinâmica da respetiva proteína. Estas mutações foram selecionadas com base em três critérios principais: são do tipo *missense* ou *nonsense*, estão todas clinicamente associadas à forma hipomaturação tipo 2A2 da amelogenese imperfeita e encontram-se classificadas na base de dados ClinVar como “*pathogenic*” ou “*likely pathogenic*”. As oito mutações selecionadas são: Y454X, S237Y, Q376X, Q374H, H226Q, H204R, E209Q e A304G-A349V. A forma do tipo selvagem (*wild-type*, WT) foi também incluída como referência. Através de uma comparação sistemática entre as simulações do tipo selvagem e dos mutantes, esta análise visa.

Os resultados desta análise permitirão compreender melhor os efeitos estruturais de certas mutações associadas à amelogenese imperfeita. Servirão também de base para a terceira parte deste trabalho, dedicada à procura de moléculas terapêuticas através de técnicas de *docking* molecular (Yuriev & Ramsland, 2013).

3.1.2. Avaliação da integridade espacial e da estabilidade estrutural dos sistemas simulados

Antes de realizar as análises estruturais, foi essencial garantir que, ao longo da simulação, cada sistema se mantivesse livre de artefactos geométricos, como interações espúrias entre a proteína e suas imagens periódicas.

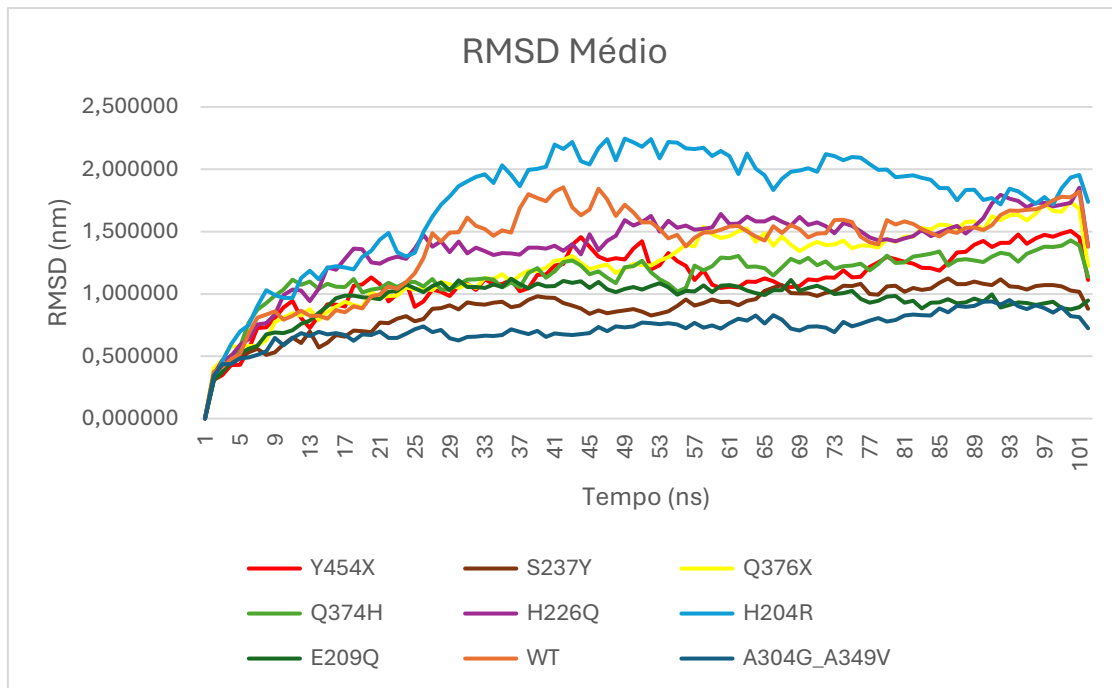
Para isso, foi realizada uma análise da distância mínima (*mindist*) entre a proteína e sua imagem periódica ao longo dos 100 nanosegundos de simulação. Esta distância, expressa em nanómetros, deve permanecer superior ao valor de *cut-off* utilizado para as interações não-ligadas (1.2 nm para *rcoulomb* e *rvdw*), evitando o risco de interações artificiais.

Cada sistema (mutante ou WT) foi simulado em três réplicas independentes. As curvas de *mindist* foram inspeccionadas visualmente com o objetivo de verificar se, ao longo da simulação, a distância entre a proteína e suas imagens periódicas permaneceu, de forma geral, acima do limiar de 1.2 nm. Este procedimento permitiu assegurar a ausência de artefactos geométrico. Os gráficos encontram-se apresentados no Anexo A.

Para além deste controlo geométrico, a estabilidade estrutural global dos sistemas foi avaliada através da análise da evolução do desvio quadrático médio (RMSD) da proteína ao longo do tempo. O cálculo do RMSD foi realizado com base nos átomos C α , permitindo identificar os períodos de equilíbrio conformacional, os quais serviram como base para a definição das janelas temporais utilizadas nas análises subsequentes. As curvas de RMSD para cada sistema estão apresentadas na Gráfico 2, logo abaixo.

Gráfico 2

Evolução do RMSD médio das estruturas da MMP20 (WT e mutantes).



A análise das curvas de RMSD revelou variações consideráveis na estabilidade conformacional entre os diferentes sistemas simulados. A mutação H204R destacou-se como a mais instável, com valores de RMSD superiores a 2,0 nm entre 34 ns e 64 ns. A partir de 65 ns, a trajetória foi considerada estável e utilizada para as análises subsequentes. Em comparação, o modelo selvagem (wild type, WT) apresentou um comportamento intermediário: seu RMSD ultrapassou 1,5 nm entre 28 ns e 53 ns, estabilizando-se posteriormente em torno de 1,5 nm, o que sugere certa flexibilidade conformacional. A partir de 55 ns, a trajetória foi considerada adequada para as análises estruturais.

A mutação H226Q apresentou um aumento gradual do RMSD até atingir cerca de 1,5 nm, valor em que se estabilizou por volta de 53 ns. A partir desse ponto, a trajetória foi considerada adequada para as análises estruturais. A mutação Y454X apresentou uma fase inicial de estabilização com RMSD em torno de 1,0 nm a partir de 17 ns, seguida por um pico de instabilidade entre 38 ns e 61 ns, atingindo valores próximos de 1,5 nm. A trajetória foi considerada estável a partir de 62 ns para as análises estruturais. Por outro lado, os sistemas mutantes E209Q, Q374H e Q376X apresentaram RMSD mais moderados, situando-se consistentemente entre 1,0 e 1,5 nm, o que pode indicar uma estabilidade estrutural relativa, embora com possível impacto conformacional moderado. As trajetórias foram consideradas estáveis a partir de 57 ns para E209Q, 55 ns para

Q374H e 54 ns para Q376X.

Finalmente, o duplo mutante A304G-A349V exibiu o perfil de RMSD mais estável entre todos os sistemas analisados, mantendo-se entre 0,5 e 1,0 nm durante toda a simulação. Este comportamento pode refletir um efeito compensatório entre as duas mutações, resultando numa estrutura particularmente estável. A trajetória foi considerada adequada para as análises estruturais a partir de 60 ns.

A definição dessas janelas temporais permite assegurar que os parâmetros estruturais avaliados, como o RMSF, o SASA global e por resíduo, bem como o número de pontes de hidrogénio (*H bonds*), sejam calculados em uma fase da simulação onde o sistema já atingiu estabilidade conformacional e integridade espacial. Essa abordagem minimiza a influência de flutuações iniciais ou artefactos associados às condições de contorno periódicas, garantindo maior confiabilidade aos resultados obtidos.

3.1.3. Parâmetros estruturais analisados

Para comparar os efeitos das diferentes mutações na proteína, foram extraídos vários parâmetros a partir das simulações de dinâmica molecular. Estes dados permitem avaliar a estabilidade, a flexibilidade, a exposição ao solvente e as interações internas da proteína nas suas diferentes versões.

As análises incidiram sobre os seguintes elementos:

- **RMSD (*Root Mean Square Deviation*):** utilizado para medir o desvio estrutural global da proteína em relação à sua conformação inicial ao longo do tempo. Reflete a estabilidade conformacional geral de cada sistema.
- **RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*):** permite identificar os resíduos que apresentam uma elevada flexibilidade local. Este parâmetro é particularmente útil para detetar regiões afetadas pelas mutações.
- **SASA (Superfície Acessível ao Solvente):** avaliado de forma global e por resíduo, o SASA permite estimar a exposição de regiões hidrofóbicas ou funcionais ao solvente, o que pode revelar rearranjos estruturais.
- **Número de ligações de hidrogénio (*H-bonds*):** monitorizado para avaliar a coesão interna da proteína. A perda de ligações de hidrogénio pode ser um sinal de desestabilização local ou global.

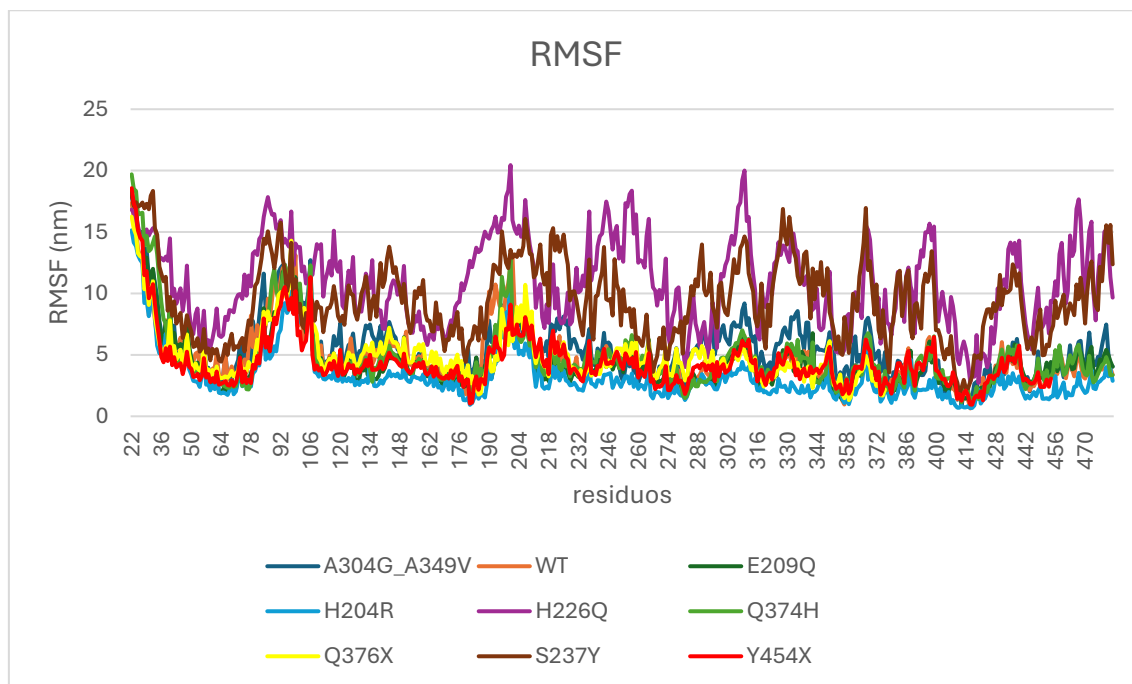
3.1.4. Resultados das análises estruturais

3.1.4.1. RMSD: estabilidade conformacional global

O RMSF foi calculado para cada sistema, com o objetivo de avaliar a flexibilidade estrutural resíduo a resíduo ao longo das simulações (Gráfico 3). Este parâmetro permite identificar regiões mais dinâmicas ou mais estáveis e comparar localmente os efeitos das mutações.

Gráfico 3

Perfil das flutuações RMSF (Root Mean Square Fluctuation) por resíduo para a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e as suas oito variantes.



O modelo do tipo selvagem (WT) apresentou flutuações predominantemente entre 2 e 6 nm, com picos notáveis entre os resíduos 93 a 106 (propeptídeo) e no resíduo 200 (domínio catalítico), atingindo valores de 12-13 nm, o que pode refletir uma flexibilidade intrínseca em regiões expostas ou estruturadas de forma menos compacta. O duplo mutante A304G-A349V revelou um perfil semelhante, com a maioria dos resíduos variando entre 4 e 8 nm e um pico acentuado de 12 nm também na região 91-106 (propeptídeo), sugerindo que, apesar da estabilidade global observada no RMSD, há flexibilidade localizada significativa. De modo análogo, os mutantes E209Q e H204R apresentaram perfis intermediários: ambos mantiveram a maioria dos resíduos entre 2 e 6 nm, com picos de 10-14 nm nas regiões 96-106 e no resíduo 200, sugerindo perturbações locais que podem afetar dinamicamente domínios funcionais ou de ligação.

Por outro lado, os mutantes H226Q e S237Y destacaram-se por exibirem perfis de flutuação extremamente elevados, indicando uma instabilidade conformacional generalizada. O sistema H226Q apresentou a maioria dos resíduos com valores entre 5 e 15 nm, e diversos picos superiores a 20 nm, particularmente nos resíduos 200 e 309 (domínios catalíticos e hemopexina 1), o que sugere uma perda marcante de rigidez

estrutural. Além disso, flutuações acima de 15 nm foram observadas nos resíduos 87-97, 194-207, 237, 246, 255-259, 367, 399 e 467, apontando para múltiplas regiões afetadas de forma simultânea. Da mesma forma, S237Y exibiu ampla variabilidade, com a maior parte dos resíduos entre 6 e 10 nm e múltiplos picos entre 12 e 16 nm, localizados em regiões como 85-87, 92, 97, 144, 196-225, 237, 244-249, 290-311, 338-349, 382, 387, 398 e 480-483, o que reforça o impacto difuso dessa mutação na estabilidade conformacional.

Os mutantes Q374H, Q376X e Y454X apresentaram perfis intermediários, caracterizados por flutuações globais moderadas acompanhadas de picos localizados. Em Q374H, observaram-se valores elevados entre 91-106 e 191-200, com RMSF ultrapassando 10 nm, sugerindo regiões de instabilidade conformacional restritas, mas recorrentes. O mutante Q376X exibiu comportamento semelhante, com a maioria dos resíduos em torno de 4 nm, mas com picos significativos na região 91-106 e no resíduo 97 (14 nm), o que pode indicar desordem local aumentada. Já Y454X manteve a maioria dos resíduos entre 2 e 6 nm, com flutuações acentuadas nos resíduos 95-97, 106 e 200, sugerindo instabilidades residuais pontuais possivelmente associadas à terminação prematura da cadeia polipeptídica.

3.1.4.2. Pontes de hidrogénio (H-bonds)

O número de pontes de hidrogénio intramoleculares foi analisado para cada variante da MMP20, com o objetivo de avaliar o impacto das mutações na estabilidade estrutural da proteína. As ligações de hidrogénio desempenham um papel fundamental na manutenção da estrutura tridimensional das proteínas. Assim, uma redução observada nesse número pode indicar uma menor coesão interna da cadeia polipeptídica ou alterações que afetam a organização estrutural global da molécula.

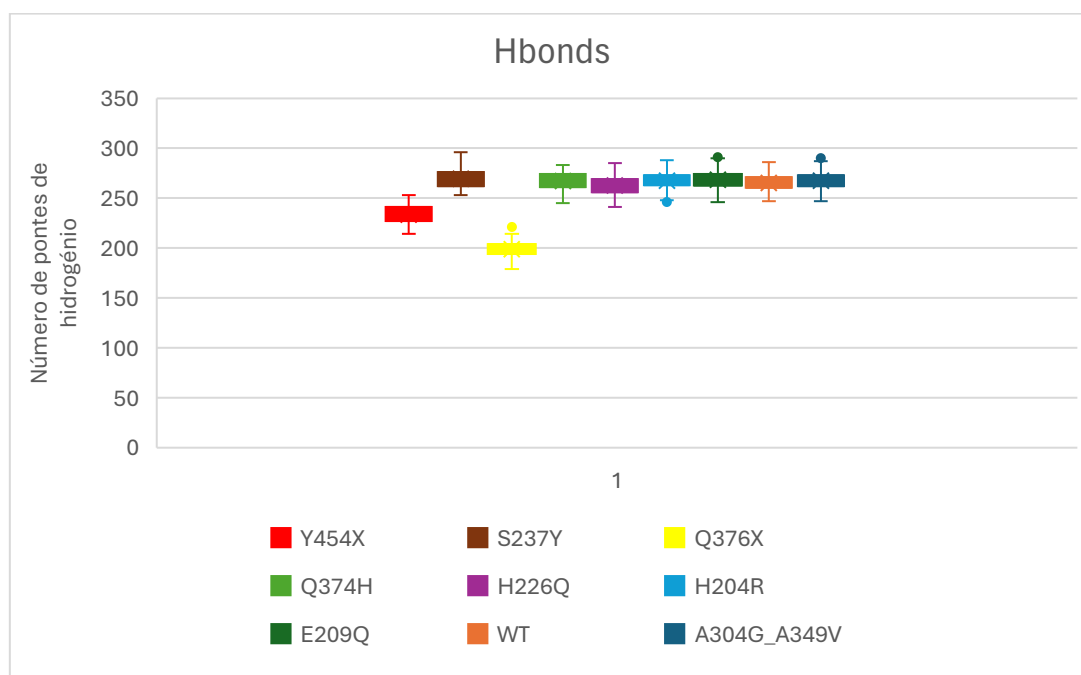
De acordo com os resultados ilustrados na Figura 5, a maioria das variantes, incluindo S237Y, E209Q, H204R, A304G_A349V e o tipo selvagem (WT), mantém um número elevado de ligações de hidrogénio, o que indica uma arquitetura global relativamente estável. Em particular, o mutante S237Y apresenta até uma tendência ligeiramente superior ao WT, o que pode refletir uma reorganização alternativa da rede de interações internas.

Por outro lado, duas variantes do tipo *nonsense*, Y454X e sobretudo Q376X, destacam-se por uma redução acentuada no número médio de ligações de hidrogénio. Esta diminuição significativa explica-se, provavelmente, pela truncagem da cadeia polipeptídica, que leva à perda de segmentos estruturais estabilizadores.

O mutante H226Q apresenta, por sua vez, uma ligeira diminuição, que poderá refletir uma instabilidade local. Estas observações evidenciam que os efeitos das mutações na estabilidade estrutural da MMP20 dependem fortemente da sua natureza (*missense* vs *nonsense*), o tipo de resíduo envolvido na substituição e, em certos casos, a sua localização na sequência da proteína.

Gráfico 4

Representação em diagrama de caixas (boxplot) do número de ligações de hidrogénio internas observadas nas simulações de dinâmica molecular para o tipo selvagem (WT) e oito variantes da proteína MMP20



3.1.4.3. Análise da superfície acessível ao solvente (SASA) global e por resíduo

A superfície acessível ao solvente (SASA) é um parâmetro fundamental para avaliar até que ponto os resíduos de uma proteína estão expostos ao meio aquoso. Permite identificar as regiões enterradas ou expostas na estrutura tridimensional, fornecendo indicações

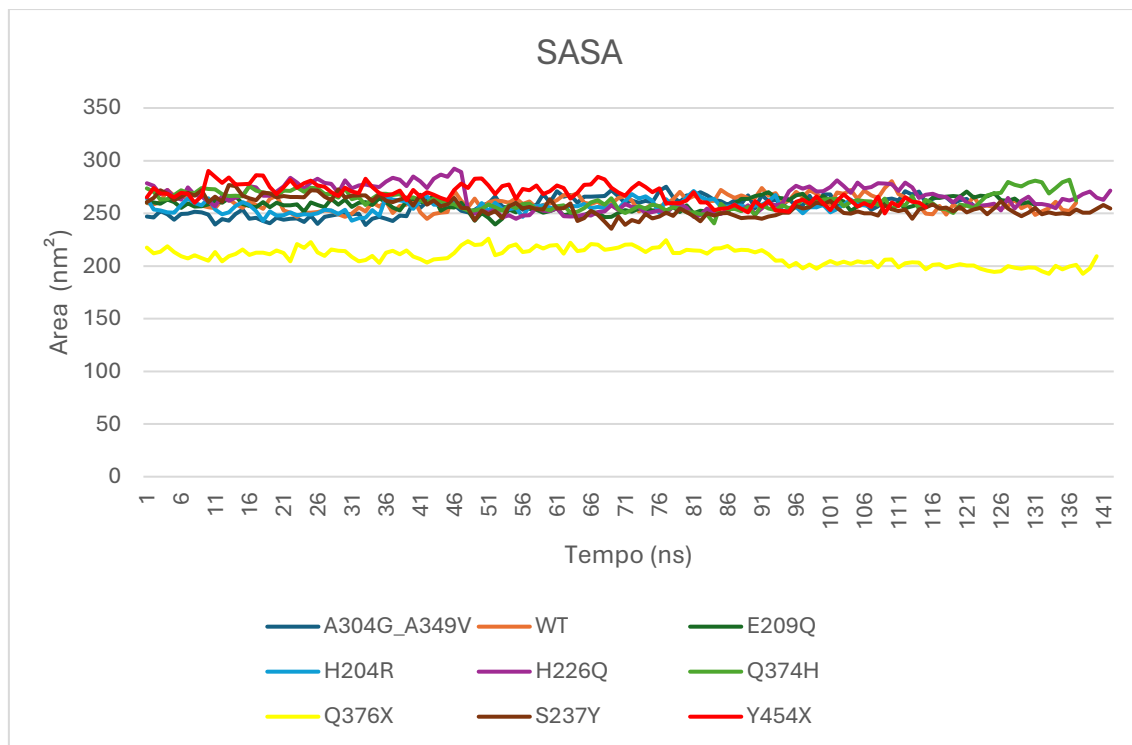
sobre a estabilidade, a compactação ou a disponibilidade dos sítios de interação. Numa análise comparativa de variantes, a SASA permite detetar alterações conformacionais associadas a mutações, que podem influenciar a função biológica ou a interação com ligantes.

Nesta secção, a análise da SASA foi realizada em dois níveis complementares. Em primeiro lugar, foi calculada a SASA global para avaliar as variações de exposição da estrutura como um todo ao longo das simulações de dinâmica molecular. Esta abordagem permite detetar alterações na compactação ou no relaxamento global da conformação. Em seguida, foi realizada uma análise por resíduo, com o objetivo de identificar com maior precisão as zonas da proteína cuja acessibilidade ao solvente é alterada, destacando resíduos potencialmente envolvidos em alterações locais ou em interações específicas.

A evolução temporal da SASA global para as diferentes variantes, representada na Figura 6, mostra que a maioria dos sistemas mantém uma SASA relativamente estável durante as simulações. Os valores médios situam-se maioritariamente entre 255 e 265 nm², refletindo uma exposição ao solvente globalmente comparável entre as diferentes estruturas. No entanto, a variante Q376X destaca-se claramente, com uma SASA inferior, com uma média de cerca de 210 nm², e uma tendência de diminuição progressiva, sugerindo uma alteração conformacional significativa. Em contraste, a variante H226Q apresenta a SASA média mais elevada (265 nm²), seguida de Q374H (262 nm²), o que indica uma ligeira abertura estrutural.

Gráfico 5

Evolução temporal da SASA global (nm²) das variantes ao longo da simulação



Para avaliar o impacto local das mutações na exposição superficial dos aminoácidos, a média da superfície acessível ao solvente (SASA) por resíduo foi comparada entre cada variante e a proteína do tipo selvagem (WT).

Importa referir que a região correspondente aos resíduos 220 a 230 apresenta, de forma consistente, valores de SASA próximos de zero, independentemente do sistema simulado, o que reflete uma zona enterrada e estruturalmente estável.

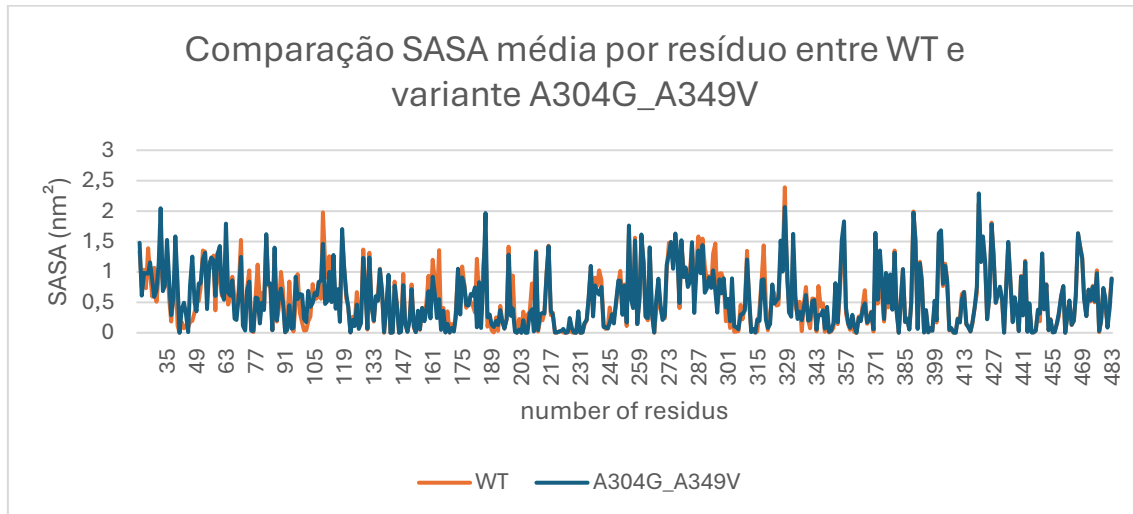
Os perfis obtidos revelam, em seguida, variações específicas para cada mutação:

A304G-A349V: O perfil de SASA do mutante é globalmente semelhante ao do WT, embora se observe um ligeiro aumento da acessibilidade ao solvente em certas regiões, nomeadamente entre os resíduos 38-86 (região do propeptídeo), 181-271 (domínio catalítico) e 351-425 (domínios hemopexina 2 e 3). Estas elevações refletem uma exposição moderadamente acrescida em segmentos centrais e C-terminais. Um pico notável é também observado em torno do resíduo 329 nas duas formas, embora mais acentuado no WT. Ao nível do resíduo 110, ambos os perfis são bastante semelhantes. Estas observações sugerem variações estruturais localizadas, mas limitadas,

possivelmente associadas aos efeitos combinados das substituições A304G e A349V.

Gráfico 6

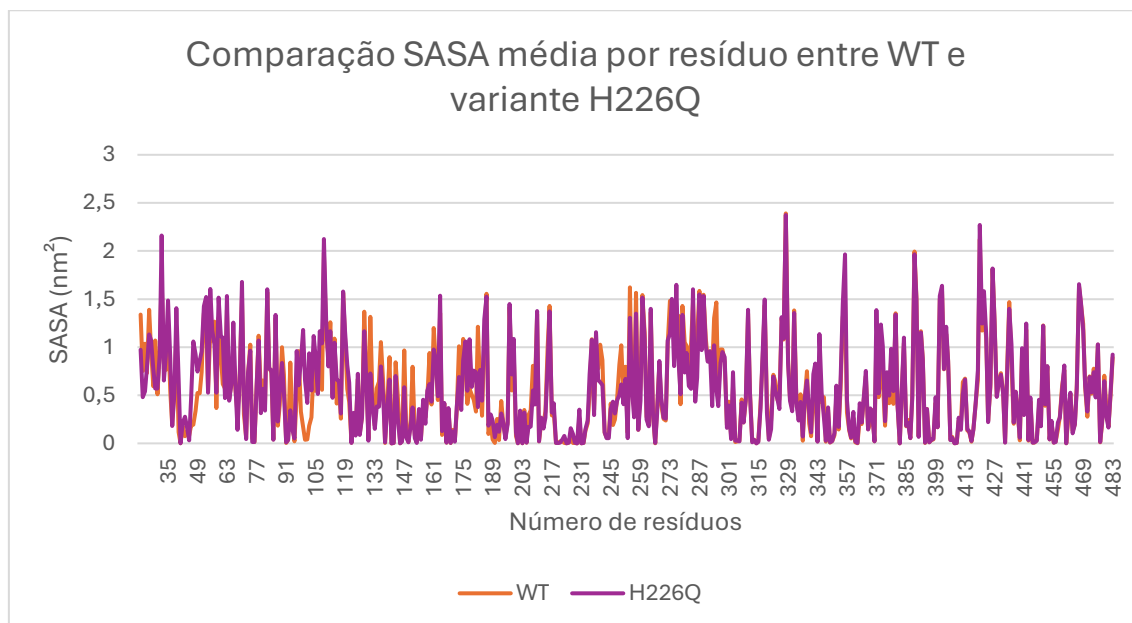
Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante dupla A304G_A349V



H226Q: O gráfico mostra uma acessibilidade ao solvente globalmente mais elevada no mutante em comparação com o tipo selvagem, em particular na metade C-terminal (resíduos 310 a 483), que engloba os quatro domínios tipo hemopexina da MMP20, responsáveis por funções de reconhecimento de substrato e interação molecular. Observam-se vários picos acentuados no mutante, nomeadamente em torno dos resíduos 327, 357, 401 e 420, refletindo uma maior exposição ao solvente nessas regiões. Por outro lado, no local exato da mutação (resíduo 226), os dois perfis são semelhantes, sem aumentos significativos. Ao contrário da variante anterior, os picos observados nos resíduos 110 e 329 apresentam valores semelhantes entre o mutante e o WT. Estes resultados sugerem que os efeitos estruturais induzidos pela mutação ocorrem à distância do local modificado, afetando preferencialmente as regiões terminais.

Gráfico 7

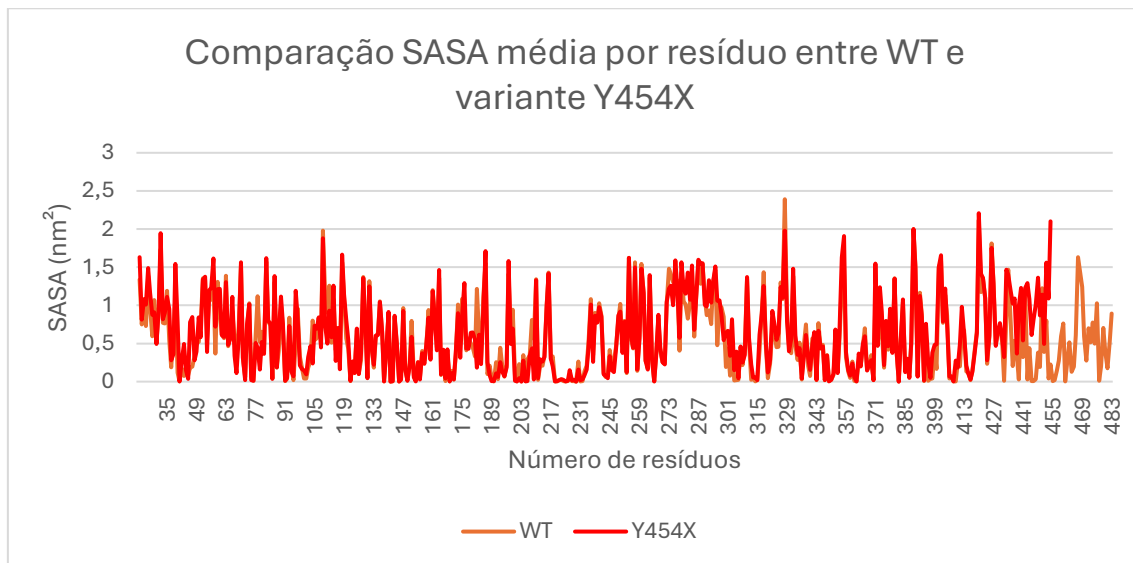
Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante H226Q



Y454X: O mutante apresenta um aumento notável da SASA média por resíduo na região 350-450, correspondente aos domínios tipo hemopexina 2 e 3, com vários picos de acessibilidade marcados, nomeadamente em torno dos resíduos 357, 390, 400 e 420. Estes aumentos refletem uma maior exposição ao solvente, provavelmente associada a uma desorganização estrutural induzida pela troncagem do C-terminal provocada pela mutação Y454X. Do ponto de vista funcional, a perda parcial dos domínios hemopexina pode comprometer a interação com o substrato ou parceiros proteicos, afetando negativamente a atividade biológica da MMP20. Por outro lado, nas regiões a montante (resíduos 22-250), o perfil de SASA permanece relativamente semelhante entre o WT e o mutante. O resíduo 110 apresenta picos semelhantes nos dois sistemas, enquanto no resíduo 329, o pico é mais acentuado no WT, indicando uma maior exposição localizada nesta posição na proteína não mutada.

Gráfico 8

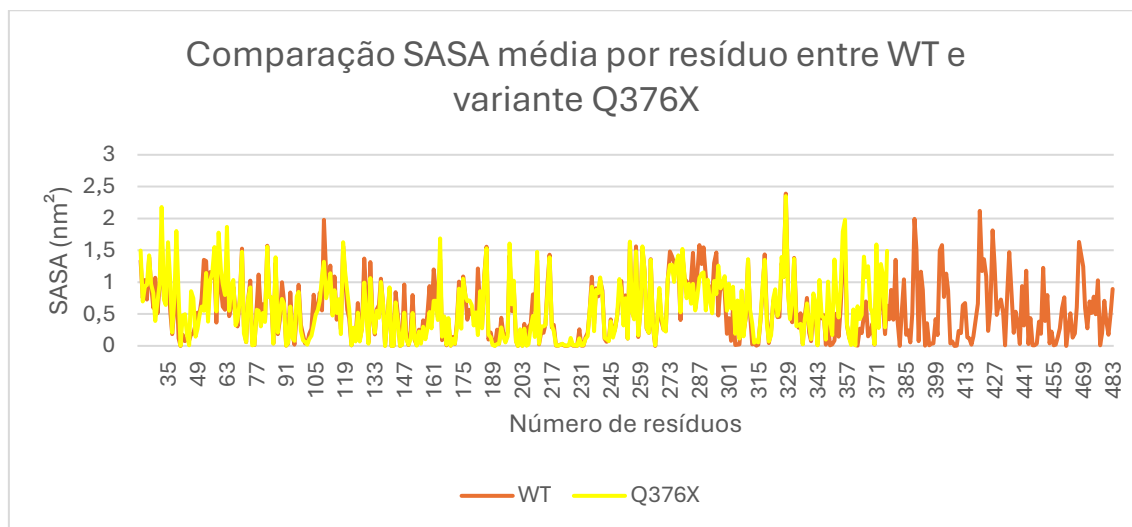
Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante Y454X



Q376X: Tal como a mutação Y454X, esta mutação do tipo *nonsense* provoca uma troncagem da proteína, neste caso ao nível do resíduo 376, o que se traduz num desaparecimento completo do perfil de SASA na região C-terminal (além do ponto de corte). A montante desta troncagem, o mutante apresenta vários picos de acessibilidade ao solvente mais elevados do que na forma selvagem, nomeadamente em torno dos resíduos 60 (região do propeptídeo), 118 e 165 (domínio catalítico) e 357 (domínio tipo hemopexina 2). Por outro lado, no resíduo 110, o WT exibe um pico de SASA claramente mais elevado do que o mutante, sugerindo uma maior exposição nesta região na proteína não truncada. Estas variações indicam uma reorganização local da estrutura e uma perda de coesão interna, provavelmente como resposta à ausência da região terminal. A perda dos domínios hemopexina pode comprometer a interação com o substrato e, assim, afetar diretamente a função enzimática da MMP20.

Gráfico 9

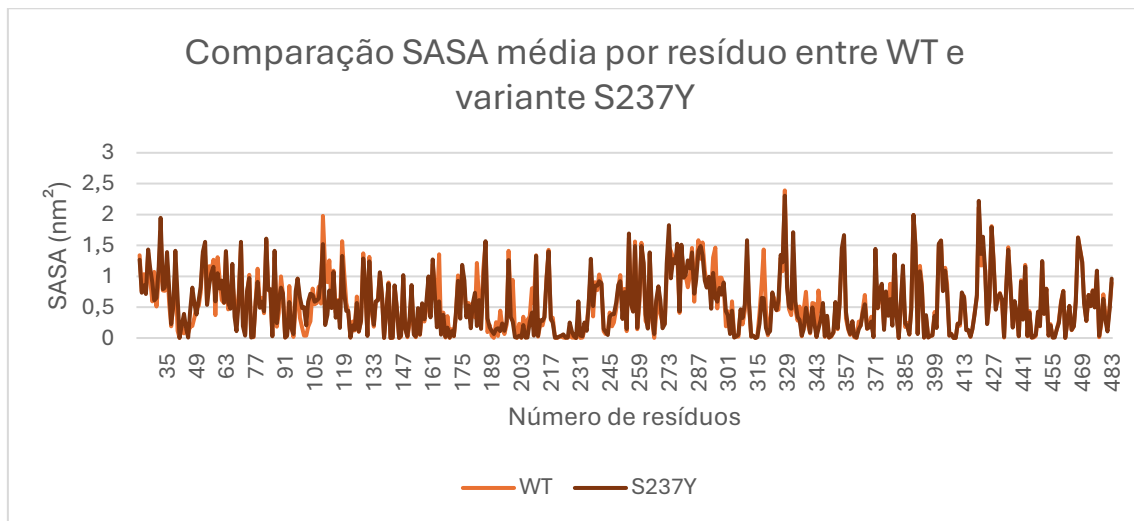
Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante Q376X



S237Y: Este mutante apresenta um perfil de SASA média por resíduo globalmente semelhante ao da forma selvagem, com algumas diferenças localizadas. Na região C-terminal (resíduos 350 a 483), correspondente aos domínios tipo hemopexina 2, 3 e 4, observam-se picos de acessibilidade ao solvente tanto no WT como no mutante, embora os resíduos 355, 389 e 420 apresentem valores ligeiramente mais elevados no mutante. Nas regiões centrais (resíduos 200-272), que correspondem ao domínio catalítico, as diferenças são discretas e pouco pronunciadas. Estes resultados indicam que a exposição ao solvente permanece, de forma geral, comparável entre os dois sistemas, com variações estruturais localizadas. No entanto, o aumento da acessibilidade em segmentos dos domínios hemopexina pode refletir uma alteração na dinâmica conformacional da extremidade C-terminal, com possível impacto na interação com o substrato, contribuindo assim para o efeito patológico associado à mutação S237Y.

Gráfico 10

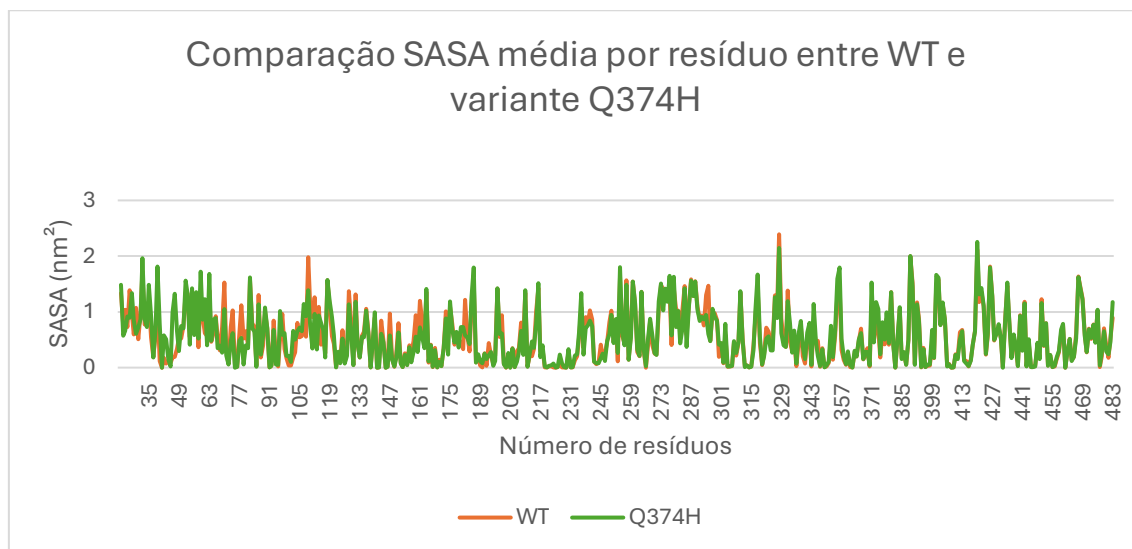
Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante S237Y



Q374H: O gráfico mostra um perfil de SASA globalmente mais elevado do que o do tipo selvagem, com picos de acessibilidade dispersos ao longo da sequência. Estas elevações são particularmente marcadas nas regiões N-terminais (resíduos 32 a 63, pertencentes ao propeptídeo), centrais (164 a 288, correspondendo ao domínio catalítico) e C-terminais, para além do resíduo 350, onde se localizam os domínios tipo hemopexina 2, 3 e 4. Observam-se picos acentuados em torno dos resíduos 355, 389, 402 e 420. Além disso, no resíduo 109, a SASA do WT é significativamente superior à do mutante, indicando uma maior exposição localizada nessa posição na proteína nativa. Estas alterações indicam uma maior exposição ao solvente em regiões funcionalmente relevantes, o que pode refletir uma modificação da dinâmica conformacional e comprometer a função catalítica ou a interação da proteína com o substrato.

Gráfico 11

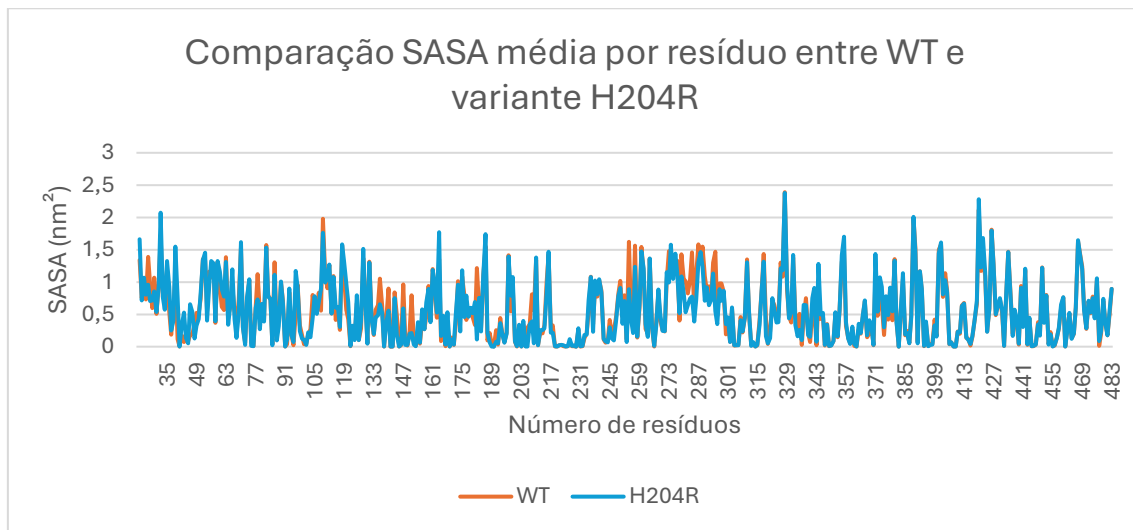
Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante Q374H



H204R: O mutante apresenta uma acessibilidade ao solvente globalmente semelhante à do tipo selvagem, mas com diferenças regionais marcantes. Entre os resíduos 112-151 e 255-294, observa-se uma diminuição da SASA em relação ao WT, o que pode refletir uma compactação localizada ou uma reorganização estrutural que reduz a exposição dessas regiões ao meio aquoso. Por outro lado, o mutante apresenta picos de acessibilidade mais elevados nos resíduos 164 e 190 (domínio catalítico), bem como na região do propeptídeo (resíduo 32), e nos domínios hemopexina 2, 3 e 4 (resíduos 355, 389, 420 e 468). Estes aumentos localizados sugerem zonas de maior flexibilidade ou desorganização estrutural, possivelmente associadas a alterações na dinâmica conformacional induzidas pela mutação. No local da mutação (resíduo 204), os perfis de SASA do mutante e do WT são praticamente idênticos, indicando que os efeitos estruturais se manifestam principalmente à distância.

Gráfico 12

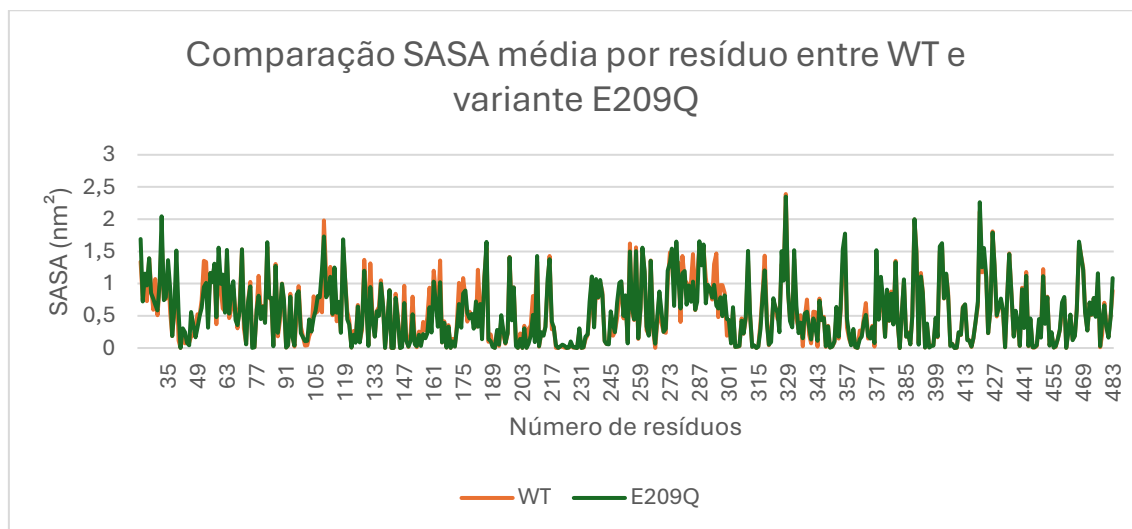
Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante H204R



E209Q: O mutante apresenta um perfil de acessibilidade ao solvente globalmente semelhante ao da forma selvagem, com algumas diferenças regionais. Entre os resíduos 112 e 180, observa-se uma redução consistente da SASA em comparação com o WT, o que pode refletir uma compactação localizada ou uma diminuição da flexibilidade nessa região. Por outro lado, o mutante exibe picos de acessibilidade superiores ao WT nos resíduos 32, 63, 70 e 82, todos pertencentes ao propeptídeo, sugerindo uma maior exposição ao solvente na porção N-terminal. Na região C-terminal, os resíduos 355, 389 e 420 (domínios tipo hemopexina 2, 3 e 4) também apresentam valores mais elevados de SASA, indicando alterações estruturais pontuais nessas zonas. No local da mutação (resíduo 209), os perfis de SASA do mutante e do tipo selvagem permanecem semelhantes, o que sugere que os efeitos desta substituição se manifestam predominantemente à distância. Do ponto de vista funcional, estas alterações podem influenciar a maturação da proteína (via exposição do propeptídeo) e afetar a estabilidade ou acessibilidade dos domínios envolvidos na ligação ao substrato.

Gráfico 13

Comparação da SASA média por resíduo entre a proteína MMP20 do tipo selvagem (WT) e a variante E209Q



Estes resultados sugerem diferenças de comportamento estrutural global entre as variantes, nomeadamente em termos de compactação ou de acessibilidade ao solvente, cujas implicações funcionais serão exploradas na secção de discussão.

3.2. Docking molecular: avaliação das interações entre ligante e MMP20

3.2.1. Objetivo do docking molecular

O *docking* molecular é um método de modelagem *in silico* que permite antecipar a capacidade de uma molécula interagir com uma proteína-alvo, avaliando a estabilidade, a orientação e a afinidade dos complexos formados. Trata-se de uma ferramenta central no desenho racional de fármacos, especialmente para estudar o reconhecimento molecular entre enzimas e ligantes (Meng et al., 2011).

Neste estudo, a *docking* foi utilizada para explorar o impacto das mutações identificadas na capacidade da MMP20, tanto na forma selvagem quanto nas variantes mutadas, de interagir com um ligante modelo, com foco no sítio catalítico. Essa estratégia complementa as análises de dinâmica molecular e permite investigar a persistência ou a perda da função enzimática associada às diferentes variantes.

O objetivo é avaliar se certas mutações afetam a acessibilidade ou a afinidade de ligação

do sítio ativo. Por outro lado, pretende-se identificar as variantes para as quais uma interação estável com um ligante continua sendo possível. Esta abordagem visa lançar as bases para uma futura triagem virtual, numa perspetiva de medicina de precisão, com vista a uma eventual correção funcional por meio de pequenas moléculas direcionadas.

Além disso, o bolso S1 do domínio catalítico da MMP20 desempenha um papel central no reconhecimento e na especificidade dos seus substratos. Esta cavidade, localizada próxima ao zinco catalítico, forma um ambiente hidrofóbico e espacialmente restrito, que facilita a ligação seletiva aos resíduos do substrato. De acordo com o estudo de Turk et al. (2006), a forma, a polaridade e a profundidade deste bolso determinam, em grande parte, o perfil de clivagem da MMP20. Assim, qualquer alteração estrutural, mesmo distante, que possa modificar a geometria ou a dinâmica do bolso S1 pode comprometer a capacidade da enzima de reconhecer eficazmente os seus alvos fisiológicos.

3.2.2. Ligantes selecionados

No âmbito deste estudo, uma vez que até o momento nenhum ligante ativador da MMP20 foi identificado na literatura, focámos a análise em compostos com potencial inibitório. O objetivo é avaliar em que medida as mutações na MMP20 afetam a acessibilidade do seu sítio catalítico. Para isso, vários inibidores foram selecionados para o *docking*. Entre eles, apenas o NNGH está referenciado como inibidor direto da MMP20 nas bases de dados especializadas (PubChem, ChEMBL, DrugBank). Este composto está presente na estrutura tridimensional 2JSD, obtida por espectroscopia de RMN e depositada no *Protein Data Bank*, o que fornece uma referência experimental clara sobre a sua interação com o sítio catalítico da enzima. Os demais ligantes foram escolhidos pela sua capacidade reconhecida de se ligarem a outras MMPs, na hipótese de que poderiam interagir de forma semelhante com a MMP20.

A lista dos ligantes selecionados no âmbito deste estudo é apresentada abaixo:

O NNGH (*N-Isobutyl-N-[4-methoxyphenylsulfonyl]glycyl hydroxamic acid*) atua por quelação do íon zinco presente no sítio catalítico, conforme demonstrado em diversos estudos enzimáticos, com uma constante de inibição (K_i) da ordem de 17 nM para a MMP20 (Arendt et al, 2007). Este composto representa, portanto, uma molécula de referência essencial na avaliação da funcionalidade catalítica residual dos mutantes.

GM6001 (Ilomastat) é um inibidor hidroxamato de amplo espectro, amplamente utilizado

para bloquear a atividade das metaloproteinases da matriz. Atua por meio da quelação do íon zinco presente no sítio catalítico, um mecanismo comum a muitas MMPs. A sua eficácia foi demonstrada em várias isoformas, nomeadamente MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 e MMP-9, em diversos modelos biológicos (Mirastschijski et al, 2004). Devido à sua elevada afinidade pelo domínio catalítico partilhado por estas enzimas, o GM6001 foi selecionado neste estudo como um bom potencial inibidor.

Batimastat (BB-94) foi um dos primeiros inibidores sintéticos de MMPs desenvolvidos para uso terapêutico. Liga-se ao sítio catalítico por meio do seu grupo hidroxamato e demonstrou elevada afinidade por várias MMPs, nomeadamente MMP-2 e MMP-9. Estudos funcionais mostraram que pode inibir a atividade enzimática dessas proteínas in vitro, impedindo, entre outras ações, a degradação tecidual induzida pela sua ativação (Pollitt et al, 1998). Este perfil farmacológico torna o batimastat um inibidor relevante para testar a acessibilidade estrutural do sítio ativo da MMP20.

Marimastat, um derivado de administração oralmente biodisponível do batimastat, apresenta um espectro de inibição semelhante, com eficácia demonstrada contra as MMP-2, MMP-9 e MMP-13. Foi amplamente utilizado em ensaios clínicos para o tratamento de cancro invasivos, o que reforça a sua relevância como potencial inibidor para MMPs menos bem caracterizadas, como a MMP20 (Whittaker et al, 1999).

SB-3CT é um inibidor seletivo das MMPs (MMP-2 e MMP-9). Embora apresente alguma atividade residual sobre MMP 1, MMP 3 e MMP 7, essa atividade é considerada fraca. Liga-se ao sítio catalítico após ativação enzimática, o que lhe confere uma especificidade única. O seu mecanismo de ação, baseado na interação com o zinco catalítico e numa estrutura rígida, torna-o um candidato ideal para explorar a capacidade da MMP20 de interagir com inibidores de conformação estável e pouca flexibilidade (Brown et al, 2000).

Doxiciclina-d6 é um derivado deuteriado da doxiciclina, um antibiótico tetracíclico conhecido pelas suas propriedades inibitórias sobre as MMPs, independentemente da sua atividade antimicrobiana. Essa inibição, demonstrada especialmente sobre as MMP-2 e MMP-9, ocorre por meio da quelação do íon zinco no sítio catalítico (Golub et al, 1995). A forma deuteriada apresenta maior estabilidade metabólica, o que a torna uma ferramenta relevante para avaliar o potencial de interação com o sítio ativo da MMP20.

A curcumina é um polifenol natural extraído do *Curcuma longa*, amplamente estudado

pelos seus efeitos anti-inflamatórios e anticancerígenos. Estudos mostraram que ela pode modular a expressão de diversas metaloproteinases, incluindo MMP-2 e MMP-9, através da regulação de vias de sinalização intracelular associadas à transcrição gênica (Hassan & Daghestani, 2012). No entanto, este efeito parece ocorrer de forma indireta, não envolvendo uma interação direta com os sítios catalíticos destas enzimas. Assim, o uso da curcumina como potencial inibidor direto da MMP20 permanece especulativo, sendo considerada neste estudo apenas como uma molécula de origem natural com estrutura química compatível com processos de *docking* exploratória.

A minociclina é um antibiótico tetracíclico semissintético conhecido pelas suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Em um estudo clínico envolvendo pacientes com hemorragia intracerebral, observou-se uma redução nos níveis circulantes de MMP-9 após o tratamento com minociclina (Chang et al, 2017). No entanto, este efeito parece resultar de mecanismos indiretos, como a modulação da expressão da enzima, e não de uma interação direta com o sítio catalítico. Por essa razão, a minociclina foi incluída neste estudo apenas como um modelo estrutural baseado em tetraciclinas, com o objetivo de avaliar teoricamente sua afinidade potencial com a MMP20.

A andrografolida é uma lactona do tipo diterpeno extraída da *Andrographis paniculata*, conhecida pelos seus efeitos anti-inflamatórios e antitumorais. Foi demonstrado que inibe a expressão da MMP-9 em células monocíticas humanas (THP-1), por meio da supressão da ativação do NF- κ B (Lee et al., 2012). No entanto, não existem evidências de que interaja diretamente com a MMP20 ou com o seu sítio catalítico. Assim, a andrografolida foi considerada neste estudo apenas como uma molécula natural estruturalmente interessante para análise exploratória *in silico*, com o objetivo de avaliar a sua possível afinidade teórica com a MMP20.

3.2.3. Análise das interações ligante-proteína: abordagem visual e computacional

Para garantir uma comparação consistente entre os diferentes sistemas, foi selecionada, para cada ligante testado, a pose com base em dois critérios: a energia de ligação prevista (mais negativa) e a distância entre o ligante e o íon de zinco catalítico, considerando que este último desempenha um papel essencial na atividade enzimática da MMP20. Esta abordagem permite uma escolha mais realista das conformações com potencial de interação funcional.

As informações relativas às energias de ligação, às distâncias ao zinco catalítico e a pose selecionada para cada sistema estão organizadas em tabelas no Anexo B. Os resíduos e os iões envolvidos nas interações com os ligantes encontram-se compilados em tabelas específicas no Anexo C.

Com o objetivo de reforçar a clareza das comparações visuais, o íon de zinco catalítico foi sistematicamente destacado na cor *hotpink* em todas as representações estruturais. Esse destaque facilita a identificação espacial do centro ativo da MMP20 e das potenciais interações com os ligantes. Todas as representações tridimensionais encontram-se reunidas no Anexo D.

3.2.3.1. NNGH

3.2.3.1.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância entre o ligante e o íon de zinco na pose selecionada foi de 0,17 nm. A média e padrão desvio das três poses foi de $0,91 \pm 0,65$ nm, indicando uma variabilidade conformacional importante entre as diferentes conformações analisadas. A análise BINANA confirmou interações com H236, E59, D104 e com o íon de zinco catalítico. O ligante encontra-se centralizado e bem orientado no sítio ativo, com todos os elementos necessários à interação funcional preservados, o que confirma a eficácia inibitória do NNGH neste sistema.

No sistema A304G-A349V, a distância da pose escolhida foi de 0,21 nm, com média e padrão desvio de $0,81 \pm 0,77$ nm, também revelando uma variabilidade considerável entre as poses. Foram observadas interações com P246, D104, K249 e o íon de zinco catalítico. O ligante está bem posicionado e orientado no centro da cavidade catalítica, sugerindo que, apesar da mutação dupla, a estrutura funcional do sítio ativo permanece compatível com a inibição.

No mutante E209Q, a distância foi de 0,17 nm, com média e padrão desvio de $0,33 \pm 0,27$ nm, o que indica uma baixa variabilidade entre as poses e maior estabilidade da interação. As interações envolvem R99, C100, H226, V102, Y248 e o íon de zinco catalítico. A orientação do ligante manteve-se correta e centralizada, indicando que a substituição não compromete a coordenação metálica nem os contatos essenciais, mantendo o potencial inibitório.

Para H204R, a distância ao ião foi de 0,23 nm, com média e padrão desvio de $0,63 \pm 0,46$ nm, o que sugere uma variabilidade moderada. Foram identificadas interações com L234, H236 e D104 porém sem coordenação com o ião de zinco catalítico. Apesar da boa orientação, a ausência de coordenação indica que a mutação pode prejudicar a eficácia da inibição.

No sistema H226Q, a distância entre o ligante e o ião de zinco na pose selecionada foi de 3.10 nm, com média e desvio padrão de $3,12 \pm 1,38$ nm, refletindo uma elevada dispersão entre as poses. Nenhuma interação com o ião de zinco foi detetada, embora o ligante estabeleça contatos com os resíduos H236, F111, Y108, N107 e A192. Esta configuração sugere que o NNGH permanece bem inserido na cavidade catalítica, mas que o ião de zinco foi deslocado para fora do centro funcional devido à mutação. A consequência é uma perda da geometria catalítica essencial à coordenação metálica, comprometendo severamente a capacidade de inibição do ligante neste sistema.

No sistema Q374H, a distância da pose selecionada foi de 0,19 nm, com média e padrão desvio de $0,65 \pm 0,44$ nm, indicando uma variação moderada entre as conformações. BINANA revelou interações com L189, A190, E227 e o ião de zinco catalítico. O ligante apresenta-se corretamente orientado e bem inserido no centro da cavidade. A mutação Q374H não impede a ligação efetiva do NNGH, mantendo o potencial inibitório.

Para o sistema Q376X, a distância foi de 0,24 nm, com média e padrão desvio de $0,28 \pm 0,12$ nm, revelando uma baixa variabilidade entre as poses. Foram observadas interações com C100, H226, D104, R99, K249 e o ião de zinco. O ligante está corretamente centralizado e orientado. Apesar da troncagem, a manutenção dos contatos chave confirma que o sítio catalítico permanece funcional e acessível ao inibidor.

Em S237Y, a distância ao ião foi de 0,18 nm, com média e padrão desvio de $0,28 \pm 0,19$ nm, o que também demonstra estabilidade entre as poses. BINANA identificou interações com N107, A192 e o ião de zinco catalítico. O ligante encontra-se bem inserido na cavidade, em conformação central e estável. A mutação não compromete a ligação funcional ao sítio catalítico.

No sistema Y454X, a distância foi de 0,17 nm, com média e padrão desvio de $0,43 \pm 0,23$ nm, indicando uma ligeira variabilidade entre as poses. As interações observadas incluem H230, L234 e o ião de zinco. O ligante está corretamente orientado e inserido. Mesmo com a troncagem, a capacidade inibitória do NNGH parece preservada.

3.2.3.1.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

Na estrutura 2JSD, o ligante NNGH interage com o íon de zinco catalítico, situado a 0,22 nm de distância, o que indica uma coordenação direta ao centro ativo. Além do zinco, o ligante está envolvido em interações com vários resíduos conservados importantes para a função enzimática, incluindo T188, L189, A190, V223, H226, H236, P246, Y248 e K249.

Entre os sistemas modelados por *docking*, os sistemas WT, A304G-A349V, E209Q, Q374H, Q376X e Y454X apresentaram distâncias semelhantes ou inferiores ao valor observado na estrutura de referência 2JSD, com coordenação direta ao íon de zinco catalítico e interações com vários resíduos conservados, como H236, Y248, K249, H226, A190, L189, D104 ou P246. Apesar da variabilidade conformacional observada entre as diferentes poses dentro de cada variante ser de moderada a alta em alguns casos, a presença de interações críticas e distâncias compatíveis com o modelo de referência sugere que o NNGH pode estabelecer um modo de ligação funcional semelhante ao observado na estrutura 2JSD, sustentando um potencial inibitório consistente nesses sistemas.

Na variante S237Y, apesar da coordenação direta ao íon de zinco e da boa estabilidade conformacional observada entre as poses, nenhum dos resíduos interagentes está em comum com os identificados no modelo de referência. A ausência de contatos com elementos estruturais conservados limita a convergência funcional com o estado experimental. Embora o ligante mantenha uma boa orientação e coordenação ao zinco, essa falta de interações com resíduos-chave da 2JSD pode comprometer a eficácia inibitória do NNGH nesta variante.

Nas variantes H204R e H226Q, não foi identificada coordenação metálica com o íon de zinco, apesar da distância reduzida observada em H204R. Em ambos os casos, o único resíduo conservado em comum com a estrutura de referência é o H236, indicando uma recuperação apenas parcial do núcleo funcional. A ausência de outros contatos essenciais do sítio ativo e da coordenação ao metal indica uma divergência em relação ao modo de ligação observado na 2JSD. Esses dados sugerem uma baixa compatibilidade funcional do NNGH com o centro ativo nestes sistemas, o que pode comprometer seu potencial inibitório.

3.2.3.2. SB-3CT

3.2.3.2.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância entre o ligante e o íon de zinco na pose selecionada foi de 0,69 nm, com média e desvio padrão de $0,98 \pm 0,30$ nm, indicando uma variabilidade moderada entre as poses. As interações identificadas foram com os resíduos R99, K47 e Y44, sem contato com o íon de zinco. O ligante está deslocado em relação ao centro do sítio ativo, o que pode comprometer a eficácia da inibição neste sistema selvagem.

No sistema A304G-A349V, a distância da pose escolhida foi de 0,18 nm, com média e desvio padrão de $0,66 \pm 0,80$ nm, refletindo uma alta variabilidade conformacional entre as poses. BINANA apontou interações com Y248, L189 e o íon de zinco catalítico, sugerindo um posicionamento funcionalmente adequado. O ligante encontra-se corretamente orientado no centro da cavidade, o que indica um potencial inibitório relevante, apesar da instabilidade entre poses.

No mutante E209Q, a distância foi de 0,19 nm, com média e desvio padrão de $0,40 \pm 0,27$ nm, indicando uma variabilidade relativamente baixa, com poses consistentes. Foram identificadas interações com R99, H226 e o íon de zinco catalítico. O SB-3CT está bem inserido e orientado no centro ativo, e a mutação parece não comprometer a interação com os elementos funcionais do sítio catalítico. Este perfil sugere uma ligação funcional estável e compatível com a geometria do sítio ativo.

Para H204R, a pose selecionada apresentou uma distância de 0,39 nm, com média e desvio padrão de $1,32 \pm 0,92$ nm, revelando uma elevada dispersão entre as poses. BINANA indicou interações com o íon de zinco catalítico e com V105, mas a ausência de outros resíduos chave e a variabilidade conformacional sugerem um modo de ligação instável e possivelmente menos eficaz.

No sistema H226Q, a distância da pose escolhida foi de 3,38 nm, com média e desvio padrão de $3,46 \pm 0,37$ nm, o que representa um afastamento sistemático e consistente entre o ligante e o íon de zinco. A análise estrutural indica que essa separação se deve a um deslocamento do próprio íon catalítico, provocado pela mutação, e não à má orientação do ligante. Foram observadas interações apenas com K249 e L189, sem qualquer contato com o metal. O SB-3CT permanece no sítio catalítico, mas não consegue estabelecer coordenação funcional, o que indica uma perda significativa da capacidade inibitória neste sistema.

No caso de Q374H, a distância foi de 0,68 nm, com média e desvio padrão de $0,92 \pm 0,28$ nm, o que indica uma variabilidade moderada entre as poses. As interações detetadas incluíram Y108, R109, L110, F111 e V105, sem contato com o íão de zinco catalítico. O ligante encontra-se localizado na extremidade do sítio ativo, o que impede a coordenação com o metal. A ausência do íão de zinco funcional, juntamente com a falta de resíduos catalíticos essenciais, compromete a eficácia inibitória do SB-3CT neste sistema.

No sistema Q376X, a distância ao íão foi de 0,18 nm, com média e desvio padrão de $0,63 \pm 0,43$ nm, refletindo uma variabilidade moderada entre as poses. BINANA confirmou interações com C100, H226, K249 e o íão de zinco catalítico. O ligante encontra-se bem orientado e próximo do centro catalítico, sugerindo que a troncagem estrutural não compromete a ligação do SB-3CT.

Em S237Y, a distância da pose selecionada foi de 0,55 nm, com média e desvio padrão de $0,54 \pm 0,07$ nm, indicando uma excelente consistência conformacional entre as poses. Não foram identificadas interações relevantes com BINANA para este sistema, o que pode refletir uma orientação periférica do ligante, mesmo com distância razoável ao zinco.

Por fim, em Y454X, a distância da pose escolhida foi de 0,70 nm, com média e desvio padrão de $1,11 \pm 0,51$ nm, o que revela uma variabilidade elevada entre as poses. BINANA identificou interações com V105 e H236, mas não com o íão de zinco. A posição do ligante é funcionalmente desfavorável, com inserção incompleta no centro ativo.

3.2.3.2.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

As variantes A304G-A349V, E209Q e Q376X apresentaram coordenação direta com o íão de zinco, com distâncias semelhantes ou inferiores à observada na 2JSD. Nessas variantes, também foram identificadas interações com resíduos catalíticos conservados, como H226, H236, Y248 e K249. Os valores de desvio padrão foram moderados ou baixos, refletindo uma boa estabilidade conformacional entre as poses, e o ligante encontra-se centralizado e bem orientado no sítio ativo. Esses resultados indicam que o SB-3CT poderia assumir um modo de ligação funcional semelhante ao observado na estrutura de referência, sugerindo um potencial inibitório relevante nesses sistemas.

A variante H204R apresentou coordenação ao íão de zinco, mas com distância mais elevada do que a observada na 2JSD, e sem interações com os resíduos conservados da

estrutura experimental. Além disso, a variabilidade conformacional entre as poses foi alta. Embora o ligante esteja próximo do zinco, a ausência de contatos estruturais relevantes observados na 2JSD limita a plausibilidade funcional desta ligação.

Nos sistemas WT, Q374H, S237Y e Y454X, não foi observada coordenação metálica com o íon de zinco. As distâncias foram maiores e, nas interações residuais, não foram recuperados os resíduos-chave do modelo experimental. A orientação do ligante foi frequentemente não ótima ou deslocada, e os valores de desvio padrão variaram de moderados a elevados, indicando instabilidade conformacional. Esses dados sugerem que o SB-3CT apresenta baixa compatibilidade com esses sistemas, por não reproduzirem os elementos essenciais do modo de ligação observado na estrutura 2JSD.

No sistema H226Q, não foi observada coordenação com o íon de zinco, e os resíduos centrais presentes na 2JSD não estão envolvidos nas interações. O ligante permanece na cavidade catalítica, mas o deslocamento do zinco provocado pela mutação compromete a geometria funcional do centro ativo. Essa reorganização inviabiliza a ligação funcional do SB-3CT neste sistema, tornando-o incompatível com o modo de interação descrito na 2JSD.

3.2.3.3. Minociclina

3.2.3.3.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância ao íon de zinco foi de 0,16 nm, com média e desvio padrão de $0,31 \pm 0,26$ nm, indicando uma variabilidade moderada entre as poses. BINANA identificou interações com S237, M244, H226, H236, A235 e com o íon de zinco catalítico. O ligante está centrado na cavidade catalítica e corretamente orientado. Essas características sugerem um potencial inibitório favorável neste sistema.

Na variante A304G-A349V, a distância da pose escolhida foi de 0,86 nm, com média e desvio de $1,18 \pm 0,51$ nm, indicando uma alta variabilidade conformacional. As interações ocorreram com Y180, A192 e com o íon de zinco estrutural, mas não com o catalítico. A localização do ligante encontra-se fora do centro funcional esperado. Esse padrão indica uma ligação limitada e possivelmente não funcional.

Em E209Q, a distância foi de 0,17 nm, com média e desvio de $0,40 \pm 0,35$ nm, refletindo uma variabilidade aceitável entre as poses. As interações incluíram C100, Y245 e o íon

de zinco catalítico, com uma posição do ligante compatível com o centro ativo. O ligante permanece bem posicionado, com potencial inibitório preservado.

No sistema H204R, a distância foi de 0,57 nm, com média e desvio de $0,89 \pm 0,55$ nm, indicando uma alta dispersão entre as poses. Foram identificadas interações com F111, A194 e G113, sem contato com o íon de zinco. A conformação do ligante está deslocada e desalinhada com os elementos estruturais do sítio ativo. Isso sugere um potencial inibitório reduzido.

No sistema H226Q, a distância entre o ligante e o íon de zinco foi de 2,93 nm, com média e desvio padrão de $3,51 \pm 0,59$ nm, refletindo um afastamento sistemático. BINANA revelou interações com A192, Y108, A190, E227 e Y180, todos localizados na região catalítica. O ligante encontra-se corretamente posicionado no sítio ativo, mas não estabelece coordenação com o íon de zinco, que se encontra deslocado devido à mutação. Essa reorganização prejudica a geometria catalítica essencial, comprometendo a capacidade inibitória da minociclina neste sistema.

Para Q374H, a distância foi de 0,78 nm, com média e desvio de $1,07 \pm 0,60$ nm, indicando uma variabilidade elevada entre as poses. As interações detetadas foram com N107, V105, A194, Y108, F111, G113, mas sem coordenação metálica. A orientação espacial do ligante está desalinhada com a região funcional. Esse cenário não permite uma ligação eficaz ao sítio catalítico.

Na variante Q376X, a distância observada foi de 0,52 nm, com média e desvio de $0,78 \pm 0,22$ nm, revelando variabilidade moderada. As interações ocorreram com V105, P103, A194 e G200, sem presença do íon de zinco catalítico. O ligante está deslocado em relação ao centro funcional. Essas condições sugerem um modo de ligação pouco eficiente.

No sistema S237Y, a distância ao íon foi de 0,19 nm, com média e desvio de $0,49 \pm 0,32$ nm, indicando uma variabilidade moderada entre as poses. Foram identificadas interações com D104, H236, Y237, M244 e o íon de zinco catalítico. A orientação da minociclina é central e bem posicionada. Esse perfil é compatível com uma ligação funcional e potencial inibitório mantido.

Em Y454X, a distância foi de 0,68 nm, com média e desvio de $0,72 \pm 0,21$ nm, sugerindo uma variabilidade moderada. As interações incluíram R109, L110, N107, T50 e H230, sem envolvimento do íon catalítico. O ligante encontra-se afastado do centro funcional. A ausência de coordenação metálica reduz a probabilidade de interação eficaz neste

sistema.

3.2.3.3.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

Entre os sistemas analisados, as variantes WT e S237Y apresentam distâncias muito próximas ou inferiores ao valor observado na 2JSD, com coordenação direta com o íon de zinco catalítico. Ambas compartilham interações com resíduos conservados da estrutura experimental, como H226, H236 e apresentam variabilidade moderada entre as poses. A orientação da minociclina nesses sistemas é compatível com a topologia funcional da enzima, sugerindo um modo de ligação plausível e potencial inibitório preservado em relação ao modelo de referência.

Na variante E209Q, também se observa coordenação eficaz ao íon de zinco e uma boa inserção no centro ativo, embora com um padrão de interação distinto. Ainda assim, a geometria do ligante permanece adequada, o que pode refletir um modo de ligação funcional alternativo ao observado na 2JSD, mas ainda compatível com a inibição da enzima.

A variante H226Q representa um caso particular, a minociclina permanece corretamente posicionada na região catalítica, mas o íon de zinco catalítico encontra-se deslocado devido à mutação, inviabilizando qualquer coordenação metálica. Mesmo com interações locais na cavidade, a desorganização do centro funcional torna o modo de ligação incompatível com o observado na estrutura de referência, comprometendo o potencial inibitório da minociclina neste sistema.

As variantes Q374H, Q376X, Y454X, A304G-A349V e H204R mostram distâncias mais elevadas e não apresentam coordenação metálica com o zinco. Nessas variantes, os resíduos em comum com a 2JSD não estão envolvidos na interação, e o ligante encontra-se deslocado ou mal orientado. Além disso, os valores de desvio padrão geralmente elevados indicam instabilidade conformacional entre as poses. Esse conjunto de evidências aponta para uma baixa compatibilidade da minociclina com a geometria funcional do sítio ativo nesses sistemas, tornando improvável uma interação inibitória eficaz.

3.2.3.4. Marimastat

3.2.3.4.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância ao íão de zinco foi de 0,18 nm, com média e desvio padrão de $0,53 \pm 0,61$ nm, indicando uma alta variabilidade entre as poses. BINANA revelou interações com D104, M244, H226 e o íão de zinco catalítico. O ligante está centralizado e bem orientado no sítio ativo. Este perfil sugere uma ligação plausível e compatível com a inibição funcional.

Na variante A304G-A349V, a distância foi de 0,26 nm, com média e desvio de $0,67 \pm 0,77$ nm, refletindo uma alta dispersão conformacional. Foram identificadas interações com G101, P246, Y248, G187 e R99 mas não há evidência de coordenação com o íão de zinco catalítico. A orientação do ligante parece menos estável em relação ao centro catalítico. Essa configuração reduz a probabilidade de uma ligação eficaz.

Em E209Q, a distância foi de 0,17 nm, com média e desvio de $0,73 \pm 0,52$ nm, indicando moderada variabilidade conformacional. BINANA identificou coordenação com o íão de zinco catalítico e interações com Y248, R99, C100 e H226. O posicionamento do ligante permanece coerente com o sítio funcional. Este padrão é compatível com uma ligação funcionalmente viável.

No sistema H204R, a distância foi de 1,55 nm, com média e desvio de $1,65 \pm 0,28$ nm, revelando uma baixa variabilidade, mas um afastamento considerável do centro catalítico. Foram observadas interações com P195, E197, K116, P112, Y108 e G113, sem coordenação com o íão de zinco catalítico. A posição do ligante compromete fortemente seu potencial inibitório.

Na variante H226Q, a distância entre o ligante e o íão de zinco foi de 4,21 nm, com média e desvio de $4,27 \pm 0,88$ nm, refletindo um afastamento sistemático em todas as poses. Esse distanciamento decorre do deslocamento do íão de zinco catalítico para fora do centro ativo, provocado pela mutação. Não foi observada coordenação metálica. As interações ocorreram com Q226, Y245, P246, L189, A190, H230, K249. Apesar de o ligante permanecer na cavidade, a ausência de coordenação ao metal e a desorganização do centro funcional comprometem a plausibilidade de uma ligação inibitória eficaz neste sistema.

Na variante Q374H, a distância ao zinco foi de 0,18 nm, com média e desvio de $0,63 \pm 0,50$ nm, mostrando variabilidade moderada. BINANA revelou coordenação ao zinco

catalítico e interações com C100, R99, D104 e A190. O modo de ligação observado é compatível com a geometria funcional do centro ativo.

Em Q376X, a distância foi de 0,17 nm, com média e desvio de $0,41 \pm 0,24$ nm, refletindo boa consistência entre as poses. As interações incluíram o íon de zinco catalítico, P246, Y245, K249 e M244. O ligante encontra-se bem orientado e com potencial inibitório relevante.

Para S237Y, a distância foi de 0,16 nm, com média e desvio de $0,60 \pm 0,74$ nm, indicando uma elevada variabilidade conformacional. Foram observadas interações com o íon de zinco catalítico, Y245, T247, L189, H226, V102, K249. Apesar da instabilidade entre poses, a proximidade e os contatos observados sustentam a possibilidade de ligação funcional.

No sistema Y454X, a distância foi de 0,58 nm, com média e desvio de $0,71 \pm 0,16$ nm, indicando uma variabilidade moderada. BINANA revelou interações com R109, L110, V105, H230 e Y108, sem coordenação com o zinco catalítico. O posicionamento atual do ligante não favorece uma interação eficaz com o centro ativo.

3.2.3.4.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

Entre os sistemas analisados, as variantes WT, E209Q, Q374H, Q376X e S237Y apresentaram distâncias semelhantes ou inferiores ao valor observado na 2JSD, com coordenação direta ao íon de zinco catalítico. Esses sistemas também compartilham interações com resíduos conservados do centro funcional, como H226, K249, A190 e P246. A variabilidade conformacional foi moderada na maioria dos casos, embora WT e S237Y tenham apresentado valores de desvio padrão mais elevados. Ainda assim, a orientação do Marimastat nesses contextos é compatível com a geometria ativa da enzima, sugerindo um modo de ligação plausível e um potencial inibitório preservado em relação ao modelo de referência.

Na variante H226Q, o íon de zinco catalítico encontra-se deslocado do sítio ativo, impedindo qualquer coordenação metálica. Embora o Marimastat interaja com resíduos como P246, L189, A190 e K249, também presentes na 2JSD, a ausência do metal no centro funcional compromete a arquitetura catalítica da enzima. Essa condição torna o modo de ligação incompatível com o observado na estrutura de referência, enfraquecendo o potencial inibitório neste sistema mutado.

As variantes A304G-A349V, H204R e Y454X exibem distâncias mais elevadas ao íão de zinco, sem coordenação metálica. Nessas variantes, os resíduos em comum com a 2JSD são ausentes, com exceção de P246 na A304G-A349V. Além disso, a orientação do ligante é frequentemente desalinhada em relação ao centro catalítico, e os valores de desvio padrão indicam instabilidade conformacional entre as poses. Esse conjunto de fatores sugere uma compatibilidade limitada do Marimastat com a geometria funcional da MMP20 nesses sistemas, reduzindo a probabilidade de uma interação inibitória eficaz

3.2.3.5. Gm6001

3.2.3.5.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância ao íão de zinco foi de 0,17 nm, com média e desvio padrão de $0,97 \pm 0,70$ nm, indicando alta variabilidade entre as poses. BINANA revelou interações com H236, E59, D104, Q56, K52 e com o íão de zinco catalítico. O ligante está centralizado e bem orientado no sítio ativo. Este perfil é compatível com uma ligação funcional plausível.

Na variante A304G-A349V, a distância foi de 0,18 nm, com média e desvio de $0,66 \pm 0,77$ nm, refletindo uma alta dispersão conformacional. Foram identificadas interações com P246, G101, Y248, A190, H191 e com o íão de zinco catalítico. O ligante está bem posicionado, o que sugere um potencial inibitório relevante, apesar da variabilidade entre poses.

Em E209Q, a distância foi de 0,17 nm, com média e desvio de $0,37 \pm 0,27$ nm, demonstrando boa consistência entre as poses. BINANA indicou interações com R99, S237, D104, H230, P246, C100, H226 e com o íão de zinco catalítico. O ligante está corretamente orientado e bem encaixado no centro ativo. Este padrão apoia uma ligação funcional estável.

No sistema H204R, a distância foi de 0,53 nm, com média e desvio de $1,50 \pm 0,85$ nm, evidenciando alta variabilidade conformacional. As interações ocorreram com H236, P103 e H230, mas sem coordenação com o íão de zinco. O ligante encontra-se afastado da geometria ideal, o que prejudica a eficácia da ligação funcional.

Em H226Q, a distância ao íão de zinco foi de 3,23 nm, com média e desvio de $3,48 \pm 0,63$ nm, refletindo um afastamento sistemático. BINANA revelou interações com Y108,

L110, A106, H230 e A192, mas não foi observada coordenação metálica. Essa separação decorre do deslocamento do íon de zinco, e não da posição do ligante, que permanece na cavidade. A ausência de proximidade funcional compromete o potencial inibitório.

Na variante Q374H, a distância foi de 0,19 nm, com média e desvio de $0,61 \pm 0,42$ nm, indicando variabilidade moderada entre as poses. BINANA apontou interações com A192, D104, H230, E227, A194 e com o íon de zinco catalítico. O posicionamento do GM6001 é compatível com o centro funcional da enzima, sugerindo uma ligação potencialmente eficaz.

Em Q376X, a distância foi de 0,22 nm, com média e desvio de $0,44 \pm 0,22$ nm, refletindo boa consistência entre as poses. Foram observadas interações com C100, P98, P246 e o íon de zinco catalítico. O ligante está bem orientado e inserido no centro catalítico. Esse padrão favorece a ligação funcional.

Para S237Y, a distância foi de 0,16 nm, com média e desvio de $0,24 \pm 0,12$ nm, evidenciando excelente consistência conformacional. BINANA revelou interações com H226, V102, H230, M244, Y245 e com o íon de zinco catalítico. O ligante encontra-se corretamente orientado no centro funcional. Este perfil sustenta fortemente o potencial inibitório do GM6001 neste sistema.

No sistema Y454X, a distância foi de 0,48 nm, com média e desvio de $0,58 \pm 0,09$ nm, indicando baixa variabilidade, mas afastamento relativo do zinco. BINANA revelou interações com A194, P341, Y180 e G101, sem coordenação metálica. A posição do ligante não é ideal para interação funcional eficiente.

3.2.3.5.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

Entre os sistemas analisados, as variantes WT, A304G-A349V, E209Q, Q376X e S237Y apresentaram coordenação direta ao íon de zinco, com distâncias próximas ou inferiores às observadas na estrutura de referência 2JSD. Nestes sistemas, também foram identificadas interações com resíduos catalíticos conservados como H226, H236, P246 e Y248, em conformidade com o modelo experimental. Os valores de desvio padrão foram baixos a moderados na maioria dos casos, com exceção das variantes WT e A304G-A349V, que apresentaram maior variabilidade conformacional entre as poses. Ainda assim, a orientação do GM6001 nesses contextos é compatível com a geometria funcional da MMP20, sugerindo um modo de ligação plausível e um potencial inibitório preservado

em relação ao modelo de referência.

Na variante Q374H, apesar da coordenação ao íão de zinco, não foram identificadas interações com os resíduos estruturais presentes na 2JSD. O padrão de ligação observado é distinto do modelo experimental, o que pode indicar uma configuração alternativa menos compatível com a topologia funcional da enzima.

Nas variantes H204R e Y454X, não foi observada coordenação com o íão de zinco catalítico. Em H204R, o GM6001 interage com H236, um dos resíduos da 2JSD, mas a ausência de outros elementos estruturais do centro ativo e a distância elevada ao metal enfraquecem a compatibilidade funcional. Em Y454X, nenhum resíduo conservado da referência foi recuperado nas interações. A falta de convergência estrutural com a 2JSD em ambos o caso reduz consideravelmente a plausibilidade de uma ligação inibitória eficaz.

No sistema H226Q, o íão de zinco catalítico encontra-se deslocado do sítio ativo, inviabilizando a coordenação metálica. O GM6001 permanece posicionado na cavidade catalítica, mas não estabelece interações com os resíduos conservados identificados na 2JSD. Essa ausência de convergência com o modelo funcional e a desorganização do centro ativo comprometem o modo de ligação do ligante, tornando improvável uma interação funcional relevante nesse contexto mutacional.

3.2.3.6. Doxiciclina-d6

3.2.3.6.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância ao íão de zinco foi de 0,17 nm, com média e desvio padrão de $0,68 \pm 0,69$ nm, indicando alta variabilidade entre as poses. BINANA revelou interações com H236, L234, E59, D104 e com o íão de zinco catalítico. O ligante está bem orientado no centro da cavidade catalítica, compatível com um modo de ligação funcional.

Na variante A304G-A349V, a distância foi de 0,28 nm, com média e desvio de $0,86 \pm 0,55$ nm, refletindo dispersão conformacional moderada. Foram identificadas interações com V105, P103, F193, A192, E227 e D178, mas sem coordenação com o íão de zinco catalítico. A orientação do ligante é parcialmente deslocada do centro funcional, o que pode limitar sua eficácia inibitória.

Em E209Q, a distância foi de 0,72 nm, com média e desvio de $1,43 \pm 0,88$ nm, indicando variabilidade conformacional elevada. BINANA revelou interações com P103, H230, N107, R109 e P115, sem contato com o íon de zinco catalítico. A posição do ligante não é compatível com o centro ativo, o que reduz sua plausibilidade funcional neste sistema.

No sistema H204R, a distância foi de 0,61 nm, com média e desvio de $1,52 \pm 0,87$ nm, indicando alta variabilidade e afastamento da geometria catalítica ideal. Foram observadas interações com H230, A106, D104 e H236, mas sem coordenação ao zinco catalítico. A posição do ligante parece deslocada e menos compatível com um modo de ligação estável.

Em H226Q, a distância ao íon de zinco foi de 2,94 nm, com média e desvio de $3,53 \pm 0,67$ nm, refletindo um afastamento sistemático. BINANA revelou interações com Y108, A192, A190, E227, A106 e Y180, mas sem coordenação metálica. Esta separação decorre do deslocamento do íon de zinco catalítico causado pela mutação, e não da posição do ligante, que permanece corretamente inserido. O potencial inibitório está comprometido pela ausência do metal no centro funcional.

Na variante Q374H, a distância foi de 0,74 nm, com média e desvio de $1,05 \pm 0,61$ nm, indicando variabilidade considerável. Foram identificadas interações com A192, H230, A194, V105, N107, Y108, F111 e G113, mas sem envolvimento do zinco catalítico. O ligante permanece parcialmente bem orientado, mas sua posição não favorece uma ligação cataliticamente eficaz.

Em Q376X, a distância foi de 0,95 nm, com média e desvio de $1,24 \pm 0,61$ nm, refletindo dispersão elevada entre as poses. As interações envolveram G187, K96, I95, Y48, T188 e K97, sem qualquer coordenação ao íon de zinco catalítico. O ligante está distante da geometria funcional do centro ativo.

Para S237Y, a distância foi de 0,17 nm, com média e desvio de $0,28 \pm 0,17$ nm, evidenciando excelente consistência conformacional. BINANA revelou interações com V102, P246, H226, H230, A190, D104 e com o íon de zinco catalítico. O ligante está centralizado e bem orientado no sítio ativo, o que sugere um potencial inibitório relevante.

No sistema Y454X, a distância foi de 0,29 nm, com média e desvio de $0,60 \pm 0,28$ nm, indicando moderada variabilidade entre as poses. As interações observadas incluíram P103, V105, H230, Y180, A194 e A192, mas sem envolvimento do íon de zinco catalítico. A conformação atual do ligante reduz a eficácia da interação com o centro funcional.

3.2.3.6.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

Entre os sistemas modelados com a Doxycycline-d6, apenas as variantes WT e S237Y exibiram coordenação direta com o íon de zinco e interações com diversos resíduos conservados da 2JSD, incluindo H226, H236, P246 e A190. Nestes sistemas, a conformação do ligante foi centralizada e bem orientada. Os valores de desvio padrão foram baixos em S237Y e mais elevados em WT, refletindo respectivamente uma boa estabilidade e uma variabilidade conformacional mais pronunciada. Ainda assim, o posicionamento observado sugere uma compatibilidade plausível, indicando um modo de ligação consistente com o observado na estrutura de referência.

Nas variantes A304G-A349V, E209Q, H204R, Q374H e Y454X, não foi observada coordenação metálica ao íon de zinco catalítico, e as interações envolveram resíduos periféricos ou não conservados. Apenas H204R apresentou contato com H236, resíduo também presente na estrutura de referência. Os valores de desvio padrão foram geralmente elevados, com exceção de Y454X, que apresentou uma variabilidade conformacional mais contida. A ausência de coordenação metálica e de múltiplos contatos com os elementos centrais do sítio ativo observados na 2JSD reduz a convergência estrutural com o modelo experimental, comprometendo a plausibilidade de uma ligação inibitória eficaz nesses sistemas.

Nos sistemas Q376X e H226Q, o ligante não apresentou coordenação com o zinco catalítico. Em Q376X, observou-se interação com T188, e em H226Q, com A190, ambos identificados na estrutura de referência. No entanto, os desvios padrões foram elevados em ambas as variantes, e o afastamento do íon de zinco, associado à reorganização do centro ativo, inviabiliza a formação da geometria funcional observada na 2JSD, comprometendo o modo de ligação da Doxycycline-d6 nessas condições.

3.2.3.7. Curcumina

3.2.3.7.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância ao íon de zinco foi de 0,17 nm, com média e desvio padrão de $0,57 \pm 0,71$ nm, indicando alta variabilidade entre as poses. BINANA revelou interações com D104, F111 e com o íon de zinco catalítico. O ligante encontra-se bem centrado na cavidade catalítica, compatível com um modo de ligação funcional.

Na variante A304G-A349V, a distância foi de 0,17 nm, com média e desvio de $0,66 \pm 0,60$ nm, refletindo alta dispersão conformacional. Foram observadas interações com D178, E227, H204, e os dois íons de zinco (catalítico e estrutural). A presença do metal catalítico e o posicionamento coerente sugerem um potencial inibitório, ainda que com alguma instabilidade entre poses.

Em E209Q, a distância foi de 0,16 nm, com média e desvio de $0,37 \pm 0,36$ nm, indicando uma variabilidade conformacional moderada. BINANA revelou interações com H226, N219, G217 e o íon de zinco catalítico. O ligante está corretamente orientado no centro funcional, compatível com uma ligação eficaz.

No sistema H204R, a distância foi de 0,80 nm, com média e desvio de $1,13 \pm 0,29$ nm, indicando variabilidade moderada entre as poses. Nenhuma coordenação com o zinco foi observada. As interações envolveram S241, T247, F79 e T222. O ligante parece deslocado da cavidade catalítica, limitando a eficácia da ligação.

Em H226Q, a distância ao íon de zinco foi de 3,78 nm, com média e desvio de $2,83 \pm 1,22$ nm, refletindo um afastamento sistemático. Esta separação resulta do deslocamento do íon de zinco catalítico, não da posição do ligante, que permanece inserido na cavidade. BINANA revelou interações com A192, L189, A190 e A242, mas sem coordenação metálica. A ausência do metal funcional compromete o potencial inibitório.

Na variante Q374H, a distância foi de 0,18 nm, com média e desvio de $0,44 \pm 0,39$ nm, indicando variabilidade moderada entre as poses. As interações identificadas incluíram Y108, L110, V105, C100, R109, F111 e o íon de zinco catalítico. A orientação do ligante está bem ajustada ao centro funcional da enzima, favorecendo uma ligação estável.

Em Q376X, a distância foi de 0,17 nm, com média e desvio de $0,35 \pm 0,24$ nm, refletindo boa consistência entre as poses. Foram observadas interações com C100, K249, S241, R99 e o íon de zinco catalítico. O ligante está corretamente inserido no centro ativo, o que apoia uma ligação funcional.

Para S237Y, a distância foi de 0,18 nm, com média e desvio de $0,17 \pm 0,01$ nm, indicando excelente estabilidade conformacional. BINANA revelou interações com H226, Y248, G187, K249, H230, E227, T247 e o íon de zinco catalítico. O ligante está centralizado e altamente compatível com a geometria funcional da MMP20.

No sistema Y454X, a distância foi de 0,18 nm, com média e desvio de $0,52 \pm 0,33$ nm, revelando moderada variabilidade. As interações incluíram A194, Y180, H226, C100,

E227 e o íão de zinco catalítico. A posição do ligante é funcionalmente favorável, sugerindo um modo de ligação eficaz.

3.2.3.7.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

As variantes S237Y e Q376X apresentaram coordenação direta com o íão de zinco catalítico e interações com resíduos conservados da estrutura de referência 2JSD. Em S237Y, foram identificados contatos com H226, Y248 e K249, enquanto em Q376X, a única interação com resíduo conservado foi com K249. A orientação do ligante foi estável e centralizada, com valores de desvio padrão baixo para S237Y e moderado para Q376X, indicando boa consistência conformacional entre as poses. Esses sistemas mostram convergência estrutural parcial a robusta com o modelo de referência, sugerindo um modo de ligação funcional e um potencial inibitório plausível da curcumina.

As variantes A304G-A349V, E209Q e Y454X exibiram coordenação metálica e interações com resíduos conservados da 2JSD, embora de forma limitada. Em A304G-A349V, foi observada interação com P246; em E209Q e Y454X, com H226. Os valores de desvio padrão foram elevados em A304G-A349V e moderados nas demais, refletindo diferentes níveis de estabilidade conformacional. Apesar de apresentarem menos pontos de contato com o modelo de referência, esses sistemas revelam uma compatibilidade funcional parcial, sugerindo modos de ligação possivelmente viáveis para a curcumina.

Nas variantes WT e Q374H, embora tenha havido coordenação ao zinco, não foram identificadas interações com resíduos centrais da 2JSD. Além disso, a variabilidade conformacional foi elevada em WT e moderada em Q374H, o que compromete a estabilidade do modo de ligação. A ausência de resíduos críticos do centro ativo limita a convergência funcional com o modelo de referência, reduzindo a plausibilidade de uma ligação inibitória eficaz da curcumina nestes sistemas.

Na variante H204R, não foram identificadas interações com resíduos conservados da estrutura de referência 2JSD, e também não houve coordenação metálica com o íão de zinco catalítico. A orientação do ligante mostrou-se frequentemente deslocada, com uma variabilidade conformacional moderada. A ausência de convergência com os componentes funcionais da 2JSD compromete claramente a compatibilidade estrutural, tornando improvável um modo de ligação funcional da curcumina neste sistema.

No sistema H226Q, o íão de zinco catalítico encontra-se deslocado da cavidade ativa.

Embora a curcumina mantenha interação com A190 e L189, também presentes na 2JSD, a ausência do metal funcional inviabiliza a coordenação. Essa divergência estrutural em relação ao modelo de referência compromete fortemente a possibilidade de uma ligação inibitória eficaz neste contexto.

3.2.3.8. Batimastat

3.2.3.8.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância ao íon de zinco foi de 0,17 nm, com média e desvio padrão de $0,71 \pm 0,75$ nm, indicando alta variabilidade entre as poses. BINANA revelou interações com D104, M244, H226 e o íon de zinco catalítico. O ligante está centralizado e bem orientado no sítio ativo, compatível com um modo de ligação funcional.

Na variante A304G-A349V, a distância foi de 0,24 nm, com média e desvio de $0,67 \pm 0,73$ nm, refletindo uma alta dispersão conformacional. Foram observadas interações com L189, A190, Y248, R99 e o íon de zinco catalítico. Apesar da variabilidade entre poses, a presença do metal e de resíduos conservados favorece a plausibilidade funcional do Batimastat nesse sistema.

Em E209Q, a distância foi de 0,19 nm, com média e desvio de $0,37 \pm 0,33$ nm, indicando boa consistência conformacional. BINANA identificou interações com Y248, H226, C100, R99, D104 e o íon de zinco catalítico. O ligante está corretamente posicionado e bem situado em relação ao centro ativo, sustentando fortemente um potencial inibitório.

No sistema H204R, a distância foi de 0,43 nm, com média e desvio de $1,08 \pm 0,57$ nm, revelando grande variabilidade entre as poses. As interações envolveram N107, P103 e D104, mas nenhuma coordenação metálica foi observada. A posição do ligante está deslocada da geometria catalítica ideal, o que compromete sua eficácia funcional.

Em H226Q, a distância ao íon de zinco foi de 3,56 nm, com média e desvio de $3,54 \pm 0,55$ nm, refletindo afastamento sistemático. Esta separação é devida ao deslocamento do zinco catalítico induzido pela mutação. BINANA revelou interações com F111, P112 e A192, mas sem envolvimento direto com o metal. A ausência do íon funcional limita fortemente o potencial inibitório do Batimastat neste sistema.

Na variante Q374H, a distância foi de 0,52 nm, com média e desvio de $0,64 \pm 0,16$ nm, indicando variabilidade moderada. Foram identificadas interações com H236, H230,

V105, A194 e L234, mas sem contato com o íon de zinco catalítico. A ausência de coordenação limita a eficácia da ligação, apesar da orientação relativamente estável.

Em Q376X, a distância foi de 0,44 nm, com média e desvio de $1,18 \pm 0,67$ nm, refletindo alta dispersão conformacional. BINANA revelou interações com V105, P103, R109, A106 e Y108, sem envolvimento com o zinco catalítico. O ligante está posicionado de forma periférica, enfraquecendo a ligação funcional.

Para S237Y, a distância foi de 0,20 nm, com média e desvio de $0,65 \pm 0,62$ nm, evidenciando variabilidade significativa entre as poses. Foram observadas interações com H226, H230, E227, K249 e o íon de zinco catalítico. A proximidade e os contatos estabelecidos favorecem uma ligação funcional plausível, apesar da instabilidade conformacional.

No sistema Y454X, a distância foi de 0,76 nm, com média e desvio de $1,17 \pm 0,66$ nm, revelando alta dispersão entre as poses. BINANA indicou interações com Y108, S179 e P341, mas sem coordenação com o íon de zinco catalítico. A posição do ligante é deslocada, o que compromete sua eficácia inibitória neste contexto.

3.2.3.8.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

Entre os sistemas modelados com batimastat, as variantes WT, A304G-A349V, E209Q e S237Y apresentaram coordenação direta com o íon de zinco catalítico e interações com múltiplos resíduos conservados da estrutura de referência 2JSD, como H226, Y248, K249, A190 e L189, em diferentes combinações. A posição do ligante nestes sistemas está centralizada, refletindo boa inserção no centro ativo. Os valores de desvio padrão foram elevados em WT, A304G-A349V e S237Y, e moderados em E209Q, indicando variações conformacionais distintas entre os sistemas. Ainda assim, a presença de resíduos-chave e a coordenação metálica sugerem uma boa compatibilidade geométrica com o modo de ligação funcional observado no modelo de referência.

Na variante Q374H, embora o ligante não interaja com o zinco catalítico, foram detetadas interações com H236, resíduo presente na 2JSD. A ausência de coordenação metálica e a falta de outros contatos críticos, no entanto, reduzem a plausibilidade de uma ligação funcional eficaz.

Nos sistemas H204R, Q376X e Y454X, nenhuma coordenação com o zinco foi

observada, e os resíduos envolvidos nas interações não incluem os principais conservados da estrutura de referência. A orientação do ligante é frequentemente periférica ou instável, o que compromete sua capacidade de imitar o padrão de ligação funcional da 2JSD.

No sistema H226Q, não foram identificadas interações com resíduos conservados da 2JSD, e o íon de zinco encontra-se deslocado da cavidade catalítica, impedindo a coordenação metálica. A ausência de convergência com os elementos do modelo de referência compromete a plausibilidade de uma ligação inibitória eficaz da Curcumina neste sistema.

3.2.3.9. Andrografolida

3.2.3.9.1. Análise das interações nos diferentes sistemas

No sistema WT, a distância ao íon de zinco foi de 0,16 nm, com média e desvio padrão de $0,51 \pm 0,59$ nm, indicando alta variabilidade entre as poses. BINANA revelou interações com Q56, K52, H236 e com o íon de zinco catalítico. O ligante encontra-se bem orientado no centro do sítio ativo, compatível com um modo de ligação funcional.

Na variante A304G-A349V, a distância foi de 0,18 nm, com média e desvio de $0,70 \pm 0,81$ nm, refletindo também uma elevada dispersão conformacional. Foram observadas interações com D104, H226, K249, T222 e com o íon de zinco catalítico. A presença do metal funcional e de resíduos catalíticos relevantes favorece a plausibilidade da ligação, apesar da variabilidade estrutural entre as poses.

Em E209Q, a distância foi de 0,16 nm, com média e desvio de $0,34 \pm 0,30$ nm, indicando boa consistência conformacional. BINANA identificou interações com D104, R99, Y245 e com o íon de zinco catalítico. O posicionamento do ligante é funcionalmente favorável, sustentando um potencial inibitório relevante.

No sistema H204R, a distância foi de 0,65 nm, com média e desvio de $1,41 \pm 0,71$ nm, evidenciando alta variabilidade entre as poses. Foram observadas interações com P103, H230, L234, Y108 e E114, mas sem coordenação metálica. A posição do ligante está deslocada do centro funcional, comprometendo sua eficácia inibitória.

Em H226Q, a distância ao íon de zinco foi de 3,38 nm, com média e desvio de $3,57 \pm 0,61$ nm, refletindo afastamento sistemático. Essa separação resulta do deslocamento do zinco catalítico. BINANA revelou interações com A192, E227, H230, Y108, R109, L110

e N107, mas sem envolvimento do zinco. A ausência do metal limita severamente o potencial inibitório neste sistema.

Na variante Q374H, a distância foi de 0,24 nm, com média e desvio de $0,38 \pm 0,12$ nm, indicando boa consistência conformacional. Foram identificadas interações com A190, A192, H230, V105 e com o íon de zinco catalítico. A presença do metal funcional e de resíduos centrais favorece uma ligação funcional plausível.

Em Q376X, a distância foi de 0,18 nm, com média e desvio de $0,46 \pm 0,29$ nm, refletindo boa estabilidade entre as poses. BINANA revelou interações com K249, C100, L243, H226, Y245, P246 e com o íon de zinco catalítico. O ligante está centralizado e bem orientado no sítio ativo, sugerindo forte compatibilidade funcional.

Para S237Y, a distância foi de 0,24 nm, com média e desvio de $0,25 \pm 0,09$ nm, evidenciando excelente consistência. Foram observadas interações com N107, A192 e com o íon de zinco catalítico. O posicionamento do ligante é adequado ao centro ativo, sustentando sua eficácia teórica como inibidor.

No sistema Y454X, a distância foi de 0,75 nm, com média e desvio de $0,71 \pm 0,17$ nm, indicando moderada variabilidade. BINANA indicou interações com Y108, H230, L110, N107 e A106, mas sem coordenação com o zinco catalítico. A posição do ligante é deslocada da cavidade catalítica funcional, o que limita sua ação inibitória.

3.2.3.9.2. Comparação com a estrutura de referência 2JSD

Entre os sistemas modelados com o andrografolida, as variantes WT, A304G-A349V, Q374H e Q376X apresentaram coordenação direta com o íon de zinco catalítico e interações com resíduos conservados da estrutura de referência 2JSD, como H226, H236, K249, A190 e P246, em diferentes combinações. A maioria desses sistemas exibiu orientação centralizada do ligante e variabilidade conformacional moderada, com exceção de WT e A304G-A349V, que apresentaram desvios padrão elevados. A recuperação de resíduos funcionais e a geometria observada sugerem um modo de ligação compatível com o modelo de referência, indicando um potencial inibitório plausível.

Já nas variantes E209Q e S237Y, apesar da presença de coordenação direta com o íon de zinco e de uma orientação razoável do ligante, nenhum dos resíduos interagentes está em comum com os identificados na 2JSD. Em E209Q, a variabilidade foi moderada,

enquanto em S237Y foi baixa, o que, aliado à ausência de elementos estruturais centrais, reduz a convergência funcional com o modelo de referência e compromete a plausibilidade de uma ligação inibitória eficaz nestes casos.

Nas variantes H204R e Y454X, não foi observada coordenação com o íon de zinco catalítico, e o ligante encontra-se deslocado e relativamente afastado do centro metálico em ambos os casos. Em H204R, a variabilidade conformacional é elevada, enquanto em Y454X é baixa, mas o posicionamento do ligante continua desfavorável para uma interação funcional. A ausência de coordenação metálica e de convergência com o modelo de referência compromete a plausibilidade de uma ligação inibitória eficaz do andrografolida nesses sistemas.

No sistema H226Q, o íon de zinco encontra-se deslocado da cavidade catalítica, impedindo qualquer coordenação metálica. O ligante permanece afastado do centro funcional e não estabelece interações com resíduos conservados da 2JSD. A ausência de convergência estrutural com o modelo de referência compromete a plausibilidade de uma ligação inibitória eficaz do andrografolida neste sistema.

Em resumo, considerando simultaneamente a coordenação ao zinco catalítico e a presença de pelo menos uma interação com um resíduo em comum da estrutura de referência 2JSD, os ligantes que apresentam o maior número de configurações potencialmente compatíveis são o NNGH (5), marimastat (5) e GM6001 (5), seguidos por batimastat (4) e andrographolide (4), e depois curcumina (3), SB-3CT (3), minociclina (2) e doxiciclina-d6 (2). Estes resultados indicam que alguns ligantes têm uma maior probabilidade de interagir de forma eficaz com o sítio catalítico.

No que diz respeito aos sistemas, aqueles que apresentam o maior número de ligantes que cumprem simultaneamente os dois critérios são o WT (7), E209Q (6), Q376X (6) e S237Y (6), seguidos por A304G-A349V (5), Q374H (3), Y454X (1), e por fim H204R (0) e H226Q (0). Estes dados refletem diferentes níveis de compatibilidade estrutural entre os sistemas e o modo de ligação observado na estrutura de referência.

4. DISCUSSÃO

4.1. Interpretação dos efeitos estruturais das mutações

As mutações H204R e H226Q, ambas localizadas próximas ao sítio catalítico, apresentaram perfis marcadamente alterados. H204R exibiu um RMSD relativamente elevado e um RMSF com flutuações moderadas, com picos concentrados no domínio catalítico. O número de pontes de hidrogénio manteve-se semelhante ao WT e a SASA global não diferiu substancialmente. No entanto, a SASA por resíduo revelou um aumento acentuado da exposição nos domínios do propeptideo, catalítico e nos domínios hemopexina 2, 3 e 4, refletindo perturbações na acessibilidade ao solvente em regiões estruturais críticas. Em contraste, H226Q apresentou o RMSF mais elevado entre todos os sistemas, com valores elevados em múltiplas regiões que abrangem os domínios catalítico e os quatro domínios hemopexina, sugerindo uma perda generalizada de rigidez estrutural. O RMSD oscilou em torno de 1,5 nm, acompanhado por uma redução nas pontes de hidrogénio e um aumento da SASA global e por resíduo, com aumentos significativos da exposição nos mesmos domínios, refletindo uma desorganização generalizada da região C-terminal.

As mutações S237Y e Q374H revelaram alterações estruturais mais discretas e localizadas, especialmente nos domínios hemopexina. Da mesma forma, S237Y exibiu ampla variabilidade no RMSF, com a maior parte dos resíduos entre 6 e 10 nm e múltiplos picos entre 12 e 16 nm, localizados em regiões correspondentes aos domínios catalítico e hemopexina, reforçando o impacto difuso dessa mutação na estabilidade conformacional. O mutante manteve pontes de hidrogénio e SASA global semelhantes ao WT, mas com aumento da exposição ao solvente nos domínios hemopexina, sugerindo perturbações superficiais que podem afetar interações funcionais. De forma semelhante, Q374H apresentou RMSD estável, RMSF moderado com flutuações nos domínios pró-domínio e hemopexina, e valores de SASA ligeiramente superiores, com exposição aumentada nas regiões do pró-domínio, domínio catalítico e domínios tipo hemopexina 2, 3 e 4, refletindo uma reorganização estrutural difusa.

A mutação E209Q destacou-se por apresentar RMSD inferior ao da forma selvagem, bem como RMSF, pontes de hidrogénio e SASA global comparáveis, indicando elevada estabilidade estrutural global. No entanto, a análise da SASA por resíduo revelou

diferenças regionais relevantes: foi observada uma redução da acessibilidade no início do domínio catalítico, enquanto aumentos localizados foram detetados no domínio propeptídeo e nos domínios tipo hemopexina 2, 3 e 4. Esses padrões sugerem alterações conformacionais pontuais, potencialmente com impacto funcional.

As mutações do tipo *nonsense*, Q376X e Y454X, provocaram truncamentos da região C-terminal, afetando significativamente a organização estrutural da MMP20. Ambas apresentaram valores de RMSD inferiores aos da forma selvagem, com pouca variação ao longo da simulação, sugerindo uma estabilidade global aparente. Contudo, os perfis de RMSF indicaram flexibilidade aumentada em regiões específicas, particularmente no domínio propeptídeo para Q376X e nos domínios propeptídeo e catalítico para Y454X. O número médio de ligações de hidrogénio foi notavelmente inferior nos dois mutantes, evidenciando uma perda de coesão estrutural. Na SASA global, Q376X apresentou uma redução acentuada em relação ao WT, indicando compactação, enquanto Y454X manteve valores semelhantes. A SASA por resíduo mostrou, em Q376X, um aumento de acessibilidade nos domínios propeptídeo, catalítico e hemopexina 2, refletindo uma reorganização estrutural significativa. Em Y454X, observou-se uma exposição aumentada nos domínios hemopexina 2 e 3, refletindo uma desorganização estrutural mais pronunciada. Em conjunto, os resultados indicam que, embora os mutantes *nonsense* possam manter certa estabilidade global, a perda dos domínios C-terminais e a alteração da dinâmica local afetam a integridade funcional da MMP20, podendo comprometer a interação com o substrato e a atividade enzimática

Por outro lado, a mutação dupla A304G-A349V induziu um efeito estabilizador inesperado a nível estrutural, com um RMSD médio muito inferior ao da forma selvagem, sugerindo uma preservação da arquitetura global da enzima. O perfil de RMSF revelou uma flexibilidade localizada na região do propéptideo, sem impacto relevante na coesão geral. O número de ligações de hidrogénio e a SASA global foram comparáveis aos do WT. Na SASA por resíduo, observaram-se ligeiros aumentos de acessibilidade ao solvente em regiões dos domínios propeptideo, catalítico e hemopexina 2 e 3. Estas alterações permanecem localizadas e não indicam uma perda estrutural extensa.

De forma geral, os resultados demonstram que as variantes patogénicas analisadas afetam a estrutura da MMP20 de maneira diversificada, refletindo-se em alterações conformacionais com impacto potencial na função enzimática. As mutações H204R e H226Q comprometem significativamente a estabilidade dos domínios catalítico e

hemopexina; S237Y e Q374H induzem perturbações nos domínios hemopexina, com envolvimento adicional do domínio propeptídeo e do domínio catalítico no caso de Q374H. Q376X e Y454X alteram profundamente a organização da região C-terminal por truncamento. Enquanto A304G-A349V e E209Q preservam, em grande medida, a integridade estrutural global, apesar de alterações localizadas em domínios funcionais relevantes.

4.2. Comparação com os trabalhos anteriores sobre a dinâmica molecular da MMP20

Até à data, apenas um estudo aplicou dinâmica molecular à proteína MMP20: o trabalho de Nikolopoulos et al. (2021), que analisou duas mutações patogénicas associadas à amelogenese imperfeita, E209Q e S237Y, ambas localizadas no domínio catalítico. As simulações foram realizadas com AMBER18 e o campo de forças ff14SB, com modelação ligada dos iões de zinco e cálcio. Cada sistema foi simulado por 400 ns, com repetições independentes, e os dados analisados com CPPTRAJ, incluindo RMSD, flutuações atómicas por resíduo, pontes de hidrogénio, distâncias interatómicas e pontes salinas. Foram ainda realizadas análises *in silico* com o Rhapsody, para avaliação da patogenicidade de mutações por saturação, e com o SDM, para prever alterações na acessibilidade ao solvente, oclusão de resíduos e $\Delta\Delta G$.

O nosso estudo retoma essas duas variantes, mas expande a análise a seis mutações adicionais ainda não exploradas por esta abordagem (H204R, H226Q, Q374H, A304G-A349V, Q376X e Y454X).

No que respeita às mutações E209Q e S237Y, os resultados de ambos os estudos apontam para uma estabilidade global preservada em E209Q, com valores de RMSD comparáveis aos da forma selvagem. No entanto, enquanto o estudo de Nikolopoulos et al. (2021) se focou na análise de RMSD e na ocupação de pontes de hidrogénio e salinas na região catalítica, a nossa abordagem revelou alterações localizadas na acessibilidade ao solvente nos domínios propeptídeo e hemopexina, sugerindo perturbações conformacionais subtis com possível impacto funcional à distância. Já para S237Y, ambos os trabalhos observaram reorganizações estruturais na região catalítica, com perda de interações locais importantes. A nossa análise complementa esses achados ao mostrar que tais alterações se estendem aos domínios hemopexina, com aumento de exposição superficial, sugerindo

um impacto mais difuso sobre a estrutura global da enzima.

Em conjunto, estes dados evidenciam a consistência geral entre os dois estudos no que respeita à estabilidade estrutural das variantes comuns, mas também destacam a capacidade da nossa abordagem em revelar alterações conformacionais adicionais com potencial relevância funcional. A integração de análises de solvente por resíduo e de *docking* molecular permitiu uma caracterização mais fina dos efeitos estruturais, contribuindo para uma compreensão mais abrangente do impacto das mutações na MMP20.

4.3. Implicações terapêuticas dos resultados de docking

Os resultados de *docking* molecular obtidos no presente estudo têm importantes implicações terapêuticas para as mutações patogénicas da proteína MMP20 associadas à amelogenese imperfeita. As análises revelaram que diferentes mutações apresentam variados níveis de preservação da funcionalidade do sítio catalítico, refletindo uma clara heterogeneidade na potencial resposta terapêutica a ligantes inibitórios.

A comparação das interações observadas nas variantes da MMP20 com a estrutura de referência 2JSD, obtida experimentalmente por RMN, foi realizada com o objetivo de validar a relevância biológica das poses obtidas por *docking*. Esta estrutura representa o domínio catalítico da MMP20 em complexo com o ligante NNGH, permitindo assim uma avaliação realista da preservação ou perturbação das interações essenciais ao funcionamento catalítico da enzima. Desta forma, a utilização de 2JSD como referência assegura que os resultados obtidos por *docking* sejam interpretados num contexto estrutural e funcional bem estabelecido, aumentando a confiança nas implicações terapêuticas propostas

Os ligantes que demonstraram maior potencial de ligação, considerando simultaneamente a coordenação ao zinco catalítico e interações com resíduos-chave da estrutura de referência (PDB: 2JSD), foram NNGH, marimastat e GM6001, seguidos por batimastat e andrographolide. Estes compostos exibiram múltiplas poses compatíveis, indicando uma maior probabilidade de interação eficaz com o sítio ativo.

Relativamente às variantes estudadas, o E209Q, Q376X e S237Y destacaram-se pelo elevado número de ligantes compatíveis com os critérios estruturais definidos, sugerindo que estas mutações mantêm uma conformação do sítio ativo funcionalmente preservada,

potencialmente sensível a intervenções farmacológicas com inibidores específicos.

Em contraste, variantes como H204R e H226Q revelaram uma perda quase completa da capacidade de interação com os ligantes testados, refletindo uma perturbação estrutural significativa que provavelmente inviabiliza estratégias terapêuticas baseadas na modulação direta do sítio ativo.

A variação significativa no posicionamento do ligante NNGH observada entre as diferentes variantes e a estrutura de referência (2JSD) evidencia as limitações de modelos que consideram apenas o domínio catalítico. Estes resultados indicam que, para prever com maior precisão a eficácia de inibidores, é fundamental recorrer a modelos estruturais mais completos, que incluam os domínios periféricos da MMP20. Além disso, a diversidade estrutural observada entre as mutações reforça a necessidade de estratégias terapêuticas adaptadas a cada caso. Assim, uma caracterização estrutural específica para cada mutação poderá ser decisiva no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e personalizados para a amelogenese imperfeita.

4.4. Limitações e perspectivas

Este estudo baseia-se em simulações de dinâmica molecular e de *docking* molecular *in silico* que, embora forneçam informações estruturais valiosas, apresentam várias limitações.

Primeiramente, as simulações de 100 ns permitem explorar a estabilidade conformacional local, mas são insuficientes para captar transições lentas, rearranjos alostéricos amplos ou efeitos de longo alcance. Simulações mais longas no futuro poderiam aprofundar esses aspetos.

Em seguida, os resultados baseiam-se num modelo estrutural previsto pelo AlphaFold, ajustado por sobreposição com a estrutura cristalográfica 2JSD, a fim de integrar os iões metálicos. Embora esta abordagem melhore a representatividade do sítio ativo, algumas regiões modeladas, nomeadamente nas extremidades, podem apresentar uma fiabilidade reduzida e influenciar localmente a dinâmica.

No que diz respeito ao *docking*, as interações ligante-proteína foram avaliadas com base em conformações médias obtidas a partir das simulações. Esta abordagem não leva em consideração a flexibilidade do sítio ativo durante a interação, nem os ajustes induzidos

pela ligação. Uma etapa futura poderia incluir abordagens como o *docking* flexível ou a dinâmica molecular de complexos ligante-proteína, a fim de refinar as previsões.

Além disso, a escolha de conservar apenas três poses representativas por sistema para a análise reduz a diversidade estrutural explorada, o que pode limitar a precisão das previsões de afinidade.

Importa ainda referir que, neste estudo, foram considerados exclusivamente ligantes com potencial inibitório. Até à data, não foram identificados ativadores conhecidos da MMP20 na literatura, o que impossibilita a análise de possíveis efeitos de ganho de função. Esta limitação, associada ao número restrito de ligantes testados, reduz a diversidade de interações exploradas e restringe a extrapolação funcional dos resultados obtidos. Estudos futuros com bibliotecas mais amplas e abordagens de triagem virtual poderiam ajudar a identificar novos moduladores, incluindo possíveis ativadores.

Por fim, os resultados obtidos permanecem de natureza preditiva e requerem validação experimental, seja através de ensaios enzimáticos com proteínas mutadas, seja por testes de inibição celular ou bioquímicos. Isso permitiria confirmar ou refutar as hipóteses formuladas com base nas observações *in silico*.

A integração futura de dados estruturais obtidos por simulações com informações clínicas dos pacientes, nomeadamente os perfis mutacionais e manifestações fenotípicas, aliada à seleção racional de moléculas ativadoras com base nas características específicas de cada mutação, poderá viabilizar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas para formas específicas de amelogenese imperfeita associadas à proteína MMP20.

5. CONCLUSÃO

Esta dissertação teve como objetivo compreender melhor o impacto estrutural e funcional das mutações patogénicas do gene *MMP20*, envolvido na amelogenese imperfeita, com base em abordagens de modelação molecular, dinâmica molecular e *docking in silico*.

A análise de oito variantes patogénicas, incluindo mutações *missense* e *nonsense*, permitiu identificar perturbações estruturais diversas, afetando a estabilidade, a flexibilidade e a acessibilidade do sítio catalítico da *MMP20*. Algumas mutações provocam desorganizações estruturais significativas, enquanto outras mantêm uma conformação global estável, apesar de estarem localizadas em regiões críticas.

As simulações de *docking* molecular revelaram uma diversidade de respostas estruturais de acordo com as mutações: algumas, como E209Q, Q376X e S237Y, mantêm uma organização parcial do sítio catalítico, permitindo uma ligação estável de vários ligantes. Outras, como H226Q e H204R, induzem uma perturbação acentuada na coordenação do zinco ou na geometria da bolsa catalítica, comprometendo a interação funcional com os inibidores.

Apesar das suas contribuições, este trabalho apresenta limitações inerentes à natureza *in silico* das simulações, à duração restrita das trajetórias e à ausência de validação experimental. No entanto, oferece uma base estrutural sólida para orientar futuros trabalhos experimentais, incluindo ensaios funcionais com proteínas mutadas ou testes de inibição enzimática.

Em conclusão, este trabalho demonstra que a modelação estrutural permite não só compreender melhor os efeitos moleculares das mutações no gene *MMP20*, mas também considerar abordagens terapêuticas direcionadas para as formas genéticas de amelogenese imperfeita. Ilustra ainda o potencial da dinâmica molecular e do *docking* como ferramentas complementares às abordagens clínicas, genéticas e experimentais no estudo das doenças raras.

Análise bioinformática de variações genéticas no gene MMP20 e a sua associação com amelogenese imperfeita

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Abraham, M., Alekseenko, A., Andrews, B., Basov, V., Bauer, P., Bird, H., Briand, E., Brown, A., Doijade, M., Fiorin, G., Fleischmann, S., Gorelov, S., Gouaillardet, G., Gray, A., Irrgang, M. E., Jalalypour, F., Johansson, P., Kutzner, C., Łazarski, G., Lindahl, E. (2025). *GROMACS 2025.2 Manual (2025.2)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.15387070>
- Arendt, Y., Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., Cozzi, R., Del Conte, R., & Gonnelli, L. (2007). Catalytic domain of MMP20 (ENAMelysin) – The NMR structure of a new matrix metalloproteinase. *FEBS Letters*, 581(23), 4723–4727. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.069>
- Baralle, D., & Baralle, M. (2005). Splicing in action: Assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics*, 42(10), 737–748. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029538>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bartlett, J. D., & Simmer, J. P. (1999). Proteinases in developing dental ENAMEL. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 10(4), 425–441. <https://doi.org/10.1177/10454411990100040101>
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., III, Mackerell, A. D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., & Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
- Brown, S., Bernardo, M. M., Li, Z.-H., Kotra, L. P., Tanaka, Y., Fridman, R., & Mobashery, S. (2000). Potent and selective mechanism-based inhibition of gelatinases. *Journal of the American Chemical Society*, 122(28), 6799–6800. <https://doi.org/10.1021/ja001461n>
- Chamary, J. V., Parmley, J. L., & Hurst, L. D. (2006). Hearing silence: Non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 7(2), 98–108. <https://doi.org/10.1038/nrg1770>
- Chang, J. J., Kim-Tenser, M., Emanuel, B. A., Jones, G. M., Chapple, K., Alikhani, A., Sanossian, N., Mack, W. J., Tsvigoulis, G., Alexandrov, A. V., & Pourmotabbed, T. (2017). Minocycline and matrix metalloproteinase inhibition in acute intracerebral hemorrhage: A pilot study. *European Journal of Neurology*, 24(11), 1384–1391. <https://doi.org/10.1111/ene.13403>

- Chun, Y.-H. P., Yamakoshi, Y., Yamakoshi, F., Fukae, M., Hu, J. C.-C., Bartlett, J. D., & Simmer, J. P. (2010). Cleavage site specificity of MMP-20 for secretory-stage ameloblastin. *Journal of Dental Research*, 89(8), 785–790. <https://doi.org/10.1177/0022034510366903>
- Coffield, K. D., Phillips, C., Brady, M., Roberts, M. W., Strauss, R. P., & Wright, J. T. (2005). The psychosocial impact of developmental dental defects in people with hereditary amelogenesis imperfecta. *Journal of the American Dental Association*, 136(5), 620–630. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2005.0233>
- Crawford, P. J. M., Aldred, M., & Bloch-Zupan, A. (2007). Amelogenesis imperfecta. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-17>
- Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 29(6), 888–893. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2011.01.004>
- Frischmeyer, P. A., & Dietz, H. C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 8(10), 1893–1900. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.10.1893>
- Golub, L. M., Sorsa, T., Lee, H. M., Ciancio, S., Sorbi, D., Ramamurthy, N. S., Gruber, B., Salo, T., & Konttinen, Y. T. (1995). Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(2), 100–109. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1995.tb00120.x>
- Gossas, T., & Danielson, U. H. (2006). Characterization of Ca²⁺ interactions with matrix metalloproteinase-12: Implications for matrix metalloproteinase regulation. *Biochemical Journal*, 398(3), 393–398. <https://doi.org/10.1042/BJ20051933>
- Hassan, Z. K., & Daghestani, M. H. (2012, July 31). Curcumin Effect on MMPs and TIMPs Genes in a Breast Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(7), 3259-3264. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.7.3259>
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., & Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D512–D520. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1267>
- Jacobsen, J. A., Major Jourden, J. L., Miller, M. T., & Cohen, S. M. (2010). To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1), 72–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.08.006>
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Kim, J.-W., Simmer, J. P., Hart, T. C., Hart, P. S., Ramaswami, M. D., Bartlett, J. D., & Hu, J. C.-C. (2005). MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Journal of Medical Genetics*, 42(3), 271–275. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.024505>

- Lee, S.-K., Seymen, F., Kang, H.-Y., Lee, K.-E., Gencay, K., Tuna, B., & Kim, J.-W. (2010). MMP20 hemopexin domain mutation in amelogenesis imperfecta. *Journal of Dental Research*, 89(1), 46–50. <https://doi.org/10.1177/0022034509352844>
- Lee, W. R., Chung, C. L., Hsiao, C. J., Chou, Y. C., Hsueh, P. J., Yang, P. C., Jan, J. S., Cheng, Y. W., & Hsiao, G. (2012). Suppression of matrix metalloproteinase-9 expression by andrographolide in human monocytic THP-1 cells via inhibition of NF- κ B activation. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy And Phytopharmacology*, 19(3-4), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.11.012>
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., III, MacKerell, A. D., Jr., Klauda, J. B., & Im, W. (2016). CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Llano, E., Pendás, A. M., Knäuper, V., Sorsa, T., Salo, T., Salido, E., Murphy, G., Simmer, J. P., Bartlett, J. D., & López-Otín, C. (1997). Identification and structural and functional characterization of human ENAMelysin (MMP-20). *Biochemistry*, 36(48), 15101–15108. <https://doi.org/10.1021/bi972120y>
- Lu, Y., Papagerakis, P., Yamakoshi, Y., Hu, J. C.-C., Bartlett, J. D., & Simmer, J. P. (2008). Functions of KLK4 and MMP-20 in dental ENAMEl formation. *Biological Chemistry*, 389(6), 695–700. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.080>
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Mirastschijski, U., Haaksma, C. J., Tomasek, J. J., & Ågren, M. S. (2004). Matrix metalloproteinase inhibitor GM 6001 attenuates keratinocyte migration, contraction and myofibroblast formation in skin wounds. *Experimental Cell Research*, 299(2), 465–475. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.06.007>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Nagano, T., Kakegawa, A., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, S., Hu, J. C.-C., Gomi, K., Arai, T., Bartlett, J. D., & Simmer, J. P. (2009). Mmp-20 and Klk4 cleavage site preferences for amelogenin sequences. *Journal of Dental Research*, 88(9), 823–828. <https://doi.org/10.1177/0022034509342694>
- NCBI. (2024). *MMP20 matrix metalloproteinase 20 [Homo sapiens (human)]*. National Center for Biotechnology Information Gene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9313>
- Nikolopoulos, G., Smith, C. E. L., Poulter, J. A., Murillo, G., Silva, S., Lamb, T., Berry, I. R., Brown, C. J., Day, P. F., Soldani, F., Al-Bahlani, S., Harris, S. A., O'Connell, M. J., Inglehearn, C. F., & Mighell, A. J. (2021). Spectrum of pathogenic variants and founder effects in amelogenesis imperfecta associated with MMP20. *Human Mutation*, 42(5), 567–576. <https://doi.org/10.1002/humu.24187>

- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of cheminformatics*, 3, 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Pollitt, C. C., Pass, M. A., & Pollitt, S. (1998). Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. *Equine Veterinary Journal*, 30(5), 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1998.tb05130.x>
- Seymen, F., Park, J.-C., Lee, K.-E., Lee, H.-K., Lee, D.-S., Koruyucu, M., Gencay, K., Bayram, M., Tuna, E. B., Lee, Z. H., Kim, Y.-J., & Kim, J.-W. (2015). Novel MMP20 and KLK4 mutations in amelogenesis imperfecta. *Journal of Dental Research*, 94(10), 1422–1429. <https://doi.org/10.1177/0022034515590569>
- Turk, B. E., Lee, D. H., Yamakoshi, Y., Klingenhoff, A., Reichenberger, E., Wright, J. T., Simmer, J. P., Komisarof, J. A., Cantley, L. C., & Bartlett, J. D. (2006). MMP-20 is predominately a tooth-specific enzyme with a deep catalytic pocket that hydrolyzes type V collagen. *Biochemistry*, 45(12), 3863–3871. <https://doi.org/10.1021/bi052252o>
- UniProt. (2025, 18/06). *MMP20 – Matrix metalloproteinase-20 – Homo sapiens (Human)*. UniProtKB. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O60882/entry#function>
- Van Wart, H. E., & Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14), 5578–5582. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.14.5578>
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8), 827–839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
- Whittaker, M., Floyd, C. D., Brown, P., & Gearing, A. J. H. (1999). Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chemical Reviews*, 99(9), 2735–2776. <https://doi.org/10.1021/cr9804543>
- Wright, J. T., Carrion, I. A., & Morris, C. (2015). The molecular basis of hereditary ENAMEL defects in humans. *Journal of Dental Research*, 94(1), 52–61. <https://doi.org/10.1177/0022034514556708>
- York, W. S., Mazumder, R., Ranzinger, R., Edwards, N., Kahsay, R., Aoki-Kinoshita, K. F., Campbell, M. P., Cummings, R. D., Feizi, T., Martin, M., Natale, D. A., Packer, N. H., Woods, R. J., Agarwal, G., Arpinar, S., Bhat, S., Blake, J., Garcia Castro, L. J., Fochtman, B., Gildersleeve, J., Goldman, R., Holmes, X., Jain, V., Kulkarni, S., Mahadik, R., Mehta, A., Mousavi, R., Nakarakommula, S., Navelkar, R., Pattabiraman, N., Pierce, M. J., Ross, K., Vasudev, P., Vora, J., Williamson, T., & Zhang, W. (2020). GlyGen: Computational and informatics resources for glycoscience. *Glycobiology*, 30(2), 72–73. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz080>
- Yuriev, E., & Ramsland, P. A. (2013). Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 26(5), 215–239. <https://doi.org/10.1002/jmr.2266>

ANEXOS

Anexo A. Avaliação de artefactos decorrentes das condições periódicas (*mindist*)

Os gráficos seguintes apresentam a distância mínima (*mindist*) entre a proteína MMP20 e suas imagens periódicas ao longo dos 100 ns de simulação para cada sistema estudado. Esta análise, expressa em nanômetros, permite verificar se a proteína permaneceu suficientemente afastada das suas imagens periódicas durante toda a simulação, garantindo que não ocorreram artefactos decorrentes das condições periódicas. Valores consistentemente superiores a 1,2 nm indicam que o sistema esteve adequadamente acomodado na caixa de simulação, sem interações artificiais indesejadas com as suas imagens periódicas.

Figura A1. WT

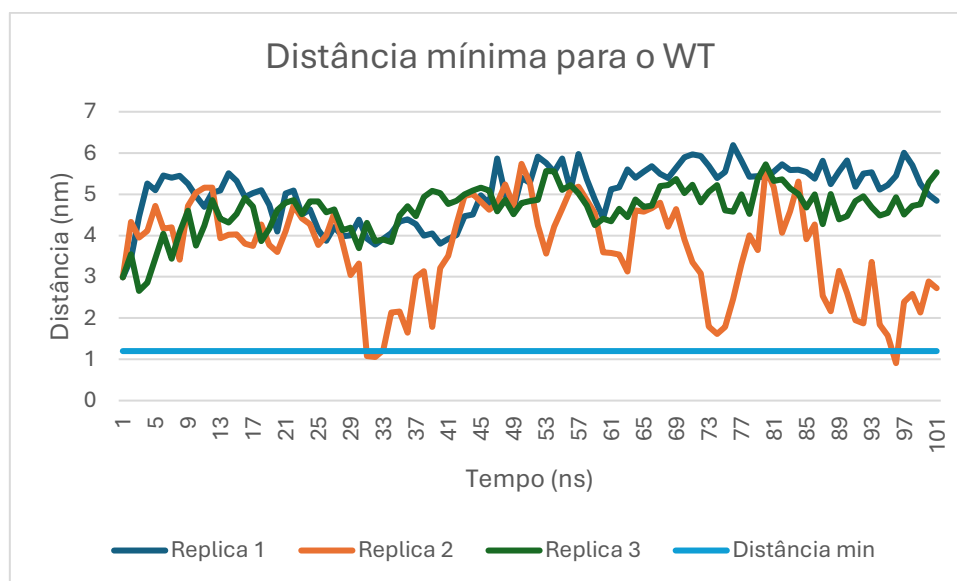


Figura A2. A304G-A349V

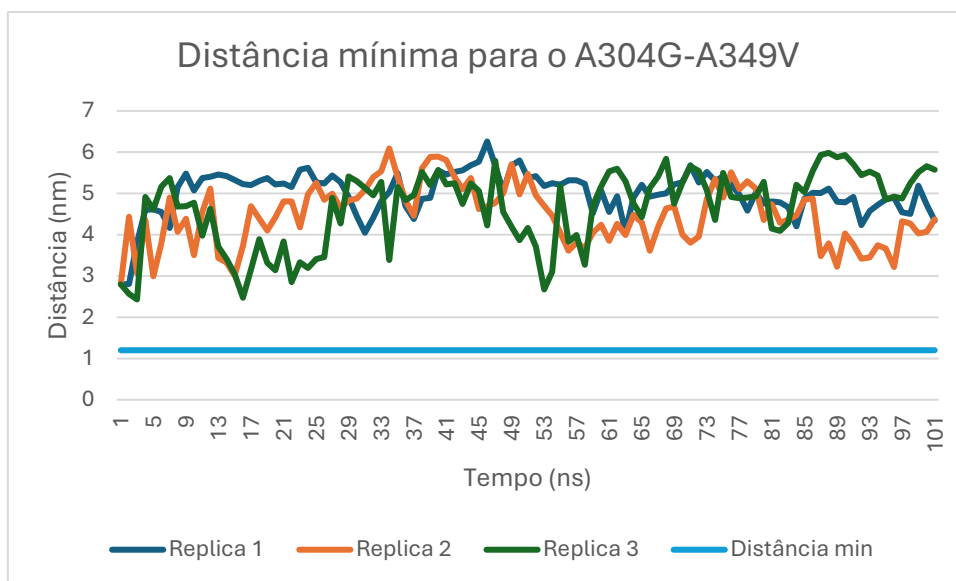


Figura A3. E209Q

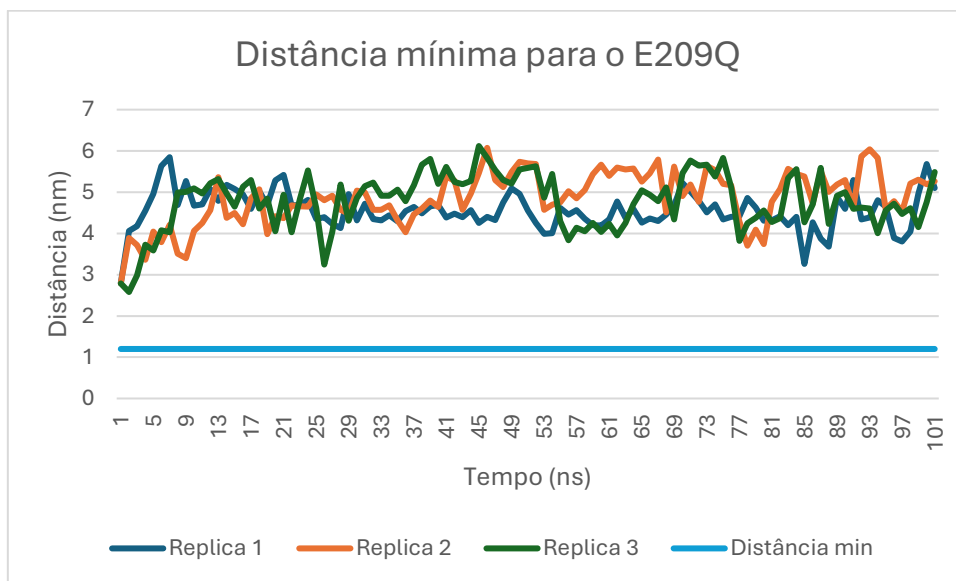


Figura A4. H204R

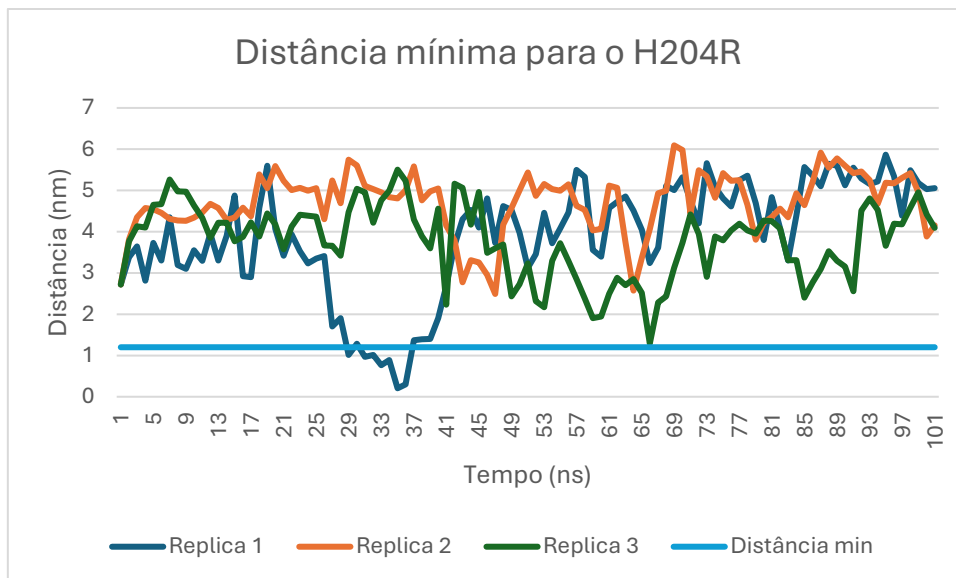


Figura A5. H226Q

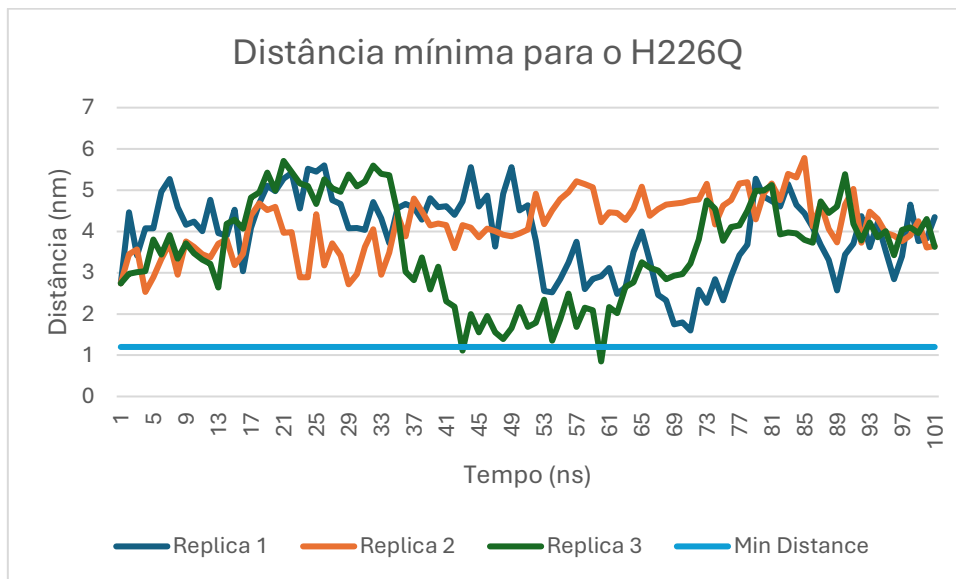


Figura A6. Q374H

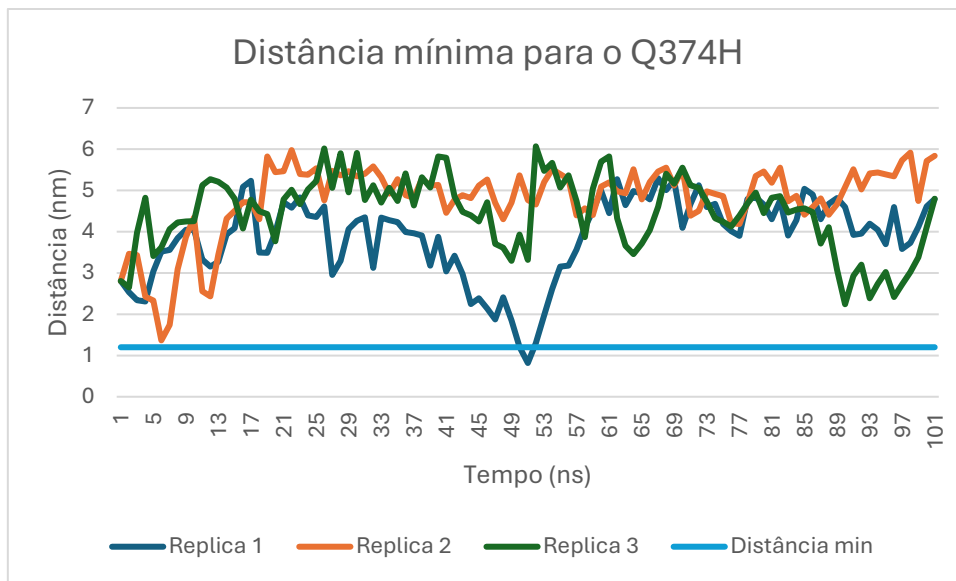


Figura A7. Q376X

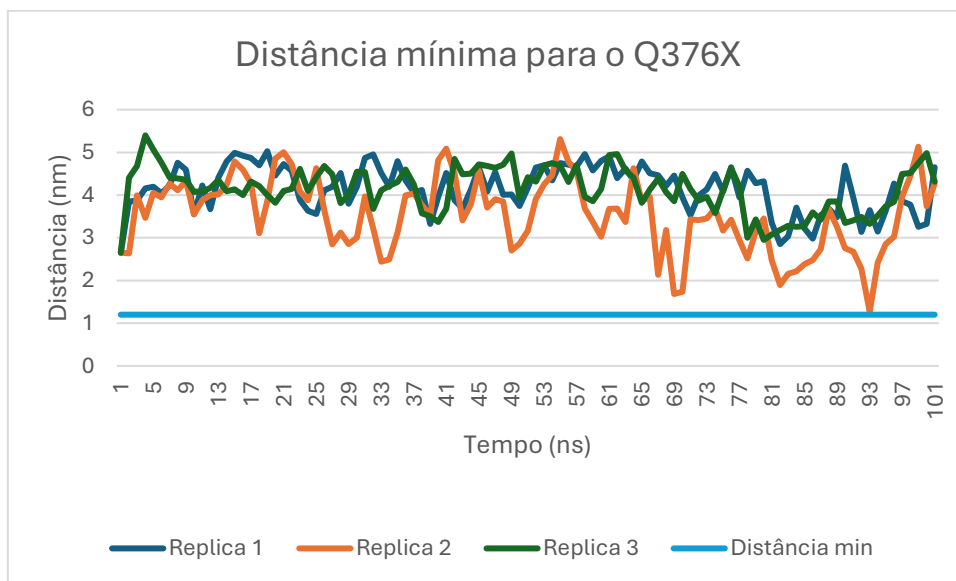


Figura A8. S237Y

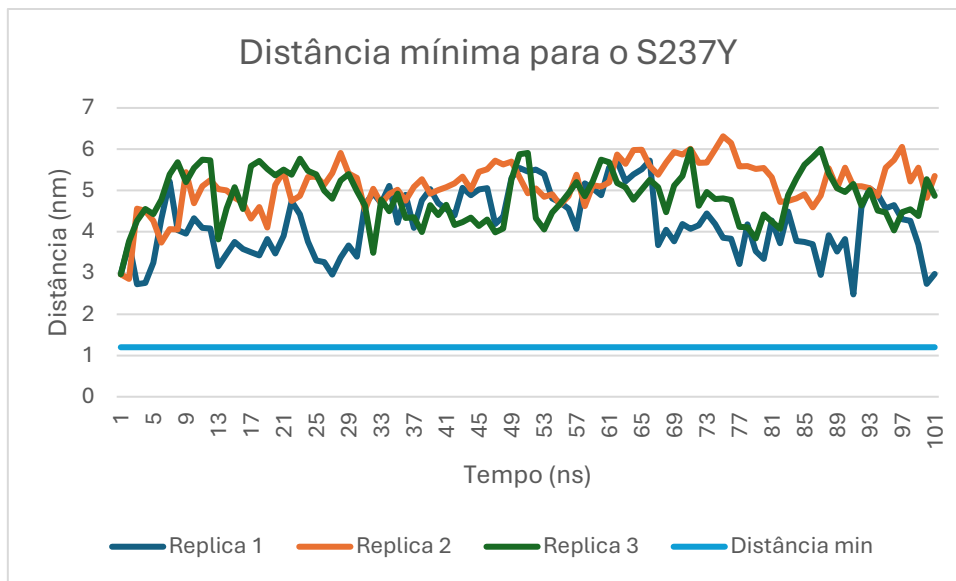
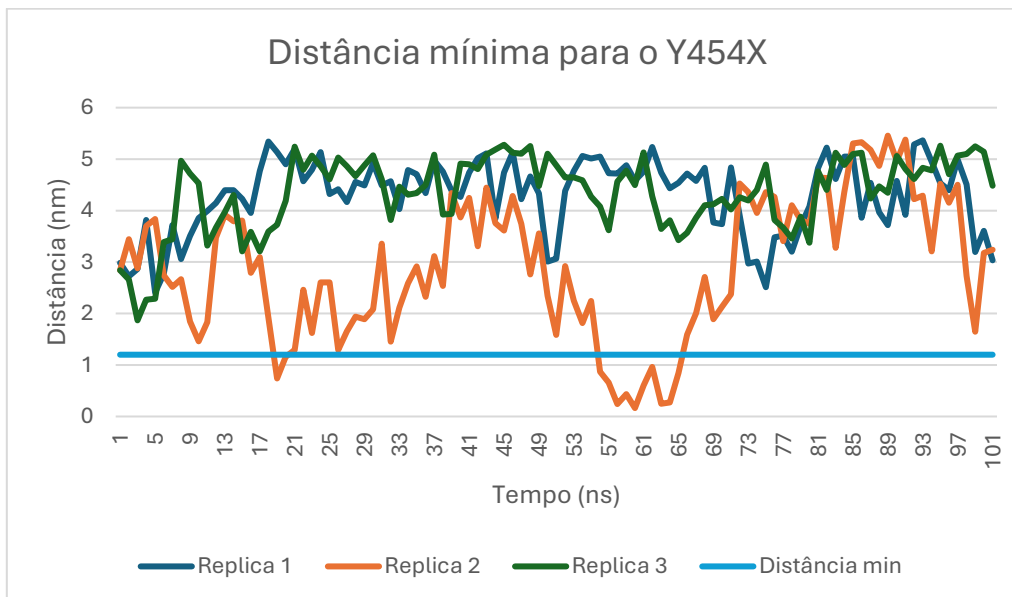


Figura A9. Y454X



Anexo B. Tabelas de seleção das poses para o docking molecular

Para garantir uma comparação rigorosa e consistente entre os diferentes sistemas simulados (forma selvagem e mutações), a seleção das poses finais foi realizada considerando conjuntamente os valores da energia de ligação e a distância ao zinco catalítico. Assim, nem sempre a pose com a energia mais baixa foi escolhida, tendo-se privilegiado um equilíbrio entre energia de ligação favorável (negativa) e uma proximidade adequada ao zinco catalítico. As tabelas seguintes apresentam, para cada combinação ligante-sistema, a pose selecionada, a respetiva energia de ligação (em kcal/mol) e a distância ao zinco catalítico (em Å).

Figura B1. NNGH

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
2JSD	X	X	X	X	X	X	0.22	X	X
WT	-8.03	1.36	-7.01	1.21	-7.92	0.17	0.91	0.65	3
A304G-A349V	-7.28	1.67	-9.79	0.54	-9.53	0.21	0.81	0.77	3
E209Q	-9.44	0.64	-8.80	0.17	-6.90	0.17	0.33	0.27	2
H204R	-7.64	0.23	-7.41	0.53	-7.23	1.13	0.63	0.46	1
H226Q	-8.06	3.10	-6.67	4.50	-7.28	1.75	3.12	1.38	1
Q374H	-8.58	0.19	-8.08	1.07	-8.85	0.68	0.65	0.44	1
Q376X	-6.73	0.18	-8.01	0.41	-9.75	0.24	0.28	0.12	3
S237Y	-8.88	0.50	-7.27	0.16	-8.18	0.18	0.28	0.19	3
Y454X	-8.15	0.52	-6.87	0.60	-8.15	0.17	0.43	0.23	3

Figura B2. SB-3CT

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
WT	-9.29	1.29	-7.20	0.96	-9.18	0.69	0.98	0.30	3
A304G-A349V	-8.99	1.63	-8.95	0.18	-9.29	0.32	0.66	0.80	2
E209Q	-9.18	0.70	-7.96	0.19	-8.38	0.32	0.40	0.27	2
H204R	-8.19	0.39	-7.64	1.36	-7.07	2.22	1.32	0.92	1
H226Q	-7.91	3.13	-8.62	3.86	-9.20	3.38	3.46	0.37	3
Q374H	-9.11	0.86	-9.00	1.23	-9.30	0.68	0.92	0.28	3
Q376X	-6.81	0.66	-7.26	1.04	-9.34	0.18	0.63	0.43	3
S237Y	-8.56	0.47	-9.10	0.55	-8.18	0.61	0.54	0.07	2
Y454X	-9.59	1.68	-7.90	0.70	-8.64	0.94	1.11	0.51	2

Figura B3. Minociclina

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
WT	-7.73	0.61	-10.16	0.16	-9.41	0.17	0.31	0.26	2
A304G-A349V	-7.50	1.77	-6.69	0.90	-7.09	0.86	1.18	0.51	3
E209Q	-8.42	0.81	-7.81	0.17	-7.59	0.23	0.40	0.35	2
H204R	-7.54	1.52	-7.27	0.57	-8.04	0.57	0.89	0.55	3
H226Q	-8.80	3.50	-7.42	4.10	-9.72	2.93	3.51	0.59	3
Q374H	-9.16	0.78	-8.33	1.76	-7.31	0.66	1.07	0.60	1
Q376X	-7.75	0.93	-8.29	0.52	-9.61	0.88	0.78	0.22	2
S237Y	-8.00	0.82	-7.81	0.19	-6.60	0.45	0.49	0.32	2
Y454X	-7.83	0.95	-8.48	0.68	-7.44	0.54	0.72	0.21	2

Figura B4. Marimastat

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
WT	-6.95	1.23	-6.76	0.18	-6.70	0.17	0.53	0.61	2
A304G-A349V	-6.64	1.56	-8.57	0.26	-7.96	0.19	0.67	0.77	2
E209Q	-7.09	0.81	-6.78	0.17	-6.28	1.20	0.73	0.52	2
H204R	-6.31	1.44	-7.83	1.55	-6.83	1.97	1.65	0.28	2
H226Q	-7.31	3.42	-7.54	4.21	-6.82	5.18	4.27	0.88	2
Q374H	-8.37	0.18	-7.27	1.17	-8.10	0.53	0.63	0.50	1
Q376X	-6.83	0.65	-7.72	0.40	-9.22	0.17	0.41	0.24	3
S237Y	-8.40	0.16	-6.22	0.18	-7.45	1.45	0.60	0.74	1
Y454X	-7.16	0.89	-6.81	0.58	-6.73	0.67	0.71	0.16	2

Figura B5. GM6001

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
WT	-8.71	1.40	-7.57	1.35	-9.44	0.17	0.97	0.70	3
A304G-A349V	-8.33	1.54	-10.46	0.18	-10.61	0.25	0.66	0.77	2
E209Q	-9.60	0.68	-9.48	0.17	-9.48	0.26	0.37	0.27	2
H204R	-7.84	1.86	-8.54	0.53	-7.49	2.10	1.50	0.85	2
H226Q	-9.00	3.23	-7.89	4.19	-8.59	3.01	3.48	0.63	1
Q374H	-10.12	0.61	-9.17	1.02	-9.83	0.19	0.61	0.42	3
Q376X	-7.72	0.66	-9.09	0.43	-11.02	0.22	0.44	0.22	3
S237Y	-9.93	0.16	-8.27	0.18	-8.20	0.37	0.24	0.12	1
Y454X	-8.44	0.65	-7.38	0.61	-7.97	0.48	0.58	0.09	3

Figura B6. Doxíciclina-d6

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
WT	-7.37	1.47	-6.35	0.41	-7.99	0.17	0.68	0.69	3
A304G-A349V	-6.93	1.37	-6.05	0.94	-7.05	0.28	0.86	0.55	3
E209Q	-8.61	1.15	-7.46	0.72	-6.94	2.41	1.43	0.88	2
H204R	-6.51	1.60	-6.66	0.61	-7.42	2.34	1.52	0.87	2
H226Q	-7.75	3.39	-6.98	4.25	-8.55	2.94	3.53	0.67	3
Q374H	-9.42	0.74	-7.57	1.75	-7.35	0.65	1.05	0.61	1
Q376X	-6.28	0.83	-7.06	1.94	-7.54	0.95	1.24	0.61	3
S237Y	-8.49	0.17	-7.10	0.20	-8.64	0.48	0.28	0.17	1
Y454X	-7.33	0.83	-8.52	0.29	-6.90	0.68	0.60	0.28	2

Figura B7. Curcumina

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
WT	-9.98	1.39	-7.49	0.16	-8.65	0.17	0.57	0.71	3
A304G-A349V	-9.22	1.33	-9.47	0.47	-10.07	0.17	0.66	0.60	3
E209Q	-9.34	0.78	-10.18	0.16	-9.03	0.17	0.37	0.36	2
H204R	-8.69	0.80	-7.90	1.37	-7.21	1.21	1.13	0.29	1
H226Q	-7.86	1.45	-9.38	3.78	-8.80	3.26	2.83	1.22	2
Q374H	-9.47	0.89	-9.84	0.26	-9.77	0.18	0.44	0.39	3
Q376X	-7.11	0.62	-8.37	0.26	-11.49	0.17	0.35	0.24	3
S237Y	-10.97	0.18	-10.19	0.17	-8.94	0.17	0.17	0.01	1
Y454X	-8.07	0.84	-8.32	0.53	-10.89	0.18	0.52	0.33	3

Figura B8. Batimastat

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
WT	-6.82	1.56	-9.80	0.17	-8.29	0.39	0.71	0.75	2
A304G-A349V	-9.20	1.51	-10.40	0.25	-11.23	0.24	0.67	0.73	3
E209Q	-9.32	0.75	-9.26	0.19	-7.40	0.16	0.37	0.33	2
H204R	-6.61	1.45	-8.37	1.37	-7.79	0.43	1.08	0.57	3
H226Q	-8.85	2.98	-8.21	4.08	-9.07	3.56	3.54	0.55	3
Q374H	-9.65	0.57	-8.55	0.82	-9.88	0.52	0.64	0.16	3
Q376X	-6.82	1.76	-9.03	0.44	-8.02	1.34	1.18	0.67	2
S237Y	-9.71	0.20	-7.65	0.38	-7.46	1.36	0.65	0.62	1
Y454X	-8.40	0.81	-7.05	1.93	-8.87	0.76	1.17	0.66	3

Figura B9. Andrografolida

Sistemas	Pose1 Energia (kcal/mol)	Pose1 Distância (nm)	Pose2 Energia (kcal/mol)	Pose2 Distância (nm)	Pose3 Energia (kcal/mol)	Pose3 Distância (nm)	Distância média (nm)	desvio padrão (nm)	Pose selecionada
WT	-9.10	1.20	-8.29	0.18	-9.01	0.16	0.51	0.59	3
A304G-A349V	-8.42	1.63	-10.9	0.18	-9.67	0.28	0.70	0.81	2
E209Q	-8.99	0.69	-9.83	0.16	-8.58	0.18	0.34	0.30	2
H204R	-8.44	1.50	-10.00	0.65	-7.63	2.07	1.41	0.71	2
H226Q	-9.99	3.38	-8.68	4.25	-9.18	3.07	3.57	0.61	1
Q374H	-9.73	0.42	-8.81	0.47	-9.31	0.24	0.38	0.12	3
Q376X	-9.72	0.75	-8.07	0.45	-12.02	0.18	0.46	0.29	3
S237Y	-8.50	0.17	-7.53	0.35	-8.81	0.24	0.25	0.09	3
Y454X	-8.54	0.86	-7.41	0.53	-9.54	0.75	0.71	0.17	3

Análise bioinformática de variações genéticas no gene MMP20 e a sua associação com amelogenese imperfeita

Anexo C. Resíduos e iões envolvidos nas interações proteína-ligante (BINANA)

Este anexo contém as tabelas que descrevem, para cada sistema estudado, os resíduos e os iões metálicos envolvidos nas interações diretas com cada ligante, conforme identificadas através do software BINANA. As interações detalhadas incluem ligações de coordenação ao zinco catalítico, pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas e demais contactos relevantes, permitindo uma comparação clara e detalhada dos efeitos provocados pelas diferentes mutações no ambiente molecular do sítio ativo da enzima.

Figura C1. NNGH

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
2JSD	T188, L189, A190, V223, H226, H236, P246, Y248, K249, ZN(catalítico)
WT	H236, ZN(catalítico), E59, D104
A304G-A349V	ZN(catalítico), P246, D104, K249
E209Q	R99, C100, ZN(catalítico), H226, V102, Y248
H204R	L234, H236, D104
H226Q	H236, F111, Y108, N107, A192
Q374H	L189, A190, ZN(catalítico), E227
Q376X	C100, H226, ZN(catalítico), D104, R99, K249
S237Y	N107, A192, ZN(catalítico)
Y454X	H230, L234, ZN(catalítico)

Figura C2. SB-3CT

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
WT	R99, K47, Y44
A304G-A349V	Y248, L189, ZN(catalítico)
E209Q	ZN(catalítico), R99, H226
H204R	ZN(catalítico), V105
H226Q	K249, L189
Q374H	Y108, R109, L110, F111, V105
Q376X	C100, H226, ZN(catalítico), K249
S237Y	X
Y454X	V105, H236

Figura C3. Minociclina

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
WT	S237, ZN(catalítico), M244, H226, H236, A235
A304G-A349V	Y180, ZN(Estrutural), A192
E209Q	Y245, C100, ZN(catalítico)
H204R	F111, A194, G113
H226Q	A192, Y108, A190, E227, Y180
Q374H	N107, V105, A194, Y108, F111, G113
Q376X	V105, P103, A194, G200
S237Y	D104, ZN(catalítico), H236, Y237, M244
Y454X	R109, L110, N107, T50, H230

Figura C4. Marimastat

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
WT	D104, ZN(catalítico), M244, H226,
A304G-A349V	G101, P246, Y248, G187, R99
E209Q	Y248, ZN(catalítico), R99, C100, H226
H204R	P195, E197, K116, P112, Y108, G113
H226Q	Q226, Y245, P246, L189, A190, H230, K249
Q374H	C100, ZN(catalítico), R99, D104, A190
Q376X	P246, Y245, K249, ZN(catalítico), M244
S237Y	Y245, T247, L189, H226, ZN(catalítico), V102, K249
Y454X	R109, L110, V105, H230, Y108

Figura C5. GM6001

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
WT	H236, ZN(catalítico), E59, D104, Q56, K52
A304G-A349V	P246, G101, Y248, A190, H191, ZN(catalítico)
E209Q	R99, ZN(catalítico), S237, D104, H230, P246, C100, H226
H204R	H236, P103, H230
H226Q	Y108, L110, A106, H230, A192
Q374H	A192, D104, ZN(catalítico), H230, E227, A194
Q376X	C100, P98, P246, ZN(catalítico)
S237Y	H226, ZN(catalítico), V102, H230, M244, Y245
Y454X	A194, P341, Y180, G101

Figura C6. Doxíciclina-d6

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
WT	H236, L234, ZN(catalítico), E59, D104
A304G-A349V	V105, P103, F193, A192, E227, D178
E209Q	P103, H230, N107, R109, P115
H204R	H230, A106, D104, H236
H226Q	Y108, A192, A190, E227, A106, Y180
Q374H	A192, H230, A194, V105, N107, Y108, F111, G113
Q376X	G187, K96, I95, Y48, T188, K97
S237Y	V102, P246, ZN(catalítico), H226, H230, A190, D104
Y454X	P103, V105, H230, Y180, A194, A192

Figura C7. Curcumina

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
WT	ZN(catalítico), D104, F111
A304G-A349V	ZN(catalítico), ZN(estrutural), D178, H204, E227
E209Q	H226, ZN(catalítico), N219, G217
H204R	S241, T247, F79, T222
H226Q	A192, L189, A190, A242
Q374H	Y108, L110, V105, ZN(catalítico), C100, R109, F111,
Q376X	ZN (catalítico), C100, K249, S241, R99
S237Y	H226, ZN(catalítico), T247, Y248, G187, K249, H230, E227
Y454X	ZN(catalítico), A194, Y180, H226, C100, E227

Figura C8. Batimastat

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
WT	D104, ZN(catalítico), M244, H226,
A304G-A349V	ZN(catalítico), L189, A190, Y248, R99
E209Q	Y248, ZN(catalítico), H226, C100, R99, D104
H204R	N107, P103, D104
H226Q	F111, P112, A192
Q374H	H236, H230, V105, A194, L234
Q376X	V105, P103, R109, A106, Y108
S237Y	H226, H230, ZN(catalítico), E227, K249
Y454X	Y108, S179, P341

Figura C9. Andrografolida

Sistemas	Resíduos que interagem com o zinco catalítico $\leq 2,5$ angstrom (Å)
WT	Q56, K52, ZN(catalítico), H236
A304G-A349V	ZN(catalítico), D104, H226, K249, T222
E209Q	ZN(catalítico), D104, R99, Y245
H204R	P103, H230, L234, Y108, E114
H226Q	A192, E227, H230, Y108, R109, L110, N107
Q374H	ZN(catalítico), A190, A192, H230, V105
Q376X	K249, C100, L243, ZN(catalítico), H226, Y245, P246
S237Y	N107, ZN(catalítico), A192,
Y454X	Y108, H230, L110, N107, A106

Anexo D. Representações estruturais dos complexos proteína-ligante obtidos por docking molecular

As imagens a seguir ilustram as poses selecionadas de cada ligante com as diferentes formas da MMP20 (tipo selvagem e mutantes). Cada figura destaca a posição do ligante na cavidade catalítica, bem como a sua proximidade com o íon zinco (representado em cor “*hotpink*”), facilitando a análise visual da acessibilidade e da orientação no sítio ativo.

Ligante 1 - NNGH

Figura D1.1 2JSD

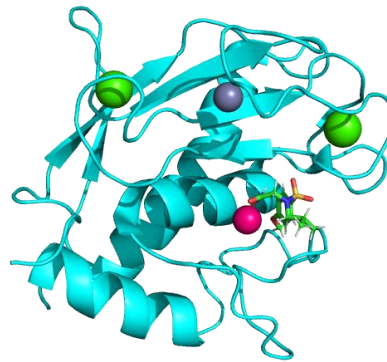


Figura D1.2 WT

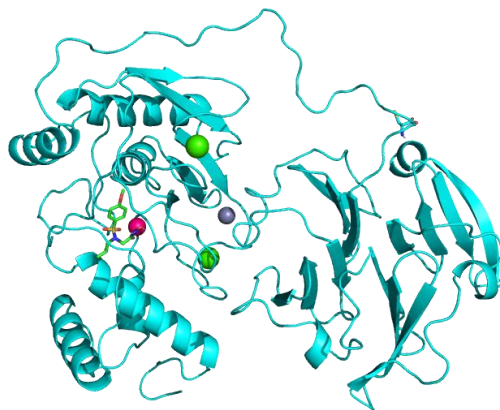


Figura D1.3 A304G-A349V

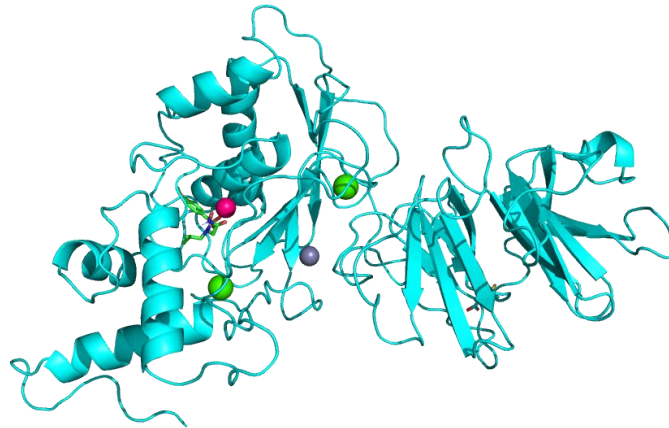


Figura D1.4 E209Q

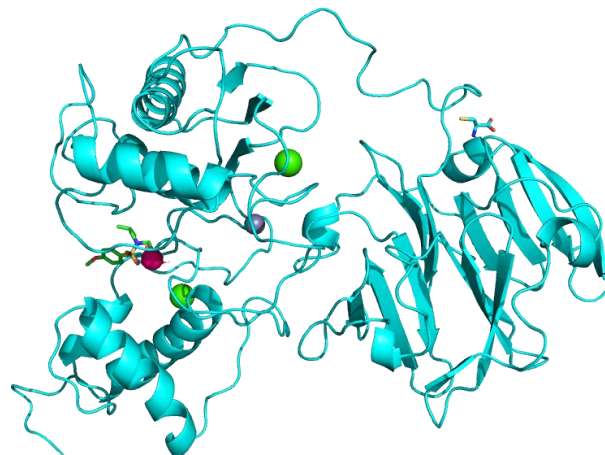


Figura D1.5 H204R

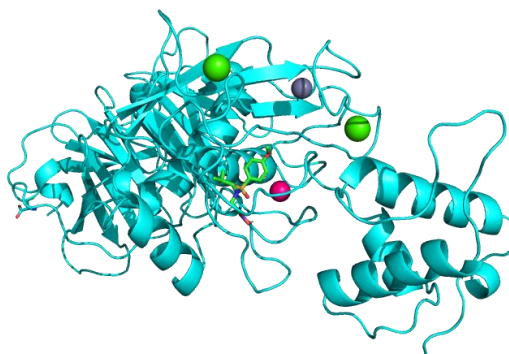


Figura D1.6 H226Q

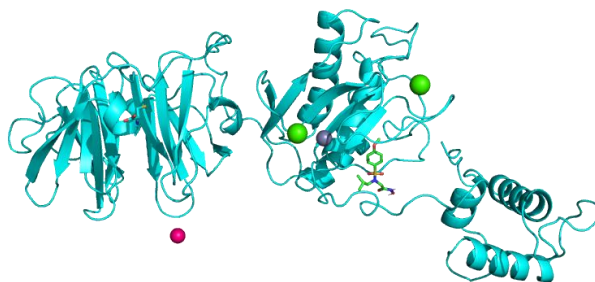


Figura D1.7 Q374H

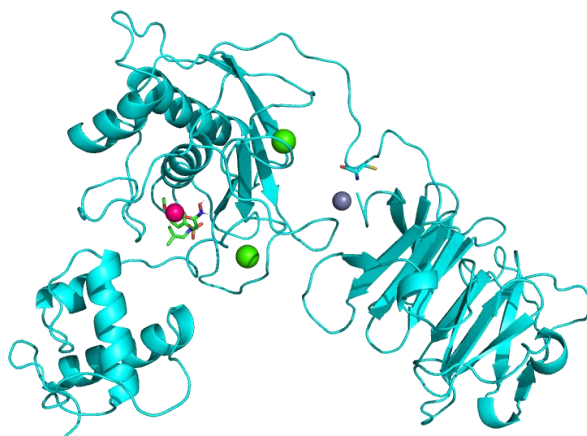


Figura D1.8 Q376X

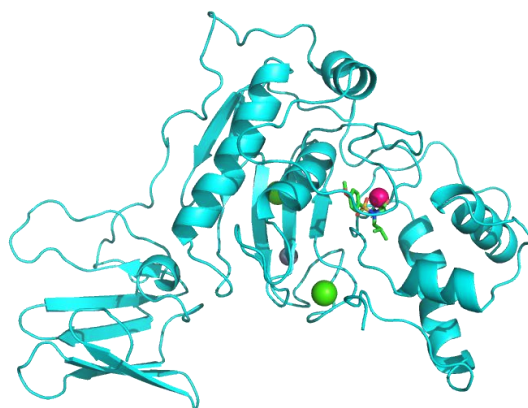


Figura D 1.9 S237Y

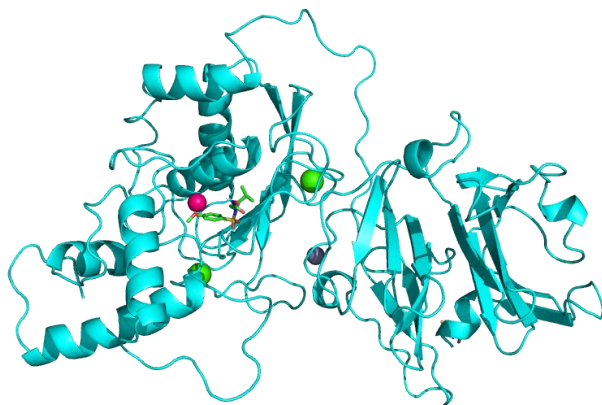
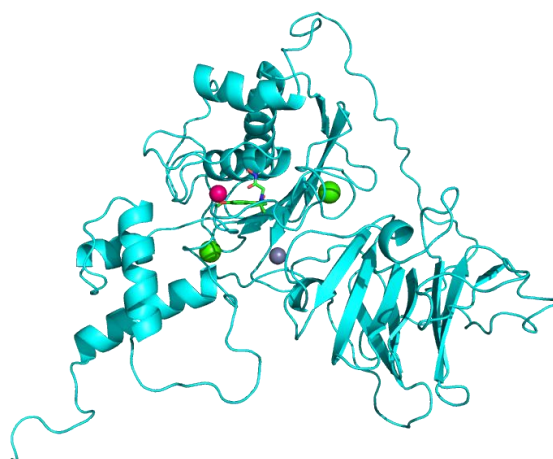


Figura D 1.10 Y454X



Ligante 2 - SB-3CT

Figura D 2.1 WT

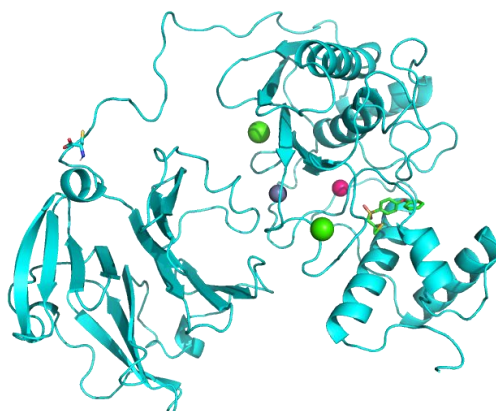


Figura D 2.2 A304G-A349V

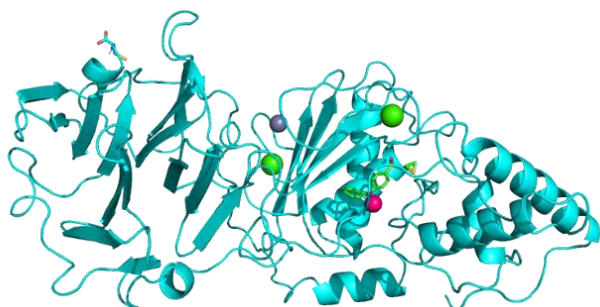


Figura D 2.3 E209Q

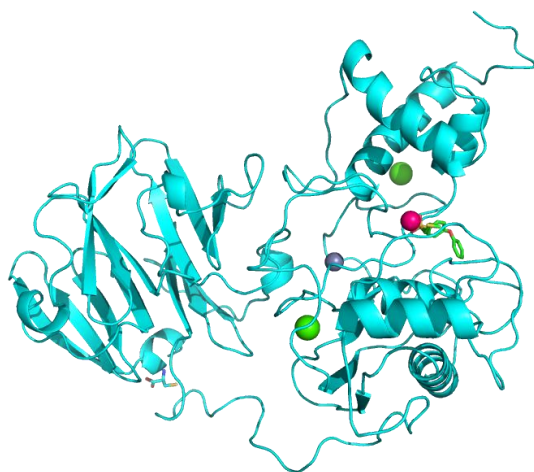


Figura D 2.4 H204R

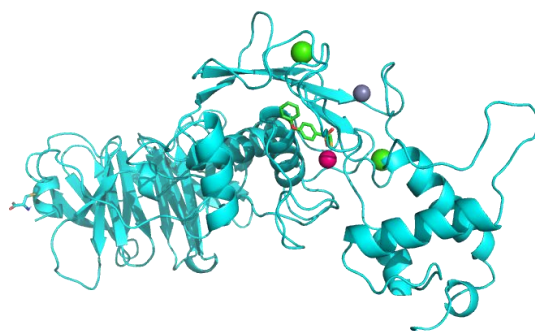


Figura D 2.5 H226Q

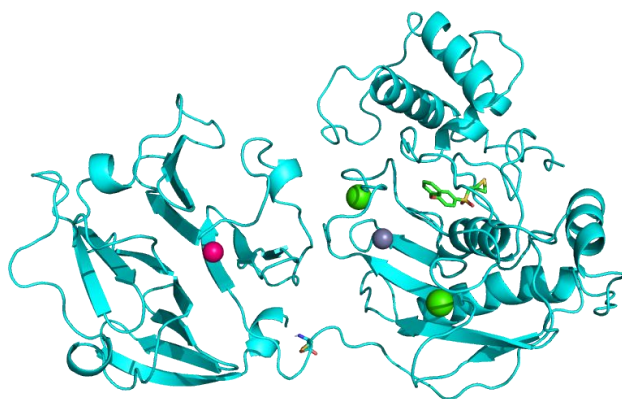


Figura D 2.6 Q374H

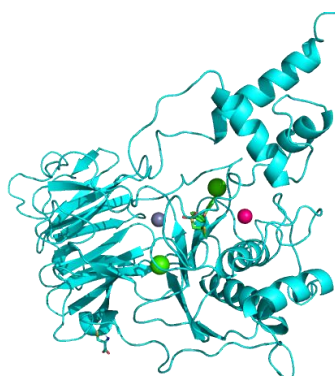


Figura D 2.7 Q376X

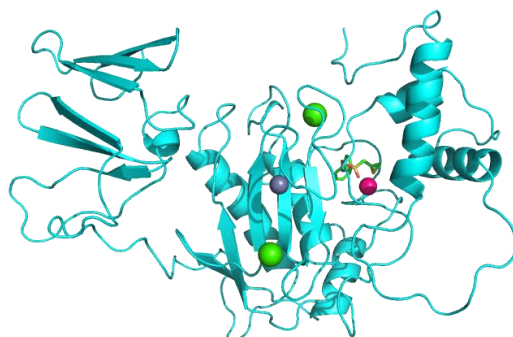


Figura D 2.8 S237Y

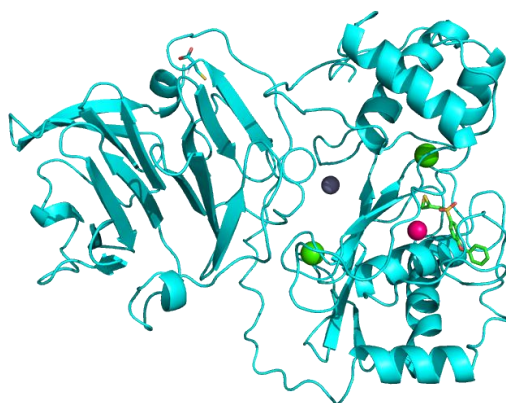
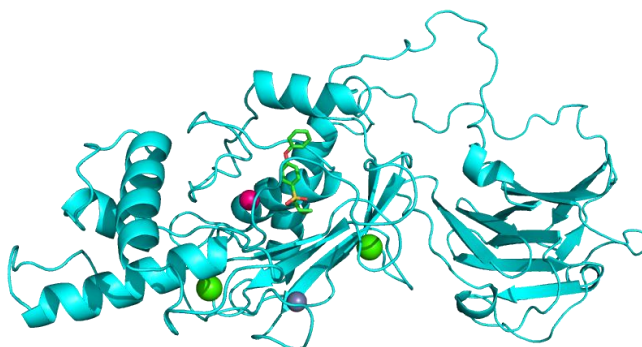


Figura D 2.9 Y454X



Ligante 3 - Minociclina

Figura D 3.1 WT

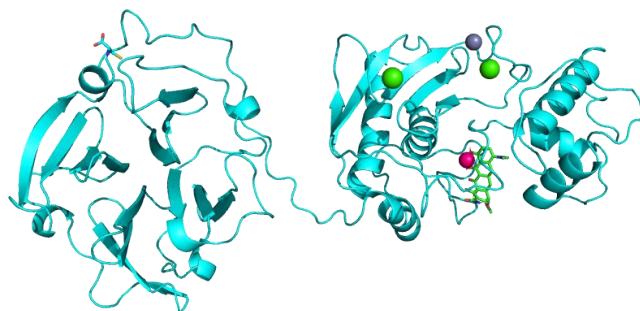


Figura D 3.2 A304G-A349V

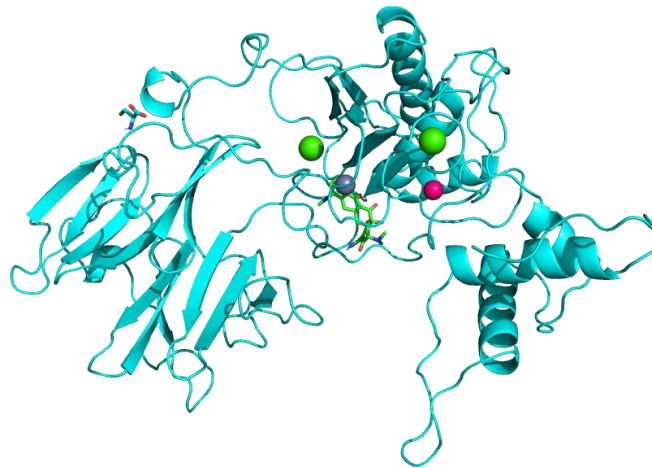


Figura D 3.3 E209Q



Figura D 3.4 H204R

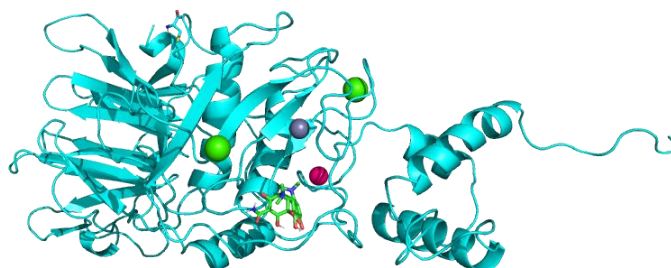


Figura D 3.5 H226Q

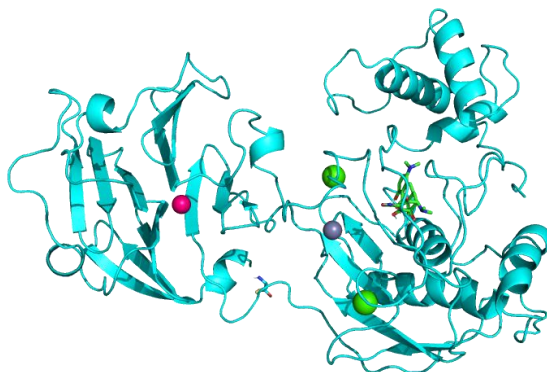


Figura D 3.6 Q374H

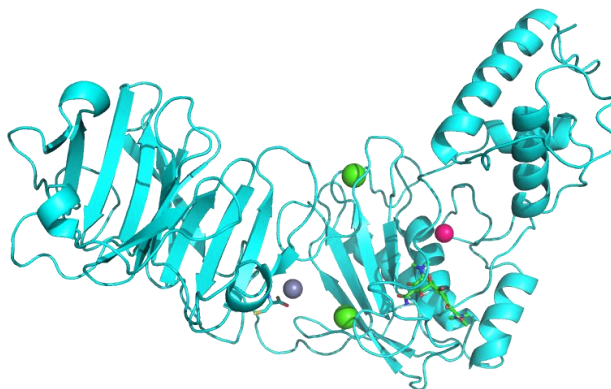


Figura D 3.7 Q376X

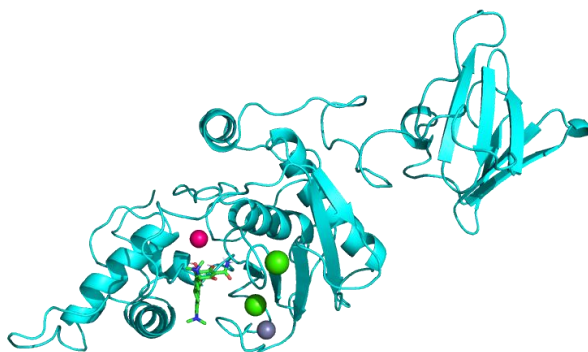


Figura D 3.8 S237Y

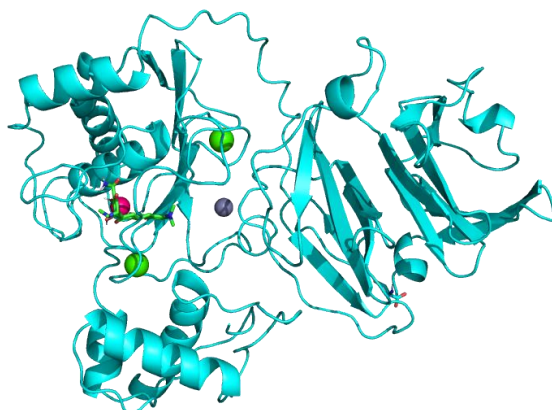
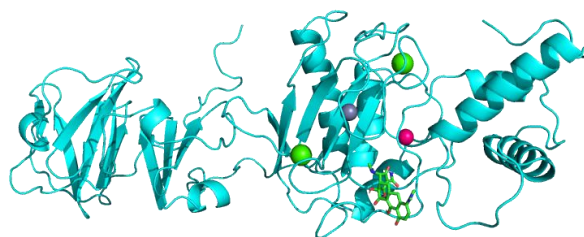


Figura D 3.9 Y454X



Ligante 4 - Marimastat

Figura D 4.1 WT

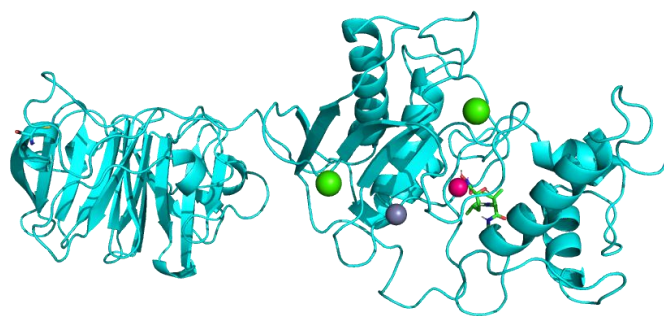


Figura D 4.2 A304G-A349V

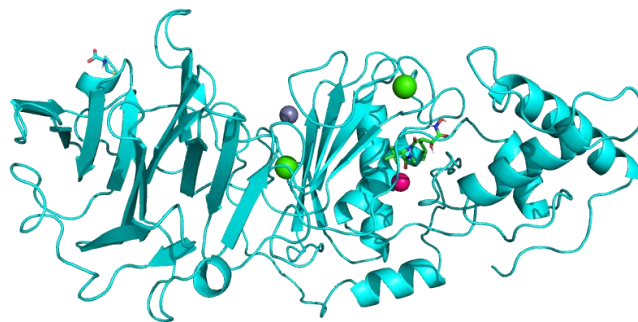


Figura D 4.3 E209Q

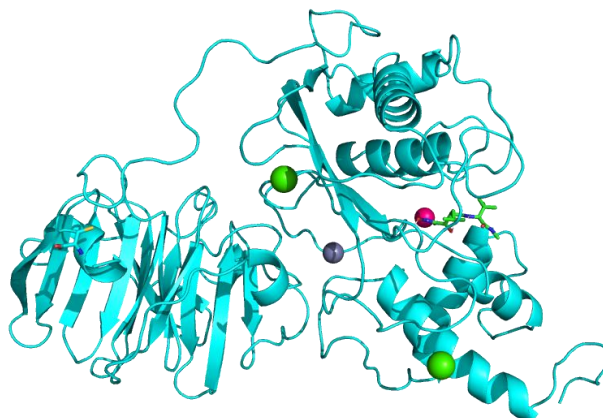


Figura D 4.4 H204R

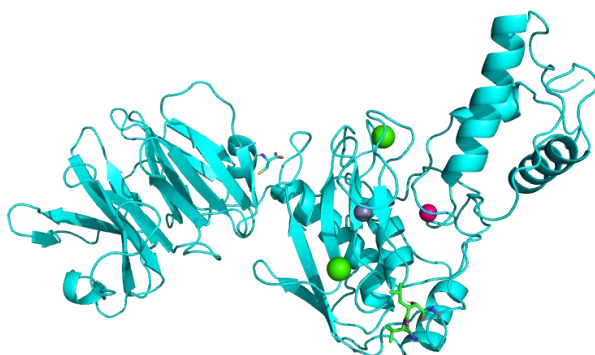


Figura D 4.5 H226Q

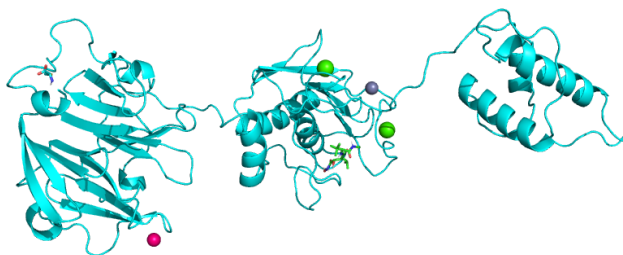


Figura D 4.6 Q374H

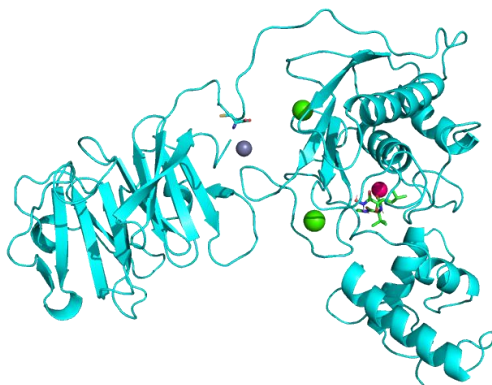


Figura D 4.7 Q376X

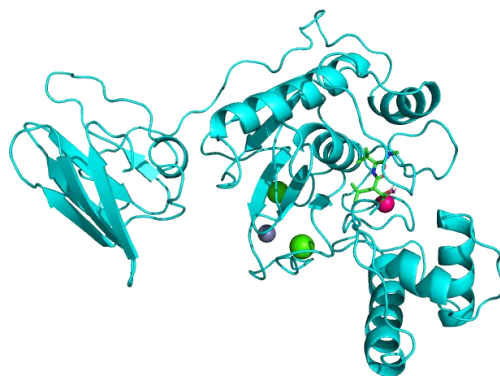


Figura D 4.8 S237Y

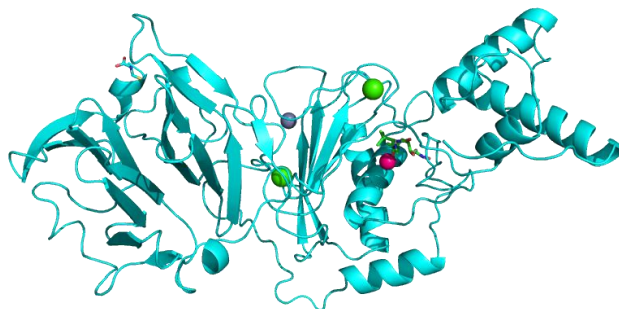
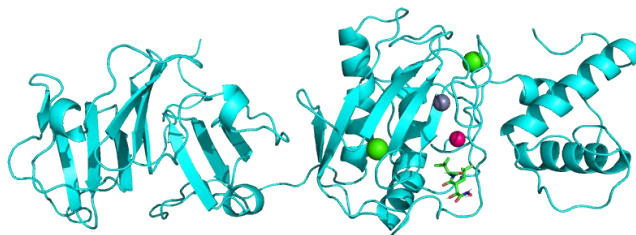


Figura D 4.9 Y454X



Ligante 5 - GM6001

Figura D 5.1 WT

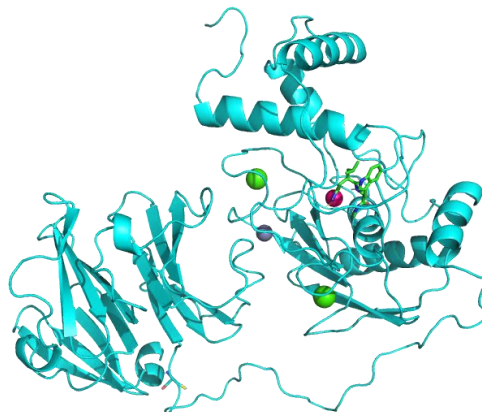


Figura D 5.2 A304G-A349V



Figura D 5.3 E209Q

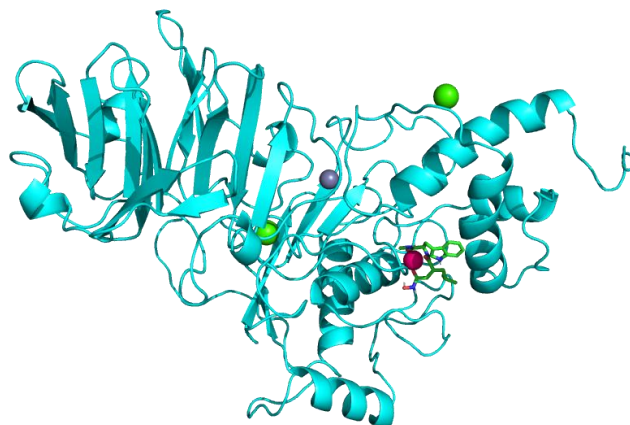


Figura D 5.4 H204R

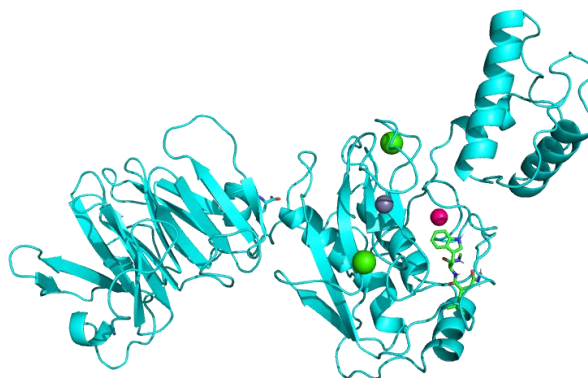


Figura D 5.5 H226Q

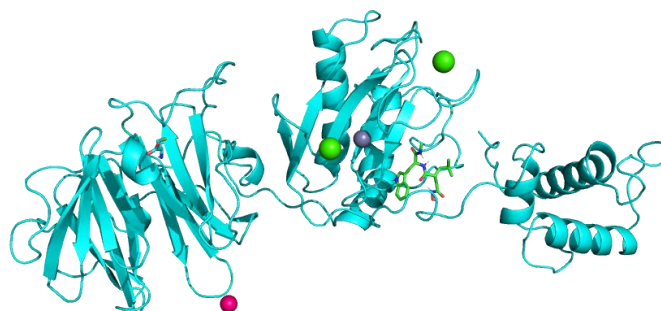


Figura D 5.6 Q374H

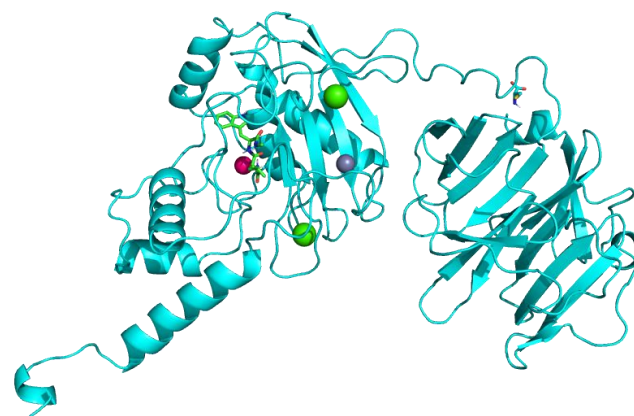


Figura D 5.7 Q376X

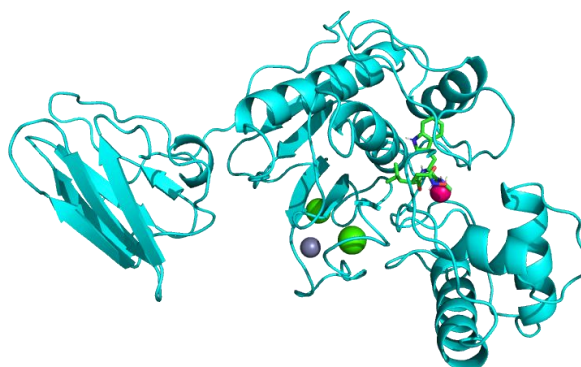


Figura D 5.8 S237Y

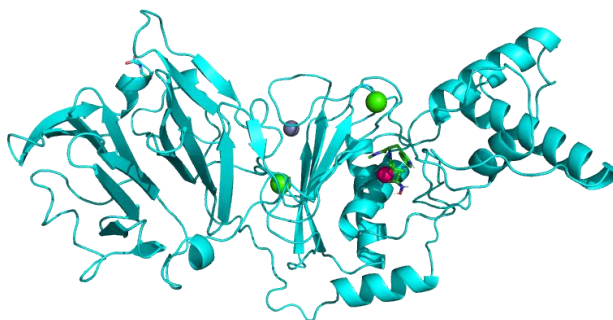


Figura D 5.9 Y454X



Ligante 6 - Doxíciclina-d6

Figura D 6.1 WT

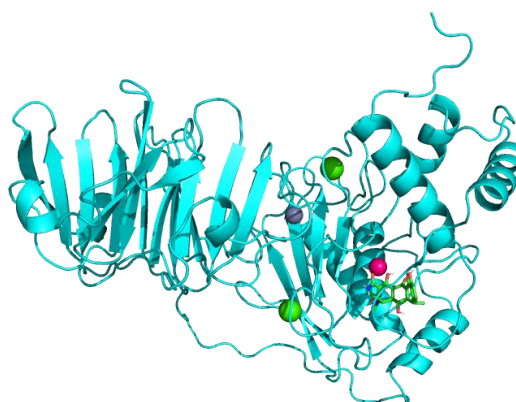


Figura D 6.2 A304G-A349V

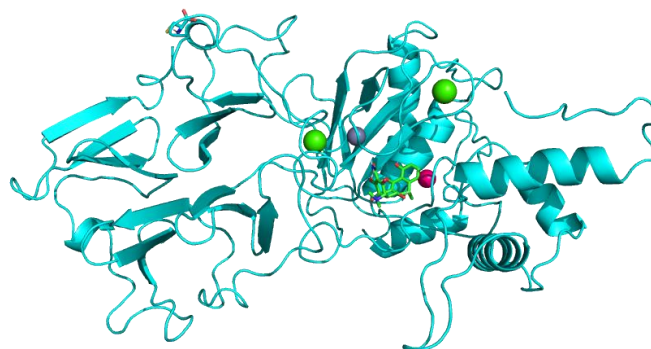


Figura D 6.3 E209Q

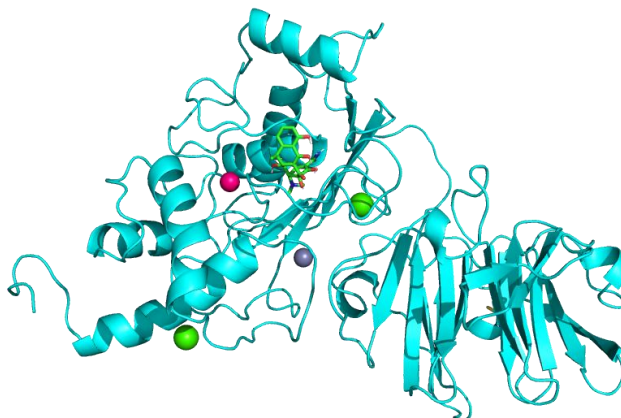


Figura D 6.4 H204R

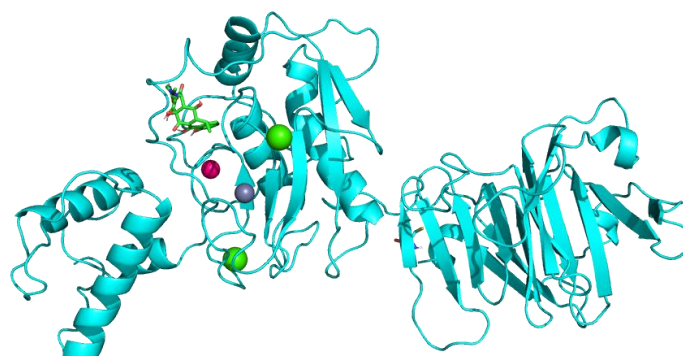


Figura D 6.5 H226Q

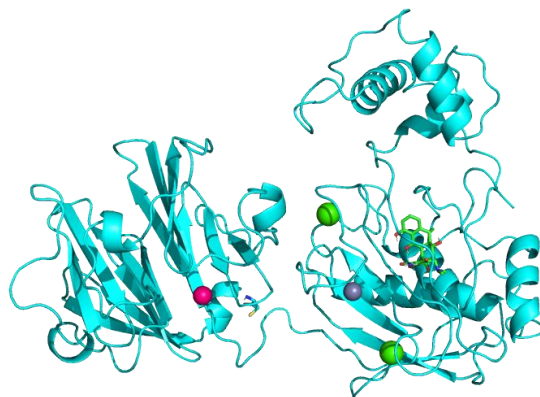


Figura D 6.6 Q374H

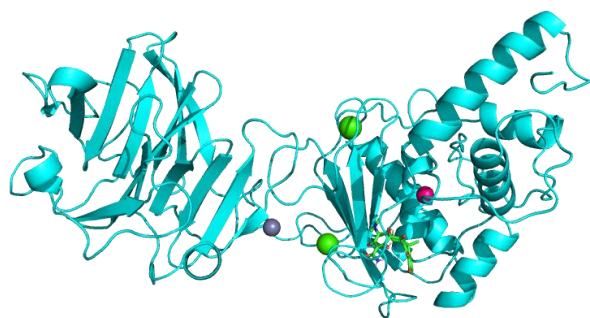


Figura D 6.7 Q376X

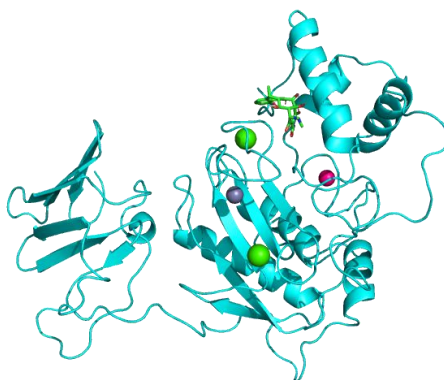


Figura D 6.8 S237Y

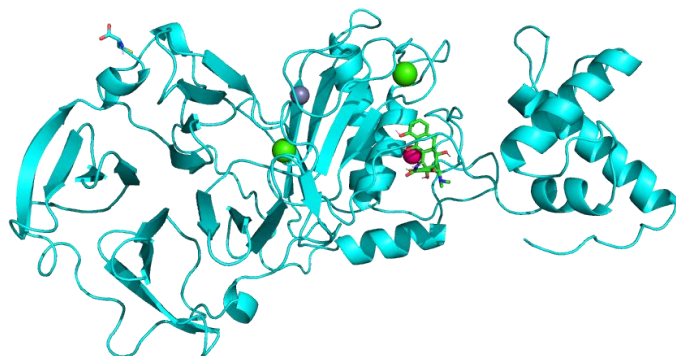
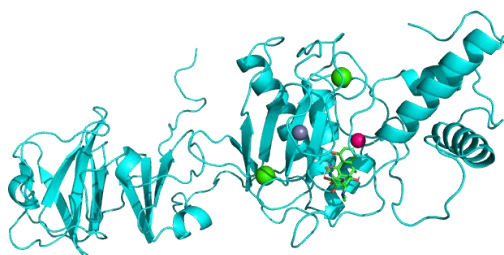


Figura D 6.9 Y454X



Ligante 7 - Curcumina

Figura D 7.1 WT

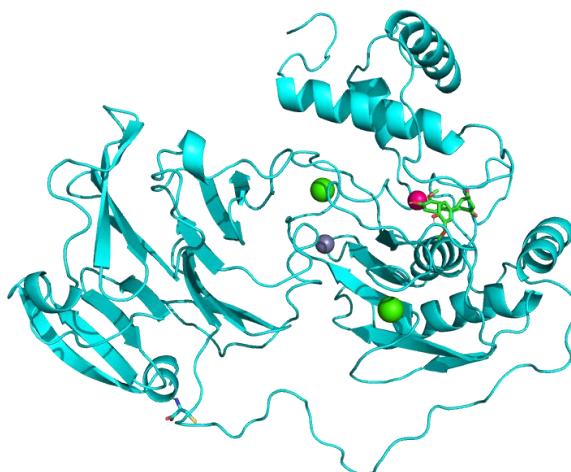


Figura D 7.2 A304G-A349V

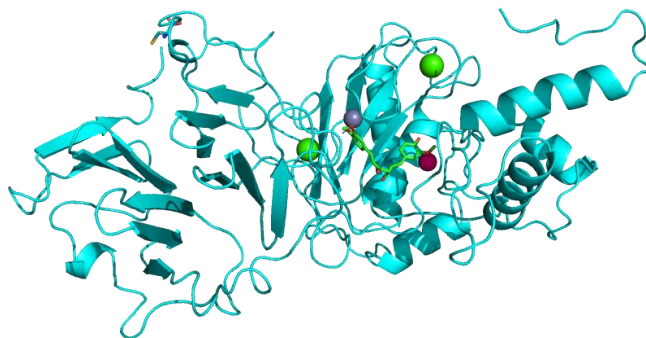


Figura D 7.3 E209Q

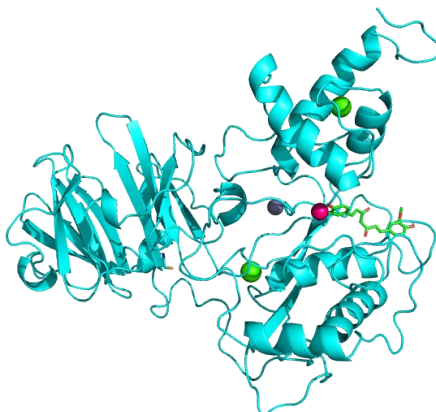


Figura D 7.4 H204R

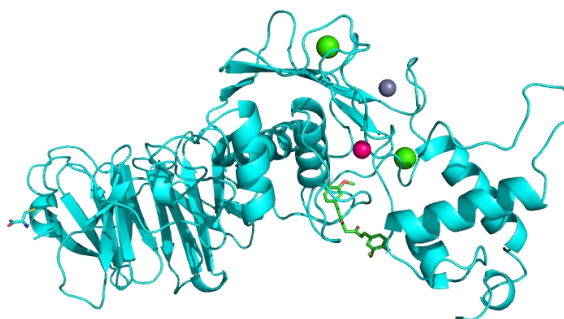


Figura D 7.5 H226Q

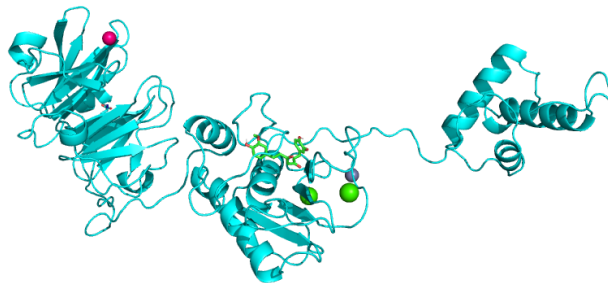


Figura D 7.6 Q374H

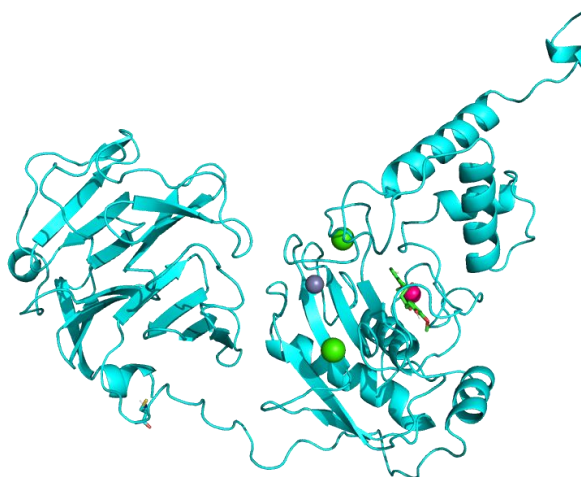


Figura D 7.7 Q376X

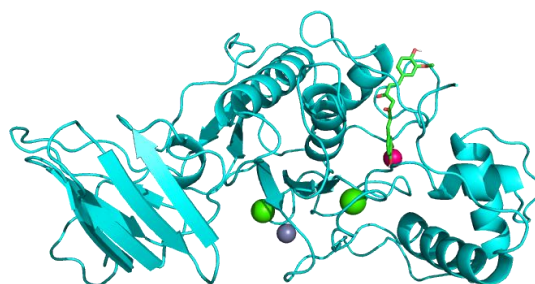
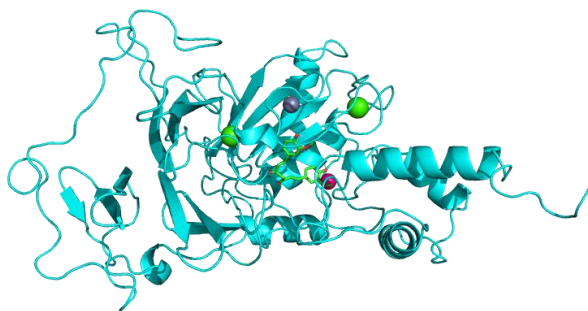


Figura D 7.8 S237Y



Figura D 7.9 Y454X



Ligante 8 - Batimastat

Figura D 8.1 WT

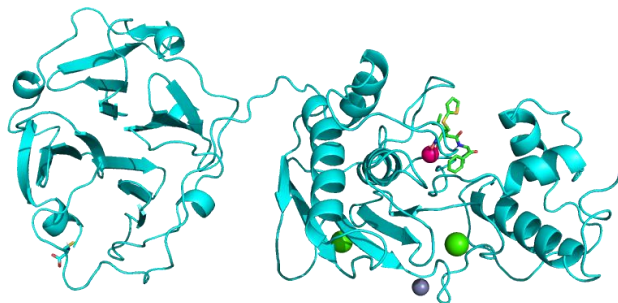


Figura D 8.2 A304G-A349V

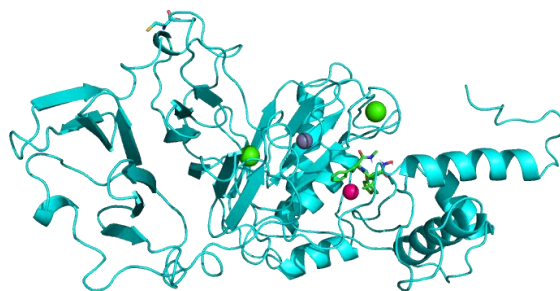


Figura D 8.3 E209Q

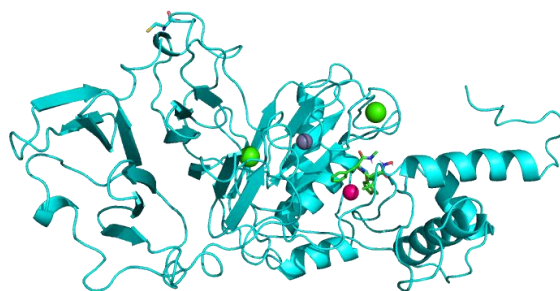


Figura D 8.4 H204R

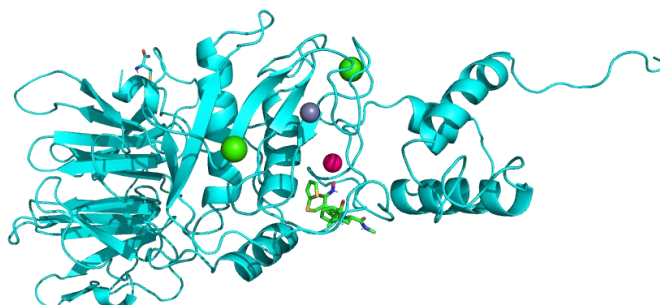


Figura D 8.5 H226Q

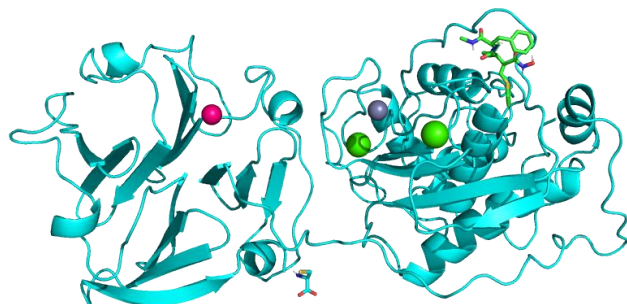


Figura D 8.6 Q374H

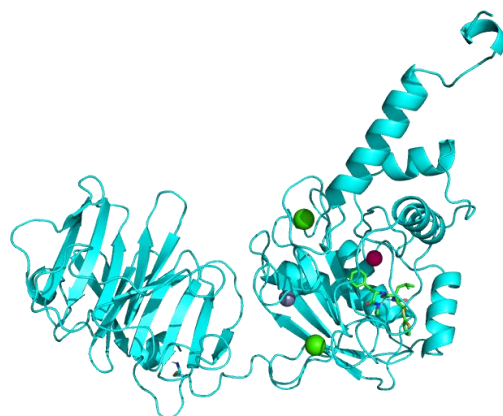


Figura D 8.7 Q376X

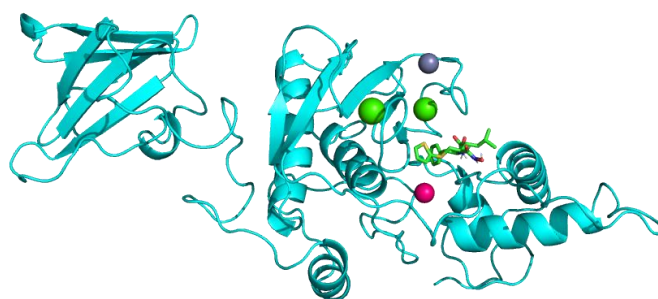


Figura D 8.8 S237Y

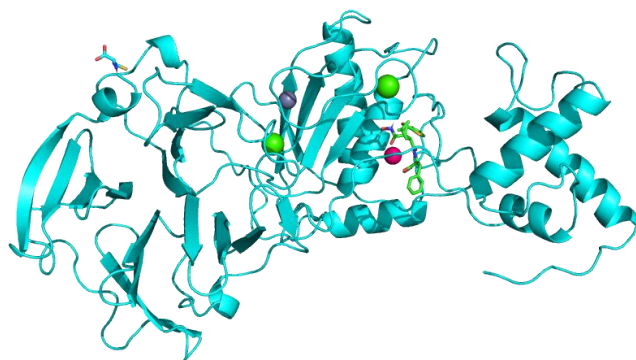
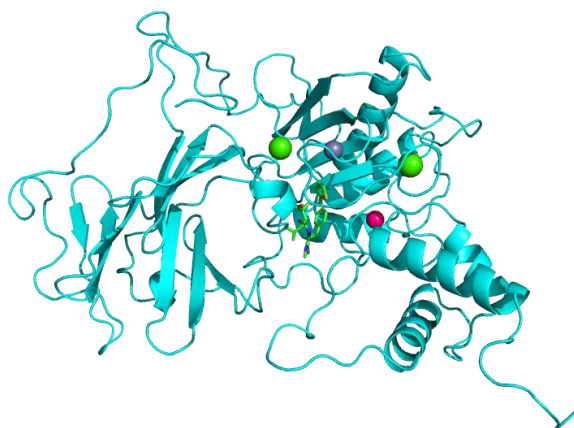


Figura D 8.9 Y454X



Ligante 9 - Andrografolida

Figura D 9.1 WT

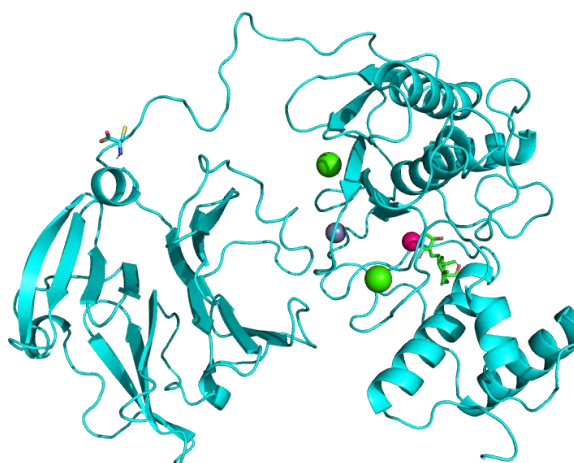


Figura D 9.2 A304G-A349V

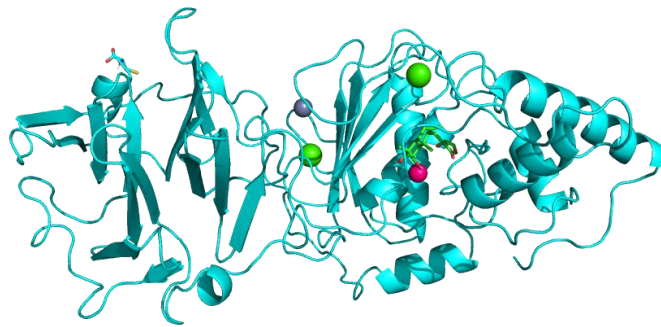


Figura D 9.3 E209Q

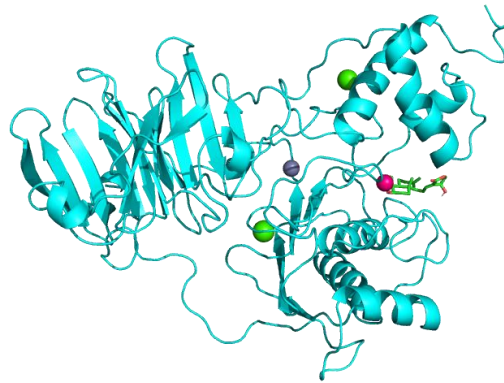


Figura D 9.4 H204R

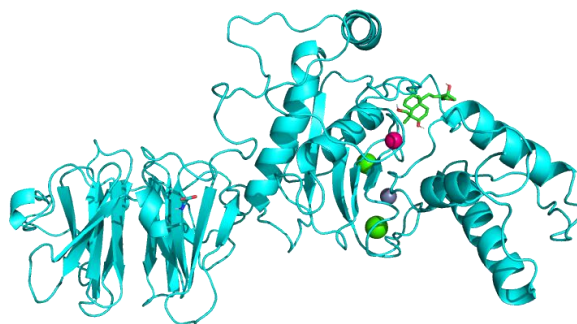


Figura D 9.5 H226Q

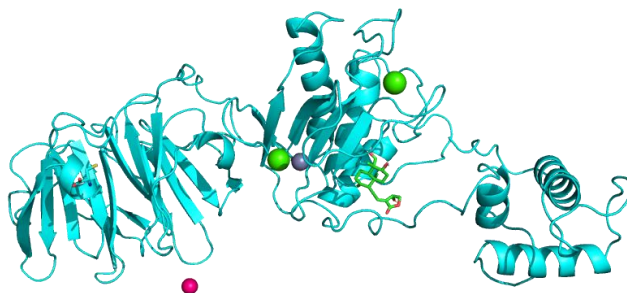


Figura D 9.6 Q374H

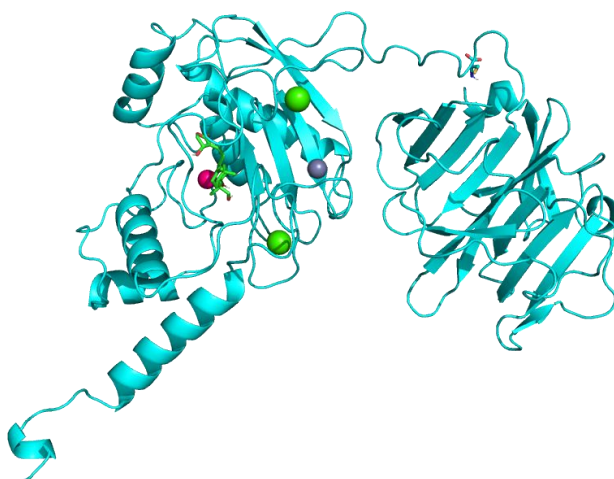


Figura D 9.7 Q376X

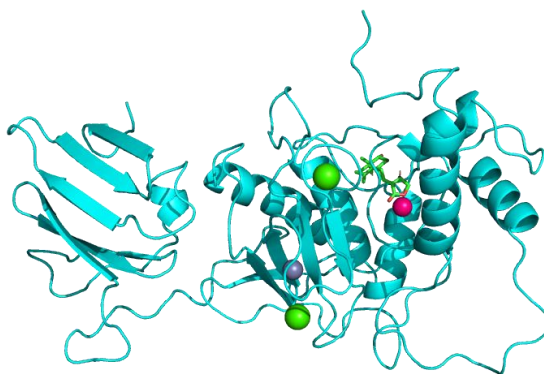


Figura D 9.8 S237Y

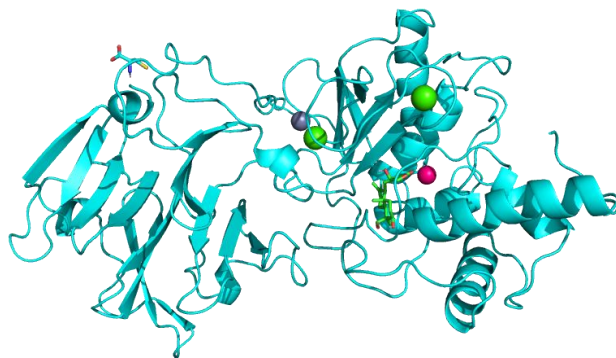


Figura D 9.9 Y454X

