

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Napoleão Fonseca Valadares

**Receptores dos hormônios da tireóide: estudos computacionais,
ressonância plasmônica de superfície e ensaios celulares.**

São Carlos
2008

NAPOLEÃO FONSECA VALADARES

**Receptores dos hormônios da tireóide: estudos computacionais,
ressonância plasmônica de superfície e ensaios celulares.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

São Carlos
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Valadares, Napoleão Fonseca

Receptores dos hormônios da tireóide: estudos computacionais, ressonância plasmônica de superfície e ensaios celulares. /

Napoleão Fonseca Valadares; orientador Richard Charles Garratt.

-- São Carlos, 2008.

173 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada: opção Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Receptores dos hormônios da tireóide. 2. Ensaios celulares. 3. Ressonância plasmônica de superfície. 4. Química medicinal. 5. HQSAR. 5. Ensaio virtual.

I. Título.



FOLHA DE APROVAÇÃO

Napoleão Fonseca Valadares

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada – Opção: Física Biomolecular.

Aprovado em: 08/12/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Richard Charles Garrat

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

Instituição: IQ/USP

Assinatura

Prof. Dr. Jose Daniel Figueroa Villar

Instituição: IME-FED

Assinatura

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Luis Francisco de Assis Rocha Neves

Instituição: UnB

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Napoleão e Marlene, que sempre deram o exemplo, me apoiaram e confiaram no meu discernimento.

Aos meus irmãos, Leonardo e Ronaldo, por estarem sempre presentes, pelo companheirismo e por toda a diversão.

Ao Prof. Dr. Richard C. Garratt, pela indubitável orientação e por ser um modelo de professor e cientista.

A Tony Giannetti e Brandon Bravo, meus amigos orientadores da Roche - Palo Alto.

À Lívia Salum, pelo companheirismo, apoio, discussões e carinhos.

Aos meus amigos mais chegados da vida e do IFSC: Rafael Guido, Dom Bruno, Dom Jack, Luiz Gustavo da Rocha, Rodrigo Robredo, Alexander Balduino, André Ambrosio, Marcelo Castilho, Marcos Calgaro, Nádia Helena, Leonardo, Amanda, João Renato e Huíta.

À Maria, Amanda, Suzana, Marcos Calgaro e Huita pela paciência e ajuda no Lab.

Aos professores e amigos do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – CBME.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

“Reality as we know it is created out of something that is itself not material, but is architectonic for all that can be material. Something that is the abstract plan, the abstract template on which reality might be constructed. That abstract template just is the realm of nothing, hence the divinity of nothing.”

Aos meus pais.

RESUMO

Os receptores dos hormônios da tireóide (TRs) são fatores de transcrição envolvidos na diferenciação celular, metabolismo e funções fisiológicas da maioria dos tecidos. Muitos estudos mostram que diversos efeitos farmacológicos mediados pelos TRs podem ser benéficos na farmacoterapia, especialmente aqueles mediados pelo TR β que podem ser úteis em condições médicas importantes como obesidade, hipercolesterolemia e diabetes. Além disso, a descoberta que o TR α é a isoforma predominante no coração, mediando a maioria dos efeitos cardiovasculares prejudiciais, estimulou a pesquisa por ligantes seletivos para o TR β que poderiam ser utilizados em quadros clínicos importantes com perfil de segurança aceitável. Foi realizado um estudo das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR) de um conjunto de compostos com atividade biológica descrita para TR α e TR β , que gerou modelos de Holograma QSAR com elevada consistência interna e externa, apresentando bom poder de correlação e predição das propriedades biológicas. Também foi realizado um minucioso estudo de triagem virtual, que propiciou a seleção de 7 compostos que foram adquiridos para terem suas atividades biológicas avaliadas. Ensaios de transfecção e gene repórter foram estabelecidos e utilizados na avaliação da atividade biológica dos compostos selecionados pelo ensaio virtual. Finalmente, um ensaio utilizando ressonância plasmônica de superfície (SPR) foi desenvolvido e utilizado para avaliar a atividade agonista desses compostos, e que pode ser útil para avaliar a atividade de novos ligantes. A técnica de SPR também foi empregada em um cuidadoso estudo da interação do TR β com seus correguladores, que incluiu estudos cinéticos e termodinâmicos, propiciando a determinação das taxas cinéticas e parâmetros termodinâmicos para a interação do complexo TR β -T3 com peptídeos derivados de dois de seus correguladores. Os resultados

obtidos são relevantes e devem ser considerados no planejamento de futuros experimentos utilizando o LBD de TR β e agonistas.

Palavras-chaves: Receptores dos hormônios da tireóide, Ensaio celulares, Ressonância plasmônica de superfície, Química medicinal, HQSAR, Ensaio virtual.

ABSTRACT

The thyroid hormone receptors (TRs) are transcriptional factors involved in cell differentiation, development, metabolism and physiological function of most tissues. Many lines of evidence show that several pharmacological actions of TRs might be beneficial in medical therapy, specially those mediated by TR β that target important medical conditions like obesity, hypercholesterolemia and diabetes. Additionally, the findings that TR α is the predominant isoform in the heart and mediates most of the TRs deleterious cardiovascular effects, stimulated the research for selective TR β ligands which could address important medical needs with an acceptable safety profile. In this PhD thesis, studies of the quantitative structure-activity relationships (QSAR) of a dataset of compounds with reported biologic activity for both TR α and TR β were performed, and statistically significant Hologram QSAR models with good predictive ability for untested compounds were created. In parallel, a careful virtual screening procedure was executed, leading to the selection of 7 compounds which were purchased for the evaluation of their biological activities. Cell transfection and reporter gene assays were developed, validated and used to evaluate the biological activities of these compounds. Finally, a surface plasmon resonance (SPR) assay was developed and used to assess the agonistic activity of these compounds. The SPR technique was also employed in a careful study of the interaction between the ligand binding domain of TR β and peptides derived from its coregulators, which included the determination of the kinetic and thermodynamic parameters for this interaction. The results suggest that flexibility plays an important role in the interaction between the receptor and its coregulators, and point out important aspects of experimental design that should be addressed

when using TR β LBD and its agonists. Furthermore, the methodology described here may be useful for the identification of new TR β ligands.

Keywords: Thyroid hormone receptors, Cell based assays, Surface plasmon resonance, Medicinal chemistry, HQSAR, Virtual screening.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Representações esquemáticas da organização estrutural dos receptores nucleares. A representação tridimensional apresenta a estrutura dos domínios mais bem caracterizados estruturalmente (DBD e LBD). 30
- Figura 1.2** Mecanismo simplificado da atuação de alguns receptores nucleares na regulação gênica. Na ausência de ligantes alguns NR podem estar no núcleo da célula complexados a correpressores que possuem atividade deacetilase de histonas, o que mantêm o DNA condensado. Ao interagir com seus ligantes, os NR se dissociam dos correpressores e recrutam coativadores com atividade acetiltransferase, permitindo à maquinaria de transcrição acesso ao gene alvo. 34
- Figura 1.3** Esquema simplificado da regulação da transcrição gênica por receptores nucleares. **(A)** Na ausência de um ligante agonista alguns receptores nucleares podem interagir com correpressores (SMRT e N-Cor) ou deacetilases de histonas. A deacetilação de histonas promove a condensação da cromatina, reprimindo a transcrição dos genes presentes nesse trecho do DNA. **(B)** Quando ligados a agonistas, os receptores nucleares podem recrutar acetiltransferases de histonas e complexos remodeladores de cromatina que promovem o relaxamento da cromatina, preparando o gene para a interação com a maquinaria de transcrição. 35
- Figura 1.4** Estrutura de alguns dos hormônios da tireóide: T3, T4 e Triac. 36
- Figura 1.5** Representação esquemática da estrutura de domínios entre as isoformas do TR. 38
- Figura 3.1** Exemplos de impressão digital molecular e de holograma molecular. 51
- Figura 3.2** Esquema ilustrativo do processo de geração dos hologramas moleculares. 52
- Figura 3.3** Etapas envolvidas na geração de um modelo de HQSAR. 54
- Figura 3.4** Distribuição dos valores de pIC_{50} para os ligantes de $TR\alpha$ e $TR\beta$. 62
- Figura 3.5** Valores de pIC_{50} para os ligantes de $TR\alpha$ e $TR\beta$ no conjunto de dados. Compostos acima da linha apresentam maior afinidade para $TR\beta$ enquanto 62

	compostos abaixo da linha apresentam maior afinidade para TR α .	
Figura 3.6	Valores experimentais e calculados de pIC ₅₀ para o modelo final com 4 componentes principais para o conjunto de dados de 68 ligantes do TR α . Os losangos preenchidos representam os compostos do conjunto treinamento e os quadrados os compostos do conjunto teste	68
Figura 3.7	Valores experimentais e calculados de pIC ₅₀ para o modelo final com 3 componentes principais para o conjunto de dados de 68 ligantes do TR β . Os losangos preenchidos representam os compostos do conjunto treinamento e os quadrados os compostos do conjunto teste.	69
Figura 3.8	Mapas de contribuição de HQSAR para o composto 52. As contribuições positivas para a atividade biológica são representadas pelas cores amarela e verde, enquanto que as negativas pelas cores laranja e vermelha. A cor branca define as regiões neutras. O mapa superior foi gerado utilizando o modelo para o TR α e o inferior com o modelo para o TR β . A figura mostra também as posições dos átomos no anel quinolina e a fórmula estrutural do composto 52, para facilitar visualização.	70
Figura 3.9	Fluxograma simplificado da metodologia de um procedimento de triagem virtual. O esquema indica os procedimentos nas etapas de preparo da base de dados e do alvo molecular, e apresenta os programas utilizados na VS e algumas das técnicas de avaliação dos resultados utilizadas nesse trabalho.	73
Figura 3.10	Exemplo da interface gráfica do programa desenvolvido e utilizado para a manipulação de base de dados de moléculas em formatos mol2 e sdf.	78
Figura 3.11	Representação esquemática simplificada de um algoritmo genético.	85
Figura 3.12	Imagem estéreo do modo de ligação do T3 ao LBD de TR α encontrado experimentalmente (cinza) e do modo de ligação encontrado pelo programa GOLD 2.1 (amarelo). O RMSD entre as duas conformações é 0,33 Å	93
Figura 3.13	Modelo de interação no sítio de ligação do TR α proposto pelo programa GOLD para o composto KM 03218, selecionado independentemente nos dois procedimentos de triagem virtual apresentados nas Tabelas 3.11 e 3.12, onde recebe os códigos MAY7 e MR11 respectivamente.	96

Figura 3.14	Distribuição de peso molecular dos compostos na base de dados ACD filtrada em azul, com eixo das ordenadas a esquerda, e dos 1.000 compostos melhor pontuados pelo procedimento de pontuação por consenso, em vermelho com eixo das ordenadas a direita.	98
Figura 3.15	Estrutura cristalográfica do T3 em complexo com o TR α e modelos de interação no sítio de ligação do TR α propostos pelo programa GOLD para os compostos adquiridos da empresa Maybridge. (A) T3. (B) RJC 02449. (C) KM 03218. (D) KM 06803. (E) KM 06860. (F) CD 07715. (G) HTS 05756. (H) KM 10572.	101
Figura 3.16	Compostos da base de dados Maybridge selecionados e adquiridos.	103
Figura 4.1	Curva de dose-resposta para o T3. Células HeLa transfectadas com o plasmídeo de expressão Gal4DBD-TR β 1LBD e o vetor repórter Gal4-LUC foram incubadas por 20 horas com crescentes concentrações de T3. Os dados se encontram na Tabela 4.1.	110
Figura 4.2	Atividade biológica dos compostos no teste de atividade agonista. Para avaliação de sua atividade agonista, os compostos foram dissolvidos em etanol e utilizados em ensaios de transfecção de dose única em células HeLa. A taxa de ativação de cada composto foi obtida através da razão de sua atividade pela do controle (etanol). Os dados se encontram nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4.	114
Figura 4.3	Atividade biológica dos compostos no teste de atividade antagonista. Para avaliação de sua atividade antagonista, os compostos foram dissolvidos em etanol e utilizados em ensaios de transfecção de dose única em células HeLa onde cada amostra foi tratada com T3. A taxa de ativação de cada composto foi obtida através da razão de sua atividade pela do controle (T3). Os dados se encontram nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4.	114
Figura 4.4	Esquema geral do sistema de detecção de SPR do equipamento Biacore X [®] .	120
Figura 4.5	Sensorgrama típico. As linhas coloridas em azul e verde mostram a variação do sinal de SPR em função do tempo em duas medidas diferentes. As etapas de associação e dissociação estão indicadas no próprio sensorgrama.	121

- Figura 4.6** Sensorgrama mostrando a imobilização do peptídeo DAX1-3 ao sensor chip CM5 pelo método de acoplamento amina. A linha vermelha mostra as medidas realizadas na FC1 e a linha azul as realizadas na FC2. As setas com legendas indicam as injeções de NHS e EDC, do peptídeo DAX1-3 e de N-Etanolamina. Note que todas as injeções ocorreram simultaneamente nas duas células de detecção, à exceção da injeção do peptídeo SRC2-2, que foi injetado apenas na FC2. 125
- Figura 4.7** Sensorgrama proveniente do ensaio com o peptídeo DAX1-3 e diferentes complexos TR-ligantes. As curvas apresentam as etapas de associação e dissociação do complexo TR β -ligantes ao peptídeo, as curvas foram realizadas em duplicatas. A legenda relaciona os ligantes utilizados em cada medida ao código de cores. As concentrações do receptor e dos ligantes foram respectivamente 112 nM e 400 nM. 127
- Figura 4.8** Sensorgrama proveniente do ensaio com o peptídeo DAX1-3 e diferentes complexos TR-ligantes. As curvas apresentam as etapas de associação e dissociação do complexo TR β -ligantes ao peptídeo, diversas curvas foram realizadas em duplicatas. A legenda relaciona os ligantes utilizados em cada medida ao código de cores. As concentrações do receptor e dos ligantes foram respectivamente 186 nM e 800 nM. 128
- Figura 4.9** Sensorgramas referentes ao ensaio com o peptídeo DAX1-3 e os compostos adquiridos da empresa Maybridge. A legenda de cores relaciona os compostos utilizados em cada medida ao código de cores, sendo que a curva referente ao hormônio T3 está apresentada em magenta. As curvas apresentam os dados de associação durante o período de 60 segundos. A concentração de TR β foi de 56 nM e o receptor foi previamente incubado com 0,2 μ M do hormônio T3 ou 10 μ M dos outros compostos. 129
- Figura 4.10** Sensorgrama mostrando as curvas referentes às etapas de associação e dissociação de diferentes concentrações do complexo TR β -T3 ao peptídeo SRC2-2. A concentração do receptor foi de zero, 14, 28, 56, 80, 112, 186, 280 e 373 nM, e a de T3 foi 2 μ M. As linhas negras mostram o ajuste dos dados 131

pelo modelo 1:1 de Lagmuir. O gráfico residual também é apresentado, mostrando resíduos elevados e com tendência sistemática que indica o uso de um modelo não apropriado.

Figura 4.11 Sensorgrama mostrando as curvas referentes ao ensaio de limitação de transferência de massa. Todas as medidas foram realizadas utilizando as concentrações de 56 nM de TR e 2 μ M de T3. A curva vermelha foi feita com um fluxo de 5 μ L/min, a verde com fluxo de 15 μ L/min e a azul com fluxo de 75 μ L/min. O sensorgrama mostra que em todos os casos uma mesma quantidade do complexo TR-T3 se ligou ao sensor chip

132

Figura 4.12 Dependência da taxa de dissociação observada no tempo de associação. Amostras contendo TR β na concentração de 280 nM foram incubadas previamente com 10 μ M de T3 e injetadas por 4, 8, 12, 16 minutos sobre a superfície do sensor chip em que o peptídeo SRC2-2 foi previamente imobilizado. A sobreposição das curvas normalizadas, especialmente as curvas em verde e azul, onde o equilíbrio é atingido, mostram claramente que a taxa de dissociação observada diminui em função do tempo de associação.

135

Figura 4.13 Sensorgrama mostrando os mesmos dados apresentados na Figura 4.13 ajustados pelo modelo de mudança conformacional. O gráfico residual utilizando a mesma escala para fins de comparação também é apresentado, mostrando resíduos baixos e uniformemente distribuídos, um indício de que o modelo utilizado é apropriado.

135

Figura 4.14 Simulação realizada utilizando as taxas cinéticas obtidas pelo modelo de mudança conformacional para os componentes da resposta observada na curva correspondente a concentração de 186 nM apresentada no sensorgrama apresentado na Figura 4.13. A curva em preto corresponde à resposta total, a curva verde a contribuição da espécie AB*, a curva em azul a contribuição da espécie AB e a curva em vermelho a contribuição do efeito de bulk e instabilidade da linha de base. Note que o tempo de associação de 4 minutos (T_a) é menor que o T_{50} , pois as curvas não se cruzam na etapa de associação, portanto o modelo ajustado aos dados experimentais não representa de forma plena as taxas k_{-1} e k_{-2} .

137

Figura 4.15 Sensorgrama e gráfico residual referentes ao experimento planejado de forma que o tempo de associação (T_a) represente de forma correta as taxas k_{-1} e k_{-2} . Foi utilizado um T_a de 1200 segundos e as concentrações de TR β utilizadas foram 56, 80, 112, 140, 186, 224, 280 nM e 373 nM. A concentração de 56 nM foi feita em triplicata, mostrando a reprodutibilidade das medidas. Os dados foram ajustados pelo modelo de mudança conformacional. Foi utilizado o peptídeo SRC2-2, e em todas as curvas a concentração de T3 utilizada foi de 12 μ M. O gráfico residual apresenta resíduos baixos, um indício de que o modelo utilizado é apropriado. 138

Figura 4.16 Simulação dos componentes da resposta observada nas curvas correspondentes as concentrações de 56 e 186 nM do sensorgrama apresentado na Figura 4.15. A curva em preto corresponde à resposta total, a curva verde a contribuição da espécie intermediária AB*, a curva em azul a contribuição da espécie AB e a curva em vermelho a contribuição do efeito bulk. Note que as curvas se cruzam na etapa de associação, portanto o tempo de associação de 20 minutos (T_a) é maior que o T_{50} , portanto o modelo ajustado aos dados experimentais representa ambas as taxas k_{-1} e k_{-2} . 138

Figura 4.17 Dependência da resposta de SPR no tempo de incubação. (A) Superfície com o peptídeo derivado de DAX-1. Uma amostra contendo 373 nM de TR β e 10 μ M de T3 foi injetada imediatamente após o seu preparo e 80, 160 e 240 minutos depois. (B) Superfície com o peptídeo derivado de SRC2-2. Uma amostra contendo 373 nM de TR β e 10 μ M de T3 foi injetada imediatamente após o seu preparo e 2, 4, 6 e 8 horas depois. Em todos os casos a resposta variou em função do tempo de incubação. 142

Figura 4.18 Dependência da resposta de SPR na concentração de hormônio. Amostras recém preparadas contendo 373 nM de TR β e 0.8, 2, 8, 12 e 16 μ M de T3 foram injetadas sobre a superfície do sensor chip em que os peptídeos derivados de DAX1-3 e SRC2-2 foram previamente imobilizados. (A) DAX-1. (B) SRC2-2. A sobreposição das curvas mostra a dependência na concentração de hormônio. 143

- Figura 4.19** Resposta de SPR causada por diferentes ligantes do TR β . Agonistas (T3, GC-1, Triac e T4) produzem uma resposta muito maior que o antagonista (NH-3). (A) DAX-1. (B) SRC2-2. 144
- Figura 4.20** Interação do complexo TR β -T3 com os peptídeos contendo o motivo consenso LXXLL. Concentrações de 56, 80, 112, 140, 186, 224, 280 e 373 nM de TR β foram incubadas com 10 μ M de T3. O ajuste dos dados cinéticos pelo modelo de mudança conformacional também está apresentado. (A) DAX1-3 (B) SRC2-2. 147
- Figura 4.21** Simulação dos componentes da resposta de SPR observada para os dados ajustados na concentração de 186 nM mostrados na Figura 4.20. A simulação foi realizada utilizando as taxas cinéticas obtidas pelo modelo de mudança conformacional [Equação 1]. A resposta total corresponde aos dados ajustados pelo modelo, AB* e AB representam o complexo de encontro e o complexo após a mudança conformacional, respectivamente. (A) DAX-1. (B) SRC2-2. T₅₀ para DAX-1 = 110 s e T₅₀ para SRC2-2 = 1010 s. As simulações foram realizadas utilizando o programa BIAevaluation 4.1. 148
- Figura 4.22** Análise de van't Hoff da interação entre TR β -T3 e DAX1-3. (A) Pelo ajuste linear do K_D obtido por SPR com o modelo de dois estados em 4 temperaturas diferentes obteve-se $\Delta H = -2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S = 5,3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, e um coeficiente de correlação de 0,996. (B) Os valores de K_D obtidos pelo ajuste dos mesmos dados cinéticos ao modelo 1:1 de Langmuir foram representados graficamente em função da temperatura gerando $\Delta H = -2,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S = 5,0 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, e um coeficiente de correlação de 0,997. 150
- Figura 4.23** Interações entre TR β e SRC2-2 induzidas pelo hormônio T3. (A) O His-Phe *switch* do TR β . Ao se ligar T3 forma uma ligação de hidrogênio com His435, o que estabiliza uma interação favorável com o resíduo Phe459 da hélice 12, estabilizando sua posição e formando AF-2. A hélice 12 está colorida em azul, os resíduos envolvidos no His-Phe *switch* estão coloridos de laranja e o hormônio T3 esta colorido de verde. (B) Resíduos da hélice 12 que interagem com SRC2-2. Os resíduos Leu454 e Val458 interagem com a Leu690, que é a 152

primeira Leucina do motivo LXXLL presente em SRC2-2, enquanto o resíduo da hélice 12 que faz parte do grampo carregado, Glu457, interage com duas amidas na cadeia principal de SRC2-2. A hélice 12 está colorida em azul, seu resíduo envolvido no grampo carregado, Glu457, está colorido de laranja, o peptídeo SRC2-2 está colorido em verde e os resíduos de Leucina de seu motivo LXXLL estão rotulados. PDB id: 1BSX.

Figura 5.1 T3, o principal hormônio da tireóide.

159

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Parâmetros de distinção de fragmentos no método HQSAR.	53
Tabela 3.2	Estrutura química dos ligantes de TR α e TR β usados nos estudos de HQSAR.	57
Tabela 3.3	Influência do tipo de fragmento usando o tamanho de fragmento padrão (4 – 7) para o TR α .	63
Tabela 3.4	Influência do tipo de fragmento usando tamanho de fragmento padrão (4 – 7) para o TR β .	64
Tabela 3.5	Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos utilizando a melhor distinção de fragmento (A/B/C/DA) para o TR α .	65
Tabela 3.6	Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos utilizando a melhor distinção de fragmento (A/B/C/DA) para o TR β .	65
Tabela 3.7	Valores de IC ₅₀ preditos e experimentais do conjunto teste obtidos com o melhor modelo para o TR α .	66
Tabela 3.8	Valores de IC ₅₀ preditos e experimentais do conjunto teste (13 compostos) obtidos com o melhor modelo para o TR β .	67
Tabela 3.9	Resultados dos procedimentos de filtragem da base <i>Maybridge</i>	80
Tabela 3.10	Parâmetros do algoritmo genético do programa GOLD.	92
Tabela 3.11	Moléculas mais bem pontuadas pelo método posição por posição na filtragem sem restrição. MAY1 se refere ao composto com melhor pontuação, MAY2 ao composto com a segunda melhor pontuação e assim por diante. As pontuações relativas ao GoldScore e ChemScore estão indicadas. Entre parênteses está a soma das posições relativas ao GoldScore e ChemScore. Também estão indicadas a massa molecular e o log P de cada molécula.	94
Tabela 3.12	Moléculas mais bem pontuadas pelo método posição por posição na filtragem com obrigatoriedade da satisfação de uma ligação de hidrogênio com a arginina 228 do receptor. MR1 se refere ao composto	95

com melhor pontuação, MR2 ao composto com a segunda melhor pontuação e assim por diante. As pontuações relativas ao GoldScore e ChemScore estão indicadas. Entre parênteses está a soma das posições relativas ao GoldScore e ChemScore. Também estão indicadas a massa molecular e o log P de cada molécula.

- Tabela 3.13** Moléculas mais bem pontuadas pelo método posição por posição para a base de dados de compostos com massa molecular entre 300 e 500 Daltons. MM1 se refere ao composto com melhor pontuação, MM2 ao composto com a segunda melhor pontuação e assim por diante. As pontuações relativas ao GoldScore e ChemScore estão indicadas. Entre parênteses está a soma das posições relativas ao GoldScore e ChemScore. Também estão indicadas a massa molecular e o log P de cada molécula. 99
- Tabela 3.14** Compostos adquiridos da empresa *Maybridge*. A primeira coluna apresenta o código associado a cada composto pela empresa *Maybridge*. As três outras colunas mostram que posição cada composto obteve após o procedimento de pontuação por consenso, e conseqüentemente quais as posições desses compostos nas Tabelas 3.11, 3.12 e 3.13. 100
- Tabela 4.1** Resultado dos ensaios de transfecção com T3. 111
- Tabela 4.2** Ensaios de dose única com os compostos RJC 02449 e KM 03218 comprados da empresa *Maybridge*. Para verificar se os compostos apresentam atividade agonista, células HeLa foram incubadas durante 20 horas com cada composto. Para verificar se os compostos apresentam atividade antagonista, células HeLa foram incubadas com T3 e cada composto. 112
- Tabela 4.3** Ensaios de dose única com os compostos KM 10572, KM 06803 e HTS 05756 adquiridos da empresa *Maybridge*. Para verificar se os compostos apresentam atividade agonista, células HeLa foram incubadas durante 20 horas com cada composto. Para verificar se os compostos apresentam atividade antagonista, células HeLa foram 112

incubadas com T3 e cada composto.

- Tabela 4.4** Ensaios de dose única com os compostos KM 06860 e CD 07715 adquiridos da empresa *Maybridge*. Para verificar se os compostos apresentam atividade agonista, células HeLa foram incubadas durante 20 horas com cada composto. Para verificar se os compostos apresentam atividade antagonista, células HeLa foram incubadas com T3 e cada composto. 113
- Tabela 4.5** Repetição dos ensaios de dose única com o composto CD 07715. A atividade biológica apresentada pelo composto foi reproduzida. 113
- Ensaios de toxicidade dos compostos adquiridos da empresa *Maybridge*. Células HeLa foram transfectadas com um plasmídeo contendo o gene da luciferase e a seqüência promotora do CMV, de
- Tabela 4.6** forma a expressar a enzima luciferase constitutivamente. Em nenhum dos casos foi observada a redução na contagem do luminômetro, indicando que os compostos testados não apresentam toxidez na concentração utilizada. 115
- Tabela 4.7** Taxas cinéticas e constantes de associação e dissociação obtidas pelo ajuste das medidas apresentadas na Figura 4.15 pelo modelo de mudança conformacional. 139
- Tabela 4.8** Valores-T das quatro taxas cinéticas obtidas pelo ajuste das medidas apresentadas na Figura 4.5 pelo modelo de mudança conformacional. 140
- Tabela 4.9** Constantes de dissociação aparente e as taxas de associação e dissociação entre os peptídeos derivados de SRC2-2 e DAX-1 e o complexo TR β -T3. 147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
A	Átomo
AC	Acetato
AF-1	Função de ativação de transcrição independente de ligante
AF-2	Função de ativação de transcrição regulada pelo ligante
AR	Receptor de androgênios
ATP	Adenosina trifosfato
B	Ligação
C	Conectividade
CBME	Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural
Ch	Quiralidade
CMC	<i>Comprehensive Medicinal Chemistry</i>
CMV	Promotor do citomegalovírus
Cpd	Composto
CRC	Algoritmo Cíclico de Verificação de Redundância
DA	Doador e Aceptor
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT3	3,5,3'-triiodo-D-tironina
DT4	3,5,3',5'-tetraiodo-D-tironina

EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ER	Receptor de estrogênios
FC1	<i>Flow Cell 1</i>
FC2	<i>Flow Cell 2</i>
GA	Algoritmo genético
GAL4-DBD	Domínio de ligação ao DNA do GAL4
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>
GR	Receptor de glicocorticóides
H	Hidrogênio
H12	Hélice 12 do LBD
HATs	Acetiltransferases de histonas
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina
HL	Comprimento do holograma
HTS	Triagem biológica automatizada em larga escala
HQSAR	Holograma QSAR
hTR α	Receptor dos hormônios da tireóide alfa humano
hTR β	Receptor dos hormônios da tireóide beta humano
HTS	Triagem em Larga Escala
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50%
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K _D	Constante de dissociação

LBD	Domínio de ligação ao ligante
LBDD	Planejamento Baseado na Estrutura do Ligante
Log P	Coefficiente de partição n-octanol/água
LXR	Receptor hepático X
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NCEs	Novas entidades químicas
N-Cor	Correpressor de receptores nucleares
NHS	N-hidroxisuccinimida
NR	Receptor Nuclear
p300	Proteína ligante de CREB
PC	Número ótimo de componentes principais
PDB	Banco de Dados de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
pIC ₅₀	-log IC ₅₀
PLS	Regressão Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PR	Receptor de Progesterona
QSAR	Relações Quantitativas Estrutura-Atividade
RAR	Receptor do Ácido Retinóico
RIP140	proteína de interação com receptores 140
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Distância do Desvio Quadrático Médio
RNA	Ácido ribonucléico
RU	Unidades de ressonância

RXR	Receptor de retinóide X
SBDD	Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor
SDEP	Desvio Padrão do Erro de Predição
SEE	Erro padrão de estimativa
SMRT	Mediador de silenciamento dos receptores de retinóides e de hormônios tireóidianos
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
SRC1	Coativador dos receptores esteróides 1
SRC2	Coativador dos receptores esteróides 2
T1	Monoiodotironina
T2	Diiodotironina
T3	3,5,3'-triiodo-L-tironina
T4	3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina
T _a	Tempo de associação
TETRAC	Ácido 3,5,3',5'-tetraidoacético
TH	Hormônios da tireóide
TIF2	Fator de transcrição intermediário 2
TR	Receptor dos hormônios da tireóide
TR α	Receptor dos hormônios da tireóide alfa
TR α 1	Receptor dos hormônios da tireóide alfa 1
TR α 2	Receptor dos hormônios da tireóide alfa 2
TRAP	Proteína associada ao receptor dos hormônios tireoideanos
TREs	Elementos responsivos a TR

TRH	Hormônio liberador de TSH
TRIAC	Ácido 3,5,3'-triiodoacético
TR β	Receptor dos hormônios da tireóide beta
TR β 1	Receptor dos hormônios da tireóide beta 1
TR β 2	Receptor dos hormônios da tireóide beta 2
TSH	Hormônio estimulador da tiróide
UnB	Universidade de Brasília
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra-Violeta
VS	Triagem Virtual
ΔH	Varição de entalpia
ΔS	Varição de entropia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 Receptores nucleares e o controle da expressão gênica	29
1.2 Receptores dos hormônios tireoidianos.....	35
1.3 Planejamento de novos ligantes.....	39
2 OBJETIVOS.....	45
3 ESTUDOS DE QSAR E TRIAGEM VIRTUAL.....	50
3.1 Estudos de QSAR para os ligantes dos receptores dos hormônios da tireóide.....	50
3.1.1 Holograma QSAR	51
3.1.2 Recursos computacionais	55
3.1.3 Análises de HQSAR	56
3.2 Triagem virtual com os receptores dos hormônios tireoidianos.....	72
3.2.1 Triagem Virtual de Compostos	72
3.2.2 Bases de dados.....	75
3.2.2.1 Filtragem por massa molecular.....	76
3.2.2.2 - Filtragem por tipos de átomos.....	77
3.2.2.3 Filtragem por número de átomos de nitrogênio e oxigênio.....	77
3.2.2.4 Filtragem por número máximo de átomos de halogênios.....	77
3.2.2.5 Filtragem por lipofilicidade (logP).....	78
3.2.3 Desenvolvimento de programas em PERL.....	78
3.2.4 Filtragem da base de dados utilizando programas em PERL	80
3.2.4.1 Filtragem original da base de dados <i>Maybridge</i>	80
3.2.4.2 Filtragem modificada da base de dados <i>Maybridge</i>	82
3.2.5 Preparo do Receptor	82
3.2.6 Programas para ensaio virtual.....	84
3.2.6.1 Métodos de amostragem conformacional.....	85
3.2.6.2 Funções de pontuação.....	86
3.2.6.3 Pontuação por consenso	87
3.2.6.4 Desempenho em um ensaio virtual.....	88
3.2.6.5 Programa GOLD	89
3.2.6.5.1 Função de busca	90
3.2.6.5.2 Função de Pontuação.....	91
3.2.7 Metodologia do ensaio virtual.....	93
3.2.8 Análise dos resultados do ensaio virtual	96
3.2.9 Avaliação da função de pontuação do programa GOLD.....	98
3.2.10 Seleção de compostos para ensaios biológicos	101

4 ENSAIOS BIOLÓGICOS	108
4.1 Ensaios celulares	108
4.1.1 Vetores de expressão dos receptores dos hormônios tireoidianos e genes repórteres	108
4.1.2 Cultura de células, transfecção e ensaio de gene repórter de células HeLa	109
4.1.3 Cálculo da taxa de ativação	110
4.1.4 Padronização dos ensaios	111
4.1.5 Ensaios com compostos adquiridos da empresa <i>Maybridge</i>	112
4.2 Experimentos de cristalização	117
4.2.1 Cristalização	117
4.3 Estudos sobre os receptores dos hormônios da tireóide e seus co-ativadores utilizando ressonância plasmônica de superfície.....	119
4.3.1 Introdução ao equipamento Biacore®	120
4.3.2 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	123
4.3.3 Imobilização de peptídeos ao sensor chip CM5	124
4.3.3.1 Imobilização de peptídeos ao sensor chip CM5 por acoplamento amina.....	125
4.3.3.2 Avaliação e comparação entre os métodos de imobilização de peptídeos ao sensor chip CM5	126
4.3.4 Padronização do método utilizando diferentes complexos TR-ligantes.....	127
4.3.5 Determinação da atividade agonista dos compostos adquiridos da empresa <i>Maybridge</i>	129
4.3.6 Padronização dos ensaios cinéticos	130
4.3.6.1 Ensaios cinéticos preliminares	131
4.3.6.2 Ensaios de limitação de transferência de massa	132
4.3.6.3 Modelo de mudança conformacional	134
4.3.6.3.1 Variação do tempo de associação	135
4.3.6.4 Mudança conformacional e simulação das taxas cinéticas.....	137
4.3.6.5 Parâmetros estatísticos.....	140
4.3.7 Medidas nas condições selecionadas.....	141
4.3.7.1 Imobilização dos peptídeos	141
4.3.7.2 Determinação das condições de regeneração	142
4.3.7.4 Variação no tempo de incubação do receptor com o hormônio	142
4.3.7.5 Variação da concentração do hormônio	144
4.3.7.6 Influência do ligante no complexo receptor-ligante	145
4.3.7.7 Ensaios cinéticos	146
4.3.7.8 Tratamento e análise dos dados cinéticos.....	146
4.3.7.9 Análise de van't Hoff	150
4.3.8 Discussão	151
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	159
5.1 Conclusões e Perspectivas	159
6 REFERÊNCIAS	164

Capítulo 1



Introdução

Nesse capítulo é apresentada uma descrição geral dos receptores nucleares, sua estrutura, função e papel na regulação da expressão gênica. O receptor dos hormônios da tireóide é abordado de forma mais específica; os efeitos farmacológicos e a utilidade terapêutica de alguns de seus ligantes são mencionados. Finalmente, uma breve introdução sobre a Química Medicinal e algumas de suas abordagens são apresentadas.

“And every one of us, when we go into the psychedelic state, this is what we should be looking for. It's not for your elucidation, it's not part of your self-directed psychotherapy, you are an explorer, and you represent our species.

And the greatest good you can do is to bring back a new idea, because our world is endangered by the absence of good ideas. Our world is in crisis because of the absence of consciousness.

And so, to what ever degree, any one of us can bring back a small piece of the picture, and contribute it to the building of the new paradigm, then we participate in the redemption of the human spirit.

And that, after all, is what it's really all about.”

1 INTRODUÇÃO

1.1 Receptores nucleares e o controle da expressão gênica

Os organismos multicelulares utilizam vias específicas de comunicação intercelular para garantir sua organização e, conseqüentemente, seu correto funcionamento durante seu tempo de vida. Essa comunicação é possível devido ao reconhecimento de centenas de moléculas, incluindo macromoléculas e pequenos ligantes endógenos e exógenos. Comumente, esse reconhecimento molecular ocorre por intermédio de proteínas específicas denominadas receptores, cujos diferentes tipos podem estar localizados na membrana plasmática, citoplasma e núcleo da célula. O reconhecimento e a ligação das moléculas sinalizadoras aos seus receptores muitas vezes desencadeiam respostas na célula.

Dentre os receptores localizados no citoplasma¹ e núcleo celular, destaca-se um grupo estruturalmente relacionado de fatores de transcrição denominado superfamília dos receptores nucleares. O seqüenciamento do genoma humano propiciou a identificação de 48 receptores nucleares (NRs), muitos dos quais regulam a expressão gênica de forma dependente de ligante, e apresentam papéis diversos e essenciais na regulação do crescimento, desenvolvimento e homeostase². Membros da superfamília dos receptores nucleares incluem os receptores de hormônios esteróides, como o receptor de estrogênios (ER), receptor de progesterona (PR), o receptor de androgênios (AR) e o receptor de glicocorticóides (GR); receptores de ligantes não-esteroidais, como o receptor dos hormônios da tireóide (TR) e o receptor do ácido retinóico (RAR); assim como receptores que ligam diversos produtos do metabolismo de ácidos graxos e prostaglandinas, como os receptores ativados por

proliferadores de peroxissomos (PPARs) e receptores hepáticos X (LXR).

A superfamília dos receptores nucleares também inclui membros chamados receptores órfãos, identificados por análise comparativa de seqüências como membros dessa superfamília, para os quais ligantes reguladores ainda são desconhecidos, ou cujos candidatos a ligantes fisiológicos ou exógenos foram descobertos apenas recentemente, implicando-os em diversos processos metabólicos^{3,4}. Um bom exemplo é a recente identificação do grupo HEME como ligante para os receptores nucleares órfãos REV-ERB α e REV-ERB β ⁵, que estende os tipos de ligantes conhecidos de NRs para além de hormônios e produtos metabólicos, e sugerindo que NRs podem representar um elo entre o controle do metabolismo e o ritmo circadiano.

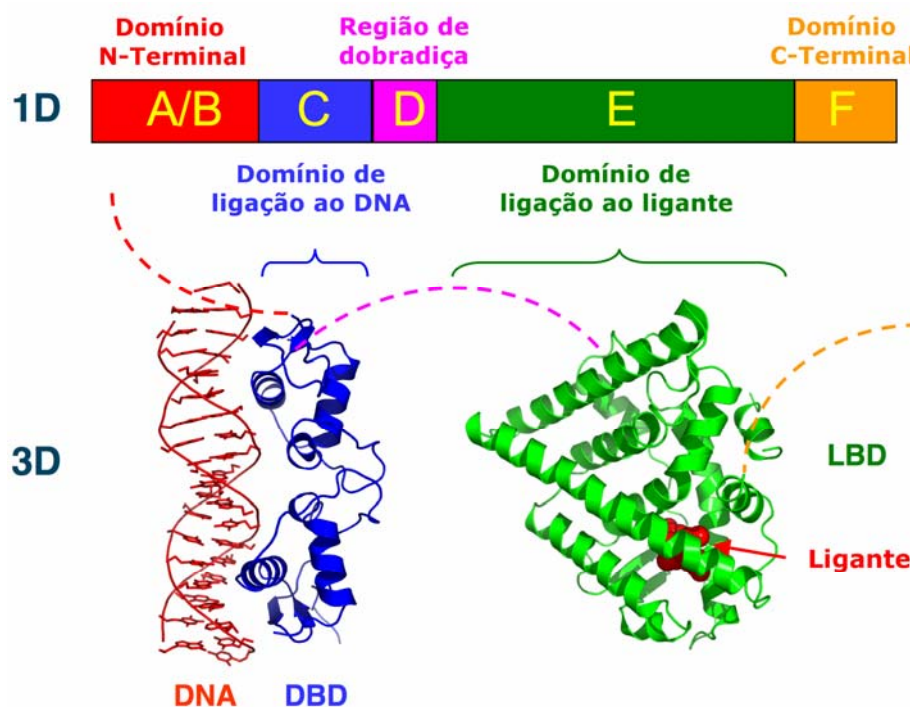


Figura 1.1 – Representações esquemáticas da organização estrutural dos receptores nucleares. A representação tridimensional apresenta a estrutura dos domínios mais bem caracterizados estruturalmente (DBD e LBD).

Estudos bioquímicos e cristalográficos demonstraram que os receptores nucleares possuem dois domínios bem definidos estruturalmente, um domínio C-terminal de ligação ao

ligante (LBD) moderadamente conservado e um domínio de ligação ao DNA (DBD) altamente conservado (Figura 1.1). Apesar da conservação estrutural, os membros da superfamília dos receptores nucleares são funcionalmente extremamente flexíveis em regular a transcrição, por exemplo, eles podem se ligar a elementos responsivos específicos no DNA tanto como monômeros, homodímeros ou heterodímeros. Além disso, alguns receptores como o TR e o RAR podem reprimir ativamente genes-alvo na ausência do ligante, ao passo que, na presença do ligante, os receptores usualmente se tornam eficientes ativadores da transcrição. Por outro lado, foi demonstrado que outros receptores nucleares podem utilizar diferentes mecanismos para inibir a transcrição de forma dependente do ligante⁶.

A primeira estrutura em alta resolução de um LBD de receptor nuclear foi a do receptor de retinóide X (RXR)⁷, obtida por difração de raios-X em 1995. Desde então, estruturas do LBD de aproximadamente metade dos NR foram determinadas⁸, revelando sempre um domínio globular contendo de 11 a 13 hélices arranjadas em 3 camadas de hélices antiparalelas, sendo que o sítio de ligação do ligante se localiza no interior da estrutura. Apesar do arranjo conservado dos LBDs, o volume do sítio de ligação do ligante varia bastante, de 30 Å³ a 1400 Å³, variação que se dá de forma consistente com a função biológica desses receptores⁸. Assim, sítios grandes como o do PPAR permitem que esses receptores liguem diversos metabólitos promiscuamente e com baixa afinidade, ao passo que os sítios menores do TR, ER, PR, GR e AR reconhecem ligantes específicos com alta afinidade, o que é necessário para que esses receptores mediem suas respostas biológicas. Em seus sítios de ligação, esses últimos NRs possuem regiões hidrofóbicas que contornam a forma do ligante, e grupos polares que servem para ligar e orientar ligantes específicos⁴. Juntas essas contribuições permitem aos NRs discriminar entre ligantes estruturalmente relacionados.

O LBD desempenha diversas funções importantes. Como seu nome sugere, o interior do LBD apresenta um sítio de ligação ao seu hormônio ou ligante cognato. Esse domínio

contém uma função de ativação de transcrição regulada pelo ligante (AF-2), responsável pelo recrutamento de diversas proteínas reguladoras capazes de interagir com proteínas remodeladoras da cromatina e com a maquinaria basal de transcrição^{9,10}. Finalmente, o LBD é usualmente o principal mediador de mudanças no estado oligomérico, necessárias para a ligação aos elementos responsivos no DNA.

A principal função do DBD é interagir com seqüências específicas de seis nucleotídeos, chamadas elementos responsivos, e localizadas dentro de promotores regulados por receptores nucleares¹¹. O DBD também pode transmitir informação de forma alostérica para outras regiões do receptor nuclear¹². O DBD se conecta ao LBD por uma curta seqüência de aminoácidos denominada “região de dobradiça”. As propriedades funcionais dessa região ainda não foram totalmente elucidadas, mas sabe-se que essa região de dobradiça pode ser fosforilada, e que sua fosforilação está relacionada a um aumento na ativação transcricional¹³. A maioria dos NR possui uma seqüência N-terminal ao DBD, que pode conter uma função de ativação de transcrição independente de ligante, denominada AF-1. Ao contrário da seqüência AF-2 moderadamente conservada contida no LBD, a seqüência AF-1 apresenta baixa conservação (<15%) entre os membros da superfamília dos receptores nucleares, mesmo entre subgrupos como os receptores de hormônios esteróides (AR, ER, PR).

É importante deixar claro que aqui estão apresentadas apenas algumas características geralmente comuns aos NR, e que cada NR tem suas peculiaridades, por exemplo, alguns NRs também podem ser acetilados no DBD¹⁴, e fosforilados no LBD, DBD e mais comumente na região N-terminal¹⁵.

Os receptores nucleares realizam suas diversas atividades relacionadas à transcrição através do recrutamento de diferentes tipos de proteínas reguladoras, chamados coativadores no caso de propiciar a transcrição, ou correpressores no caso de inibir a transcrição. Essas proteínas reguladoras não interagem exclusivamente com os NR, e são utilizadas de maneira

similar por outros fatores de transcrição que se ligam ao DNA¹⁰. O mecanismo molecular que regula a interação de grande parte dos NR com coativadores e correpressores foi decifrado por estudos cristalográficos, definindo um paradigma comum para a ativação do receptor, no qual a presença do ligante induz a hélice 12 do LBD (H12) a adotar uma conformação que propicia a interação com coativadores. Em geral, na presença de um ligante agonista a conformação da H12 permite a formação de um grupo de cargas (do inglês, *charge clamp*) em que um resíduo de glutamato conservado na H12 e um resíduo de lisina conservado no LBD interagem com as extremidades de uma hélice contendo o motivo LXXLL (onde L significa leucina e X um aminoácido qualquer) presente mais de uma vez na maioria dos coativadores recrutados por receptores nucleares e denominado *NR Box*. Os resíduos de leucina se acomodam num bolsão hidrofóbico no LBD, ao passo que o grupo de cargas orienta e estabiliza as interações¹⁶⁻¹⁹.

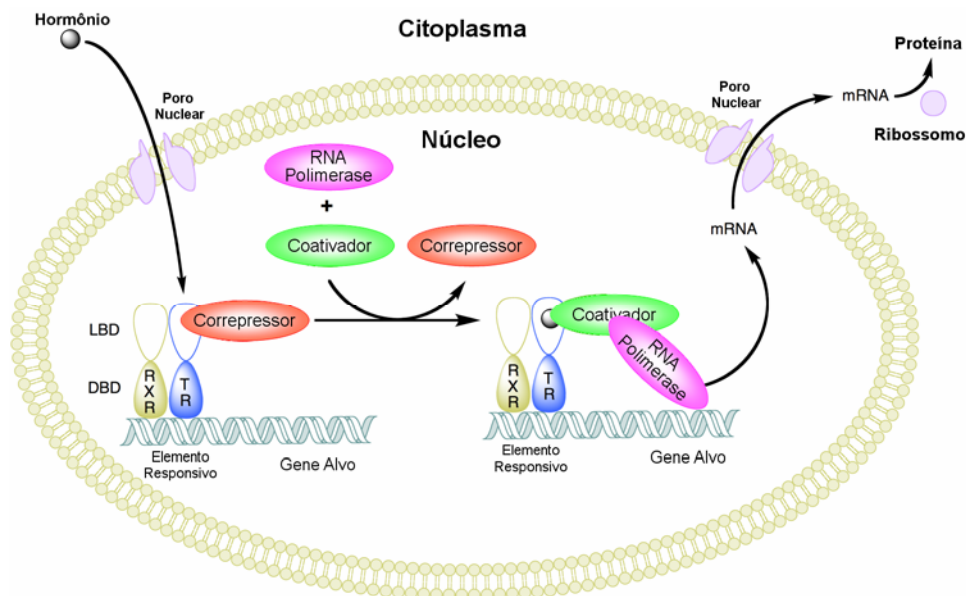


Figura 1.2 – Mecanismo simplificado da atuação de alguns receptores nucleares na regulação gênica. Na ausência de ligantes alguns NR podem estar no núcleo da célula complexados a correpressores que possuem atividade deacetilase de histonas, o que mantém o DNA condensado. Ao interagir com seus ligantes, os NR se dissociam dos correpressores e recrutam coativadores com atividade acetiltransferase, permitindo à maquinaria de transcrição acesso ao gene alvo.

De forma similar, correpressores, como o correpressor de receptores nucleares (N-Cor) e o mediador de silenciamento dos receptores de retinóides e de hormônios tireóidianos (SMRT), podem interagir com alguns NR na ausência de agonistas através de uma hélice de seqüência LXX I/H IXXX I/L. Essa hélice é muito longa para se acomodar no mesmo bolsão hidrofóbico ocupado pelo motivo LXXLL dos coativadores na presença de ligantes agonistas, contudo é capaz de se ligar a essa superfície na ausência de agonistas, devido ao deslocamento da H12. Dessa forma, a ligação de agonistas reduz a afinidade dos NR por correpressores, e aumenta sua afinidade por coativadores (Figura 1.2). Essa estratégia de recrutamento de correguladores também permite a seleção de correpressores recrutados por NR de forma dependente de ligante, como no caso da proteína de interação com receptores 140 (RIP140), que interage com NR através de motivos LXXLL, mas apresenta funções de correpressor⁶.

As células eucariontes armazenam sua informação genética na forma de cromatina, um complexo de DNA e proteínas estruturais e regulatórias. A unidade funcional da cromatina que se repete é o nucleossomo, usualmente 146 pares de bases de DNA empacotados ao redor de um octâmero de histonas. Apesar de esse empacotamento propiciar o benefício de organizar o enorme e complexo genoma no núcleo, ele também pode bloquear o acesso ao DNA, o que torna necessária a existência de fatores que possam modular a acessibilidade ao DNA. Dessa forma, a modificação covalente de histonas e o remodelamento de cromatina de forma ATP dependente desempenham um papel importante na determinação do acesso à cromatina. Essas reações são catalisadas por proteínas ou complexos protéicos que alteram diretamente a estrutura da cromatina, regulando a expressão gênica²⁰. Essa modificação de componentes específicos da cromatina e maquinaria de transcrição, visando certo nível de controle sobre a expressão gênica, pode ser obtida pelas atividades enzimáticas associadas aos complexos correguladores dos NR (Figura 1.2 e Figura 1.3). Nesse contexto, coativadores e

correpressores são componentes de complexos correguladores capazes de modificar histonas covalentemente ou alterar a estrutura do nucleossomo de maneira dependente de ATP (remodelamento de cromatina).

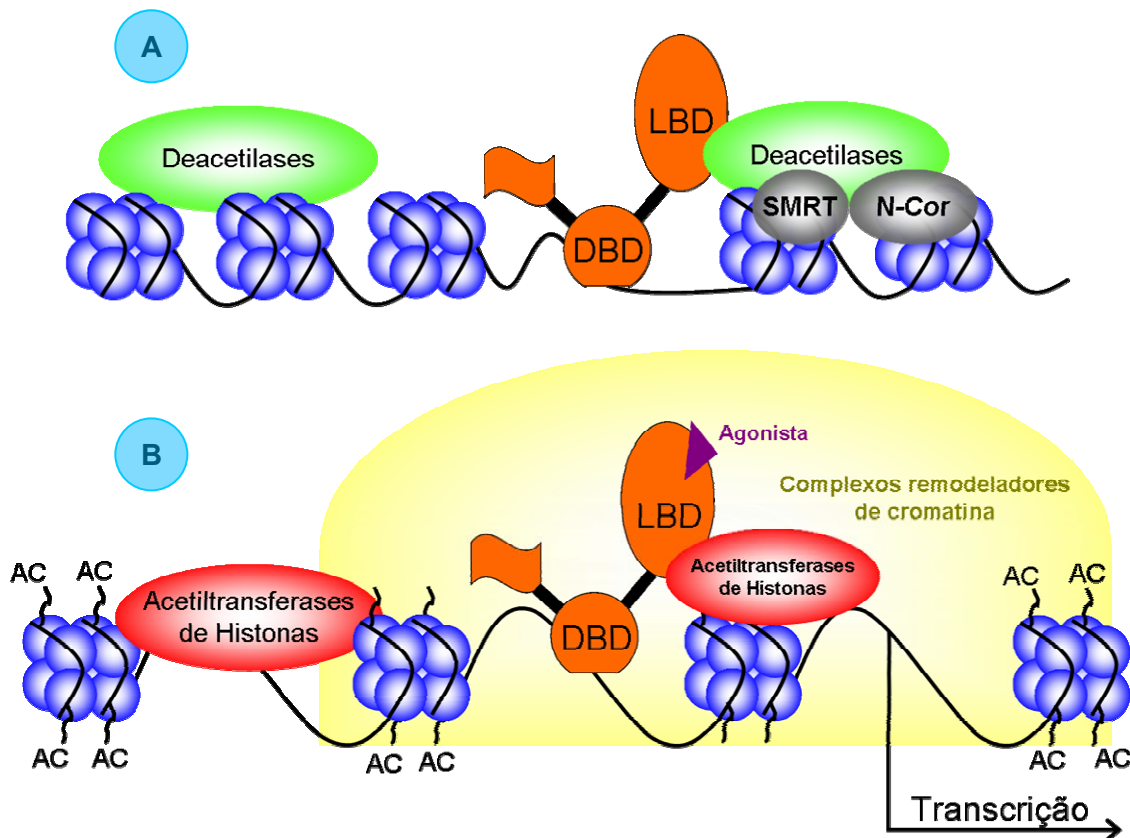


Figura 1.3 – Esquema simplificado da regulação da transcrição gênica por receptores nucleares. (A) Na ausência de um ligante agonista alguns receptores nucleares podem interagir com correpressores (SMRT e N-Cor) ou deacetilases de histonas. A deacetilação de histonas promove a condensação da cromatina, reprimindo a transcrição dos genes presentes nesse trecho do DNA. (B) Quando ligados a agonistas, os receptores nucleares podem recrutar acetiltransferases de histonas e complexos remodeladores de cromatina que promovem o relaxamento da cromatina, preparando o gene para a interação com a maquinaria de transcrição.

A ativação da transcrição gênica envolve duas etapas, a primeira etapa inclui o recrutamento de acetiltransferases de histonas (HATs) como o coativador dos receptores esteróides 1 (SRC1) e a proteína ligante de CREB (p300), que facilitam o remodelamento da cromatina permitindo que os fatores de transcrição acessem as seqüências regulatórias. Na segunda etapa, as HATs são substituídas por coativadores incluindo a proteína associada ao receptor dos hormônios tireoideanos (TRAP) ou o coativador dos receptores esteróides 2

(SRC2 ou TIF2), que ativam a transcrição se ligando à RNA polimerase II e formando o complexo mediado por TRAP. A repressão na ausência do ligante é mediada pelo recrutamento de correpressores como N-Cor e SMRT, que se associam a fatores remodeladores de cromatina e proteínas deacetiladoras de histonas²¹.

Como a maioria dos fatores de transcrição, grande parte dos receptores nucleares é degradada pelo sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma¹⁵. Alguns NRs também apresentam atividades independentes de transcrição, produzindo respostas mais rápidas que as dependentes de transcrição gênica²².

1.2 Receptores dos hormônios tireoidianos

Existem dois principais hormônios tireoidianos (THs) produzidos e secretados pela tireóide, o T4 (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina) e o T3 (3,5,3'-triiodo-L-tironina) (Figura 1.4). O hormônio secretado pela tireóide em maior quantidade é o T4, porém a forma com maior atividade do hormônio é o T3. O T4 que circula na corrente sanguínea é convertido em T3 em vários tecidos por uma enzima específica conhecida como desiodase, que remove um átomo de iodo do T4. Cerca de 30% do T3 é liberado pela glândula tireóide. Os outros 70% são gerados a partir da desiodação do T4 intracelular²³.

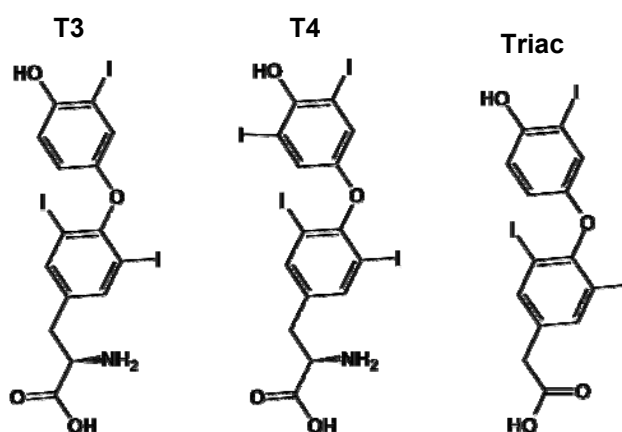


Figura 1.4 – Estrutura de alguns dos hormônios da tireóide: T3, T4 e Triac.

A síntese e secreção dos THs são reguladas por um sistema de retroalimentação negativa que envolve o hipotálamo, hipófise e glândula tireóide²⁴. Fisiologicamente, as concentrações sanguíneas do TRH (hormônio liberador de TSH) produzido no hipotálamo, estimulam a síntese e a liberação de TSH (hormônio estimulador da tireóide) pela hipófise anterior e o TSH, que por sua vez, estimula a produção dos hormônios tireoidianos pela tireóide. Ambos o TRH e o TSH são regulados negativamente pelos THs. O TSH é o regulador primário da liberação e secreção do TH, apresentando também um papel importante no crescimento e desenvolvimento da tireóide.

Além do T3 e T4, existem outras moléculas derivadas de seu metabolismo que apresentam atividade biológica, como a diiodotironina (T2), a monoiodotironina (T1), o ácido 3,5,3'-triodoacético (TRIAC) e o ácido 3,5,3',5'-tetraidoacético (TETRAC), e ainda outros derivados. Esses análogos possuem diferentes potências e afinidades de ligação aos TRs. Em adição a esses compostos endógenos, nos últimos 40 anos, diversos análogos dos THs foram sintetizados na tentativa de definir os requerimentos estruturais para a interação com os TRs e potencialmente descobrir novos agentes terapêuticos. Atualmente já foram planejados e sintetizados compostos com atividade agonista e antagonista para os TRs²⁵.

Pesquisas demonstraram a existência de dois receptores dos hormônios da tireóide, designados de TR α e TR β , localizados em genes diferentes nos cromossomos humanos 17 e 3, respectivamente²⁶. Ambos TR α e TR β se ligam ao T3, sendo a constante de dissociação (K_D) para TR α 58 ± 5 pM e para TR β 112 ± 8 pM,²⁷ e controlam a expressão de inúmeros genes regulados por TH²⁶.

Um processamento alternativo (do inglês, *alternative splicing*) do transcrito inicial do gene do TR α pode gerar dois mRNAs que codificam duas proteínas distintas: TR α 1 e TR α 2 (Figura 1.5). Este último possui 122 aminoácidos a mais na região carboxi-terminal que substitui uma região do TR α 1 que é crítica para a ligação ao TH, o que impossibilita o TR α 2

de se ligar ao T3. Ademais, o TR α 2 se liga aos elementos responsivos a TR (TREs), mas não é capaz de ativar a transcrição de genes responsivos ao TH. Sabe-se que o TR α 2 pode atuar como um inibidor da ação do TH, possivelmente por competição pela ligação aos elementos responsivos²⁸.

Existem também dois outros TRs derivados do gene do TR β ²⁹. Este gene contém duas regiões promotoras, cada uma essencial para a transcrição de um mRNA que codifica proteínas distintas. As isoformas resultantes são designadas como TR β 1 e TR β 2 (Figura 1.5). As seqüências de aminoácidos dos domínios (LBD e DBD) desses dois TR β s são idênticas, porém a porção amino-terminal não apresenta identidade. Desta forma, ambos TR β s se ligam aos TREs e TH com a mesma afinidade e especificidade.

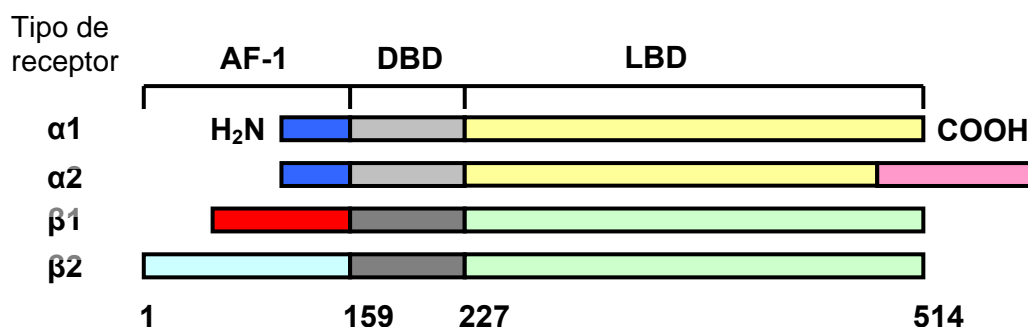


Figura 1.5 – Representação esquemática da estrutura de domínios entre as isoformas do TR.

Os mRNAs do TR α 1 e TR β 1 são expressos em quase todos os tecidos, mas diferem quantitativamente durante o desenvolvimento e de acordo com o tipo celular. Por exemplo, o mRNA do TR α 1 tem sua maior expressão no músculo esquelético, gordura marrom e em altos níveis no coração³⁰, enquanto o mRNA do TR β 1 tem sua maior expressão no fígado, rim e cérebro. Em contraste, o mRNA do TR α 2 tem uma expressão tecido-específica no cérebro e o mRNA do TR β 2 na glândula hipófise anterior e em áreas específicas do hipotálamo, assim

como um papel importante no desenvolvimento do cérebro²⁹. A expressão variada dos subtipos de TRs constitui um mecanismo para a regulação de tecidos de forma seletiva.

Muitos dos efeitos farmacológicos dos THs poderiam ser utilizados na terapêutica médica. Entre eles podemos citar a redução dos níveis séricos de colesterol e a redução do peso corporal^{31,32}. No entanto, o TH não é utilizado no tratamento destas condições porque estes efeitos benéficos são acompanhados pelo aparecimento de efeitos colaterais importantes, como por exemplo, agitação, insônia, taquicardia e a tendência de desenvolver arritmia atrial^{25,32,33}. Desta forma, compostos que promovam os efeitos desejáveis sem induzir as ações deletérias seriam de grande interesse na área médica.

Alguns análogos de T3 foram testados com este objetivo. O efeito farmacológico do TRIAC, DT3 (triiodotironina na forma destrógena) ou DT4 (tiroxina na forma destrógena), foram testados tanto em animais como em ensaios clínicos³⁴. Como resultado, foi demonstrado que o TRIAC possui potencial tiromimético baixo e vem sendo utilizado, para o tratamento da síndrome de resistência ao hormônio da tireóide e, em bases empíricas, para promover o emagrecimento³⁵. Estudos utilizando os análogos DT3 e DT4 também demonstraram a capacidade de diminuir o nível de colesterol plasmático, porém todos eles estão associados ao aparecimento de efeitos adversos como taquicardia e fibrilação atrial³⁵.

Alguns efeitos do TH são específicos para algumas das isoformas, TR β ou TR α . Neste sentido foi observado que camundongos com deleção do gene que codifica o TR β apresentam níveis elevados de TH livre e de TSH e resistência ao hormônio tireoidiano^{36,37}, enquanto que os com deleção do gene para TR α apresentam TSH normal, bradicardia³⁷ e redução da temperatura corpórea de 0,5°C³⁸. Estes dados sugerem que o TR β tem um papel importante na regulação do TSH³⁹, enquanto o TR α na frequência cardíaca basal. Além disto, mais recentemente foi demonstrado que TR α , na ausência do ligante, funciona como um forte repressor da transcrição⁴⁰. A soma destes resultados sugere que um ligante específico para TR α

ou TR β pode apresentar um efeito farmacológico bem distinto. Por exemplo, agonistas para TR β podem ser usados no tratamento da obesidade, hipercolesterolemia e diabetes^{41,42}, antagonistas para TR podem constituir um importante avanço no tratamento do hipertireoidismo^{43,44}, e agonistas ou antagonistas seletivos para as distintas isoformas do TR podem ser sondas farmacológicas úteis no estudo da ação dos receptores de hormônio tireoidiano^{41,44}.

Recentemente, os LBDs de ambos os TRs foram cristalizados e caracterizados estruturalmente em detalhes⁴⁵. Em nível molecular, TR β 1 e TR β 2 possuem os domínios LBDs idênticos, sugerindo que seria muito difícil desenvolver moléculas que interagissem diferencialmente ou regulassem a atividade destes dois TRs. Já o TR α e o TR β possuem domínios LBDs bastante similares, sendo que os sítios de ligação diferem em apenas um resíduo, Ser277 em hTR α é substituído pelo Asn331 em hTR β . Essa sutil diferença permite o desenvolvimento de moléculas capazes de distinguir entre o TR α e o TR β ^{46,47}. Diversos ligantes seletivos para TR β foram planejados e sintetizados, pois evidências recentes sugerem que alguns desses compostos podem ser utilizados no tratamento da obesidade e diabetes, e apresentando um perfil de segurança aceitável devido à redução dos efeitos nocivos mediados pelo TR α ^{25,32}.

1.3 Planejamento de novos ligantes

Diversas abordagens podem ser utilizadas no planejamento de novos ligantes das diferentes isoformas dos TRs. Os estudos do processo de reconhecimento molecular de ligantes pelo receptor-alvo assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento das características estruturais que resultam na afinidade, potência e seletividade dos ligantes. A química medicinal, uma ciência que abrange várias especialidades em caráter complementar, desempenha função central neste complexo

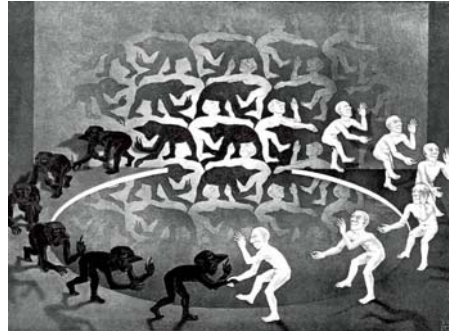
paradigma de descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica^{48,49}. Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a química medicinal envolve a descoberta, desenvolvimento, identificação e interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos. Além da descoberta de moléculas bioativas, a química medicinal também estuda os fenômenos envolvidos no metabolismo e as relações entre a estrutura química e atividade⁵⁰.

As estratégias de planejamento de novos ligantes fundamentam-se no conhecimento prévio do processo patológico da doença e na seleção do alvo molecular adequado⁵¹. O alvo selecionado pode ter a sua estrutura tridimensional conhecida ou não, fato que determina quais as estratégias que serão utilizadas no processo de planejamento⁵². Os grandes avanços da genômica e proteômica, bem como a evolução de técnicas como a cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN), proporcionam um aumento significativo no número de alvos moleculares que possuem suas estruturas tridimensionais disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês, Protein Data Bank)⁵³⁻⁵⁵.

O conhecimento da estrutura do alvo macromolecular, seja este uma enzima ou receptor, ou da estrutura de algum complexo ligante-receptor, permite o planejamento de inibidores enzimáticos, ou de agonistas ou antagonistas de receptores, através de estratégias de planejamento baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês, *structure-based drug design*)^{48,56}. Em contraste, quando a estrutura do alvo macromolecular selecionado não é conhecida, aplicam-se técnicas de planejamento baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês, *ligand-based drug design*) envolvendo o estudo de características multifuncionais de ligantes conhecidos. Em muitos casos, o uso integrado das técnicas de SBDD e LBDD pode gerar informações e novos conhecimentos úteis no planejamento de novos ligantes, explorando a sinergia e complementaridade inerente entre as técnicas⁵⁷.

Com o auxílio de métodos em química medicinal é possível explorar o imenso espaço químico delineando o trabalho investigativo na identificação, seleção e aperfeiçoamento de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado. Várias estratégias em química medicinal podem ser empregadas para a investigação do espaço químico-biológico, como a organização de bases padrões de dados, a aplicação de filtros moleculares, o emprego de triagens biológicas automatizadas em larga escala (HTS, do inglês, *high-throughput screening*) e da triagem virtual (VS, do inglês, *virtual screening*), além do estudo das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR, do inglês, *quantitative structure-activity relationships*). Em todos estes casos, o gerenciamento qualificado da informação possibilita a geração de conhecimento apropriado a partir dos dados disponíveis^{51,58}. As moléculas identificadas através de triagens reais ou virtuais devem ter suas propriedades biológicas determinadas experimentalmente.

Capítulo 2



Objetivos

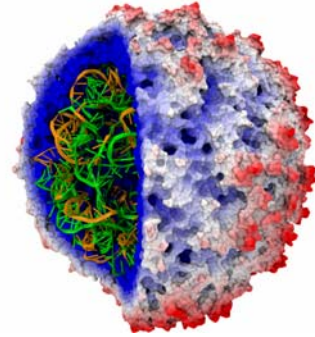
Nesse capítulo são apresentados os objetivos dessa tese de doutorado, envolvendo estudos computacionais, ensaios celulares e de ressonância plasmônica de superfície para elucidar o mecanismo de reconhecimento molecular entre os receptores dos hormônios da tireóide e alguns de seus ligantes.

*“The purpose of life is to survive...
We adapt... We survive...
Don't be trapped by old concepts.
Come and watch.”*

2 OBJETIVOS

Os objetivos fundamentais dessa tese de doutorado são:

- ✓ Realizar triagem virtual de compostos para a identificação de novos ligantes para os receptores dos hormônios da tireóide;
- ✓ Organizar um conjunto de dados padrão de ligantes para as isoformas alfa e beta dos receptores dos hormônios da tireóide;
- ✓ Desenvolver modelos preditivos de QSAR 2D (HQSAR) para o conjunto padrão de dados selecionados;
- ✓ Desenvolver e utilizar ensaios celulares para avaliar as atividades agonistas e antagonistas de compostos para os receptores dos hormônios da tireóide;
- ✓ Realizar ensaios de cristalização utilizando os receptores dos hormônios da tireóide;
- ✓ Utilizar a técnica de ressonância plasmônica de superfície no desenvolvimento de um ensaio capaz de avaliar a atividade agonista de compostos para os receptores dos hormônios da tireóide;
- ✓ Realizar estudos cinéticos para a caracterização cinética, termodinâmica e funcional da interação entre peptídeos derivados de coativadores de receptores nucleares e o receptor dos hormônios da tireóide beta;



Capítulo 3

Estudos de QSAR e Triagem Virtual

Nesse capítulo os métodos computacionais utilizados no estudo dos receptores dos hormônios da tireóide são apresentados. Uma descrição detalhada dos métodos e resultados de QSAR 2D (HQSAR) é apresentada, assim como as estratégias empregadas na adequação de bases de dados de compostos para a utilização nos estudos de triagem virtual visando a obtenção de novos ligantes.

“My guess is that certain problems cause computers to get stuck in a loop. The loop leads to meltdown, but just before they crash they become aware of their own structure. The computer has a sense of its own silicon nature and it prints out its ingredients.”

3 ESTUDOS DE QSAR E TRIAGEM VIRTUAL

3.1 Estudos de QSAR para os ligantes dos receptores dos hormônios da tireóide

Uma das técnicas amplamente empregadas em Química Medicinal para o planejamento de novas entidades químicas (NCEs) candidatas a fármacos é o estudo das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR), que tem sido usado desde o início de 1970 para prever a atividade biológica de novas moléculas⁵⁹. As técnicas de QSAR buscam identificar e quantificar as relações predominantes no complexo campo da modelagem, representadas pelas propriedades da estrutura química e atividade biológica correspondente.

Os métodos de QSAR têm como objetivo encontrar moléculas com propriedades superiores em relação àquelas apresentadas pelo conjunto de dados que deu origem ao processo de modelagem. Para que tais estudos sejam realizados de maneira padrão e comparativa, as moléculas do conjunto treinamento precisam ser quimicamente relacionadas (ocupar o mesmo espaço químico), exercer seus efeitos em um mesmo alvo terapêutico, na mesma cavidade de ligação e através do mesmo mecanismo de ação^{60,61}. A propriedade alvo, geralmente potência ou afinidade, deve ser padronizada e validada para ser útil no desenvolvimento de modelos quantitativos. Propriedades moleculares são calculadas e empregadas como descritores químicos. Métodos estatísticos são usados para produzir uma relação que descreve as variações na propriedade alvo em função dos descritores. Esta relação, denominada QSAR, pode ser utilizada em programas de planejamento para orientar a síntese de novas moléculas com propriedades aperfeiçoadas⁵².

3.1.1 Holograma QSAR

A capacidade de gerar modelos que sejam capazes de prever a atividade biológica e que possam guiar a síntese de compostos com propriedades superiores às das moléculas presentes no conjunto de dados são características principais dos estudos de QSAR. O Holograma QSAR (HQSAR) é uma técnica relativamente nova que evita algumas das dificuldades associadas aos estudos de QSAR clássico ou QSAR 3D, como o cálculo e seleção de descritores físico-químicos, a geração das conformações dos compostos no conjunto de dados e o alinhamento molecular tridimensional. Somente a estrutura 2D dos compostos no conjunto de dados e a atividade biológica são pré-requisitos para a utilização deste método.

O HQSAR é um método de QSAR bidimensional que converte a estrutura molecular em notações lineares, ou seja, seqüências numéricas que codificam a estrutura 2D das moléculas do conjunto de dados. Baseando-se no conceito central do QSAR de que a atividade biológica é função da estrutura molecular, é possível estabelecer relações quantitativas entre a atividade de uma série de moléculas a partir das informações codificadas nos descritores bidimensionais. O método é fundamentado na expansão do conceito de impressão digital molecular, utilizando uma forma estendida de impressão digital molecular conhecida como holograma molecular. O holograma molecular é caracterizado por codificar uma quantidade maior de informação estrutural em relação à impressão digital tradicional. Enquanto o método tradicional utiliza apenas uma notação binária (possui ou não o fragmento), o holograma molecular contém, além de todos os possíveis fragmentos moleculares, uma contagem do número de vezes que cada fragmento ocorre na molécula⁶². A Figura 3.1 apresenta um exemplo de impressão digital molecular e holograma molecular.

Impressões digital molecular	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Holograma molecular	0	0	6	18	0	0	0	12	5	14	42	0	0	0	0

Figura 3.1 - Exemplos de impressão digital molecular e de holograma molecular.

Na técnica de HQSAR, os hologramas moleculares são originários da fragmentação molecular bidimensional. Todos os fragmentos moleculares possíveis (lineares, ramificados, cíclicos, etc) são obtidos e posteriormente distribuídos pelo holograma. Cada posição do holograma (do inglês, *bin*) contém a frequência com que um determinado tipo fragmento aparece na molécula, sendo que fragmentos iguais que ocorrem mais de uma vez são sempre alocados na mesma posição. No exemplo apresentado na Figura 3.1, o holograma molecular que representa uma estrutura química arbitrária contém 97 fragmentos ($6+18+12+5+14+42$). Informações tridimensionais adicionais, como hibridização e quiralidade, são também codificadas nos hologramas moleculares. Desta forma, os hologramas definem a dimensionalidade do espaço ocupado pelos descritores e os modelos de QSAR são desenvolvidos empregando-se a regressão multivariada pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS) e técnicas de validação cruzada. O processo de obtenção do holograma molecular esta resumido na Figura 3.2.

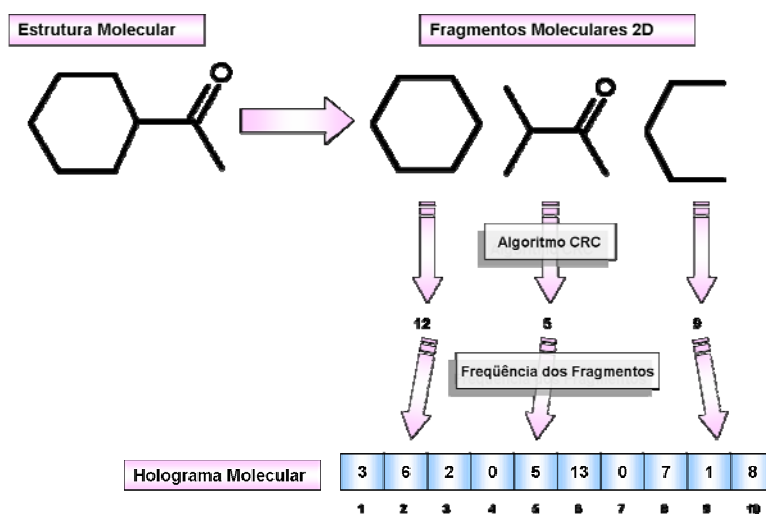
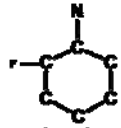
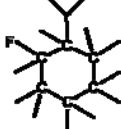
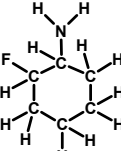
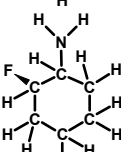
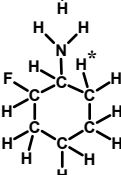


Figura 3.2 - Esquema ilustrativo do processo de geração dos hologramas moleculares⁵².

Durante o processo de modelagem de HQSAR, alguns parâmetros relevantes para a obtenção dos hologramas afetam a qualidade dos modelos. Esses parâmetros são: (i) comprimento do holograma; (ii) tamanho de fragmentos; e, (iii) distinção de fragmentos. O comprimento do holograma define o número de posições no holograma disponível para que diferentes fragmentos sejam incorporados. O tamanho de fragmentos é definido pelos números máximo e mínimo de átomos que são impostos aos fragmentos a serem gerados, enquanto o parâmetro de distinção de fragmentos define as características moleculares que distinguem um fragmento do outro.

Tabela 3.1 - Parâmetros de distinção de fragmentos no método HQSAR.

Distinção de Fragmentos	Definição	Representação
Átomo (A)	Fragmentos são distinguidos com base nos tipos de átomos	CCCCCFN
Ligação (B)	Fragmentos são distinguidos com base nos tipos de ligação: simples, dupla, tripla e aromática	
Conectividade (C)	Fragmentos são diferenciados de acordo com a hibridização dos átomos contidos no fragmento	
Hidrogênio (H)	Fragmentos são diferenciados com base na presença e número de átomos de hidrogênio	
Quiralidade (Ch)	Fragmentos são distinguidos de acordo com a presença de centros assimétricos	
Doador e Aceptor (DA)	Fragmentos são diferenciados com base na presença de átomos aceptores ou doadores de ligações hidrogênio	

O modo como os fragmentos são distribuídos nas posições do holograma influencia diretamente a qualidade dos modelos^{62,63}. O algoritmo cíclico de verificação de redundância

(CRC, do inglês, *cyclic redundancy check*) avalia várias combinações de distribuição de fragmentos nas diferentes posições do holograma molecular para impedir que haja a colisão de fragmentos, ou seja, essa estratégia evita que fragmentos distintos e importantes sejam agrupados numa mesma posição no holograma.

Os parâmetros utilizados para distinguir os fragmentos são variáveis ajustáveis e definem o tipo de informação 2D que será incluída na criação dos descritores. Na Tabela 3.1 estão apresentados os parâmetros de distinção de fragmentos considerados no método HQSAR para o composto 1-amino-2-fluor-hexano. Combinações desses parâmetros são utilizadas para determinar a melhor correlação entre as estruturas e a propriedade-alvo⁶².

O desenvolvimento do modelo estatístico de HQSAR utiliza os hologramas gerados como descritores que são relacionados com a propriedade-alvo através do método PLS (Figura 3.3). Uma vez determinado, o modelo de HQSAR pode ser utilizado para a predição da propriedade alvo de novas moléculas⁶³.

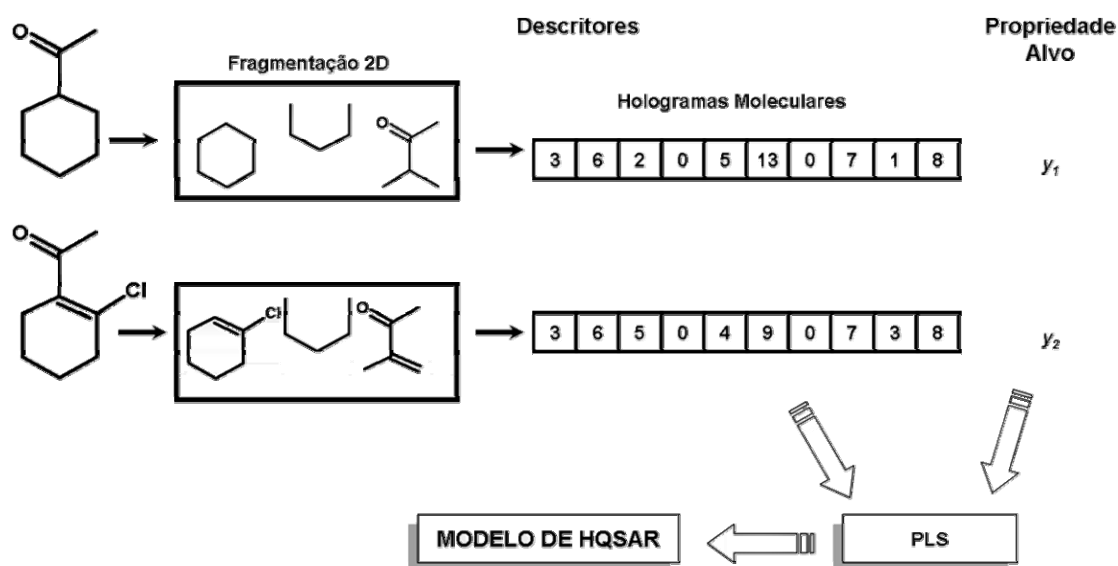


Figura 3.3 - Etapas envolvidas na geração de um modelo de HQSAR.

Além de prever a propriedade-alvo de moléculas ainda não testadas, o método HQSAR fornece importantes informações sobre os fragmentos estruturais associados à

propriedade estudada. Estas indicações são obtidas através da análise dos mapas de contribuição 2D para cada molécula e podem orientar a síntese de novas moléculas com propriedades aperfeiçoadas. Esses mapas utilizam um código de cores para indicar a magnitude da contribuição de diferentes fragmentos moleculares⁶². Esta técnica de QSAR é capaz de gerar modelos com alta capacidade de interpolação e extrapolação em diversos conjuntos de dados.

3.1.2 Recursos computacionais

Os estudos de modelagem molecular, análises estatísticas, construção de modelos de QSAR 2D e triagem virtual foram realizados em estações computacionais no Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (CBME) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP). Os trabalhos foram desenvolvidos em sistemas operacionais Red Hat Enterprise Linux 5, Slackware Linux 9.1 e IRIX 6.5 utilizando as interfaces computacionais SYBYL 7.2 (Tripos, St. Louis, USA), INSIGHTII (Biosym Technologies), GOLD 2.1 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK), FlexX 2.1 (BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germany), DOCK 3.5.54⁶⁴, DOCK 4, DOCK 5.2 (University of California, San Francisco, USA)⁶⁵, Pymol 0.99 (DeLano Scientific, San Carlos, USA), XLOGP 2.0⁶⁶, e CORINA (Molecular Networks).

3.1.3 Análises de HQSAR

A qualidade dos dados biológicos, o intervalo de distribuição da propriedade biológica e a diversidade estrutural dos compostos na base de dados são características relevantes para os estudos de QSAR, pois exercem função importante na qualidade e robustez dos modelos⁶⁷.

A determinação de dados biológicos está sujeita à variação entre laboratórios e até mesmo entre estudos no mesmo laboratório. Este fato pode dificultar a modelagem e a interpretação dos dados biológicos através de estudos de QSAR ou outras técnicas de modelagem molecular. Como consequência, combinar dados de diferentes fontes é considerado um risco para a qualidade do modelo.

Nos últimos anos, uma quantidade razoável de ligantes para os receptores dos hormônios tireoidianos foram desenvolvidos pelo grupo Karo Bio AB em colaboração com Bristol-Myers Squibb, utilizando o planejamento baseado na estrutura do receptor^{27,68-71}. Esses compostos, análogos dos hormônios da tireóide, foram sintetizados e tiveram sua atividade biológica determinada através de ensaios bioquímicos idênticos, no entanto, nenhum trabalho de QSAR foi realizado para esses ligantes. Diante disso, esses dados foram coletados da literatura com o objetivo de criar uma base de dados de ligantes dos receptores dos hormônios da tireóide para realizar estudos de QSAR 2D (HQSAR) e, assim, gerar modelos robustos e que apresentem capacidade preditiva.

A primeira etapa do trabalho envolveu a coleta dos dados da literatura. Esta etapa consistiu na aquisição das estruturas químicas dos análogos, bem como suas respectivas afinidades de ligação. Nesse caso, a propriedade avaliada foi a IC_{50} , que é definida como sendo a concentração do ligante necessária para inibir 50% da ligação do T3 marcado radioativamente ao sítio de ligação do ligante. IC_{50} é classicamente uma medida de potência. Contudo, em ensaios de competição com ligantes radioativamente marcados, em que a atividade observada reflete a capacidade do composto em interagir com o sítio de ligação, o valor de IC_{50} tem sido definido como afinidade de ligação, embora seja quantitativamente diferente do valor da constante de dissociação.

Os valores de afinidade de ligação foram convertidos em pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) e utilizados nos estudos de QSAR. As estruturas químicas e correspondentes valores de pIC_{50} para 68

ligantes de ambas as isoformas dos receptores dos hormônios tireoidianos estão apresentadas na Tabela 3.2.

Nesse estudo, que foi publicado em revista especializada⁷², foram gerados vários modelos de HQSAR para as isoformas α e β dos receptores dos hormônios da tireóide.

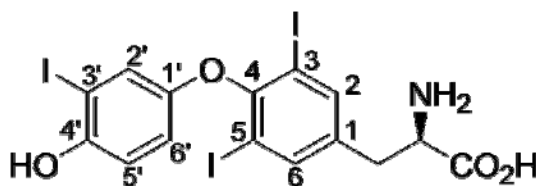
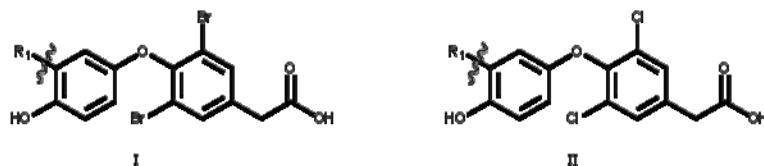


Figura 3.4 - T3, o principal hormônio da tireóide.

Algumas relações entre a estrutura e a atividade desses compostos já são conhecidas, por exemplo, a afinidade para ambas as isoformas aumenta quando o grupo α -amino do T3 (Figura 3.4) é substituído por um átomo de hidrogênio. O átomo de iodo na posição 3' pode ser substituído por um grupo isopropil sem que haja perda de afinidade e, de forma similar, os átomos de iodo nas posições 3 e 5 podem ser substituídos por átomos de bromo ou cloro e ainda manter uma alta afinidade por ambas isoformas. Uma perda significativa na afinidade é observada quando o grupo substituinte na posição 1 é pequeno como o ácido benzóico.

Quanto à seletividade, existe uma tendência de que quando o substituinte na posição 1 for um derivado de ácido acético ou benzóico ao invés de propiônico a seletividade para TR β é favorecida. Adicionalmente quando os átomos de iodo nas posições 3, 5 do T3 são substituídos por bromo e o átomo de iodo na posição 3' é substituído por um grupo isopropil ocorre um aumento de 3 vezes na seletividade. A substituição dos átomos de iodo por outros substituintes pode eliminar a potencial rota metabólica de inativação via desiodação enzimática.

Tabela 3.2 – Estrutura química dos ligantes de TR α e TR β usados nos estudos de HQSAR.

Compostos do conjunto treinamento

Cpd	Estrutura	R ₁	TR α pIC ₅₀	TR β pIC ₅₀	Cpd	Estrutura	R ₁	TR α pIC ₅₀	TR β pIC ₅₀	Cpd	Estrutura	R ₁	TR α pIC ₅₀	TR β pIC ₅₀
1	II		6,57	7,17	2	II		6,84	6,91	3	I		6,30	7,22
4	II		6,25	7,55	5	II		5,98	7,30	6	I		6,69	8,17
7	II		7,60	8,96	8	II		6,09	7,39	9	I		7,82	9,21
10	II		7,00	8,47	11	II		6,90	8,46	12	I		6,91	8,22
13	II		7,40	9,07	14	I		6,61	8,12	15	I		6,64	7,43
16	II		7,89	9,70	17	I		7,30	8,96	18	I		5,94	7,17
19	II		6,91	8,40	20	I		6,55	7,74	21	I		7,03	8,31
22	II		6,53	7,96	23	I		8,81	10,02	24	I		6,62	8,22

Continua

Cpd	Estrutura	R ₁	TR _α pIC ₅₀	TR _β pIC ₅₀	Cpd	Estrutura	R ₁	TR _α pIC ₅₀	TR _β pIC ₅₀	Cpd	Estrutura	R ₁	TR _α pIC ₅₀	TR _β pIC ₅₀
25	I		7,02	8,07	26	I		7,07	8,38	27	I		5,83	7,08
28	I		7,74	9,33	29	II		5,82	6,86	30	I		6,26	7,33
31	II		6,07	7,06										
Cpd			TR _α pIC ₅₀	TR _β pIC ₅₀	Cpd			TR _α pIC ₅₀	TR _β pIC ₅₀	Cpd			TR _α pIC ₅₀	TR _β pIC ₅₀
32			9,62	9,58	33			5,28	5,82	34			5,80	6,09
35			9,85	10,39	36			5,57	6,11	37			6,34	6,72
38			10,39	10,72	39			5,36	5,74	40			4,89	5,74
41			4,70	5,24	42			5,96	6,44	43			5,48	6,85

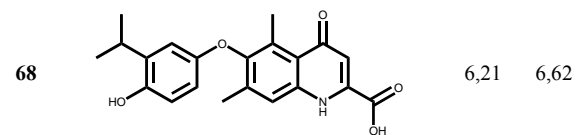
Continuação

cpd	TR α pIC ₅₀	TR β pIC ₅₀	Cpd	TR α pIC ₅₀	TR β pIC ₅₀	Cpd	TR α pIC ₅₀	TR β pIC ₅₀
44	6,20	7,74	45	5,89	7,33	46	6,21	7,80
47	5,92	7,35	48	8,60	9,55	49	8,85	10,22
50	7,42	8,07	51	5,46	7,82	52	6,70	7,82
53	10,00	10,60	54	6,89	7,68	55	9,12	9,82

Compostos do conjunto teste

56	9,85	9,96	57	8,01	8,68	58	6,89	8,54
59	7,74	8,49	60	6,34	7,68	61	7,52	9,11
62	5,93	7,12	63	6,47	8,02	64	6,37	7,45
65	4,58	5,72	66	5,16	6,10	67	6,60	7,29

Continuação



* cpd = composto, $pIC_{50} = -\log(IC_{50})$

Continuação

Para esse conjunto de dados em particular, o HQSAR é uma abordagem especialmente apropriada, pois evita a necessidade da obtenção de um alinhamento molecular dos ligantes, o que pode ser problemático no caso dos tiromiméticos devido à grande flexibilidade conformacional do receptor durante o processo de reconhecimento molecular^{33,68,73,74}.

Desde o início nos preocupamos com as etapas finais de validação dos modelos e com a possibilidade de comparar os modelos para os TR α e TR β . Dessa forma, foi selecionado o mesmo conjunto teste para ambas isoformas, o que foi realizado com a ajuda de análises hierárquicas de agrupamento (do inglês, *hierarchical cluster analysis*) realizadas na plataforma SYBYL 7.2. Essas análises revelaram que os 68 compostos selecionados podem ser agrupados em 4 grupos distintos para ambas as isoformas do TR. Membros de cada grupo foram designados aleatoriamente para um conjunto treinamento com 55 compostos e um conjunto teste com 13 compostos. Essa estratégia garante que ambos os conjuntos representem a diversidade estrutural e o intervalo de pIC₅₀ do conjunto de dados. Assim, todos os modelos aqui descritos utilizam apenas os compostos presentes no conjunto treinamento.

Os valores de IC₅₀ estão bem distribuídos em um intervalo de afinidade de ligação de mais de cinco ordens de magnitude, como mostra a Figura 3.4, explicitamente nos intervalos de 26 μ M a 0,1 nM para o TR α e de 5,7 μ M a 0,019 nM para o TR β . Contudo, a maioria dos compostos apresenta alguma seletividade para o TR β , como pode ser visto na Figura 3.5.

Para realizar o aperfeiçoamento dos modelos de HQSAR, foi determinada a influência da distinção e do tamanho dos fragmentos nos parâmetros estatísticos, em todos os comprimentos de hologramas disponíveis por padrão na plataforma SYBYL (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, 401).

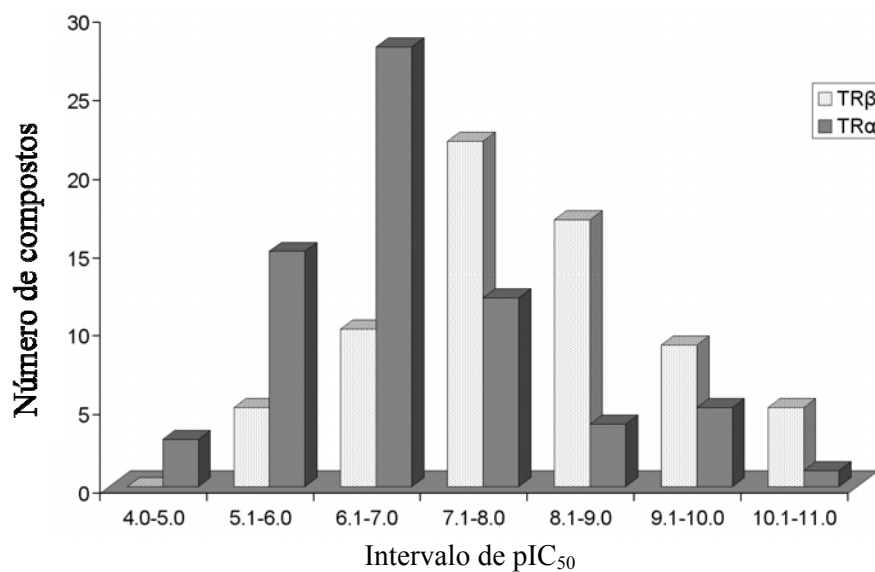


Figura 3.4 – Distribuição dos valores de pIC₅₀ para os ligantes de TRα e TRβ.

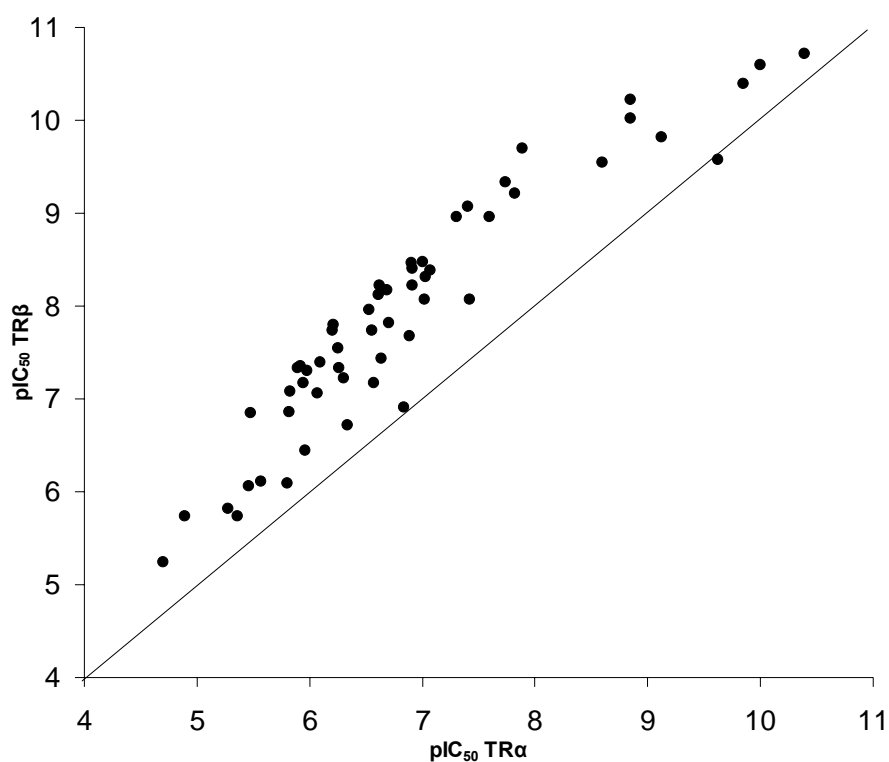


Figura 3.5 – Valores de pIC₅₀ para os ligantes de TRα e TRβ no conjunto de dados. Compostos acima da linha apresentam maior afinidade para TRβ enquanto compostos abaixo da linha apresentam maior afinidade para TRα.

Seguindo o código apresentado na Tabela 3.1, os tipos de fragmentos utilizados para gerar os modelos de HQSAR foram AB, ABC, ABCH, ABCHCh, ABCHChDA, ABCHDA, ABH, ABHCh, ABCCh, ACDA, ACHDA, ABCChDA, ABDA, ABCDA, ACChDA.

As Tabelas 3.3 e 3.4 apresentam os 15 modelos utilizando o tamanho de fragmento padrão (4-7) e todos os diferentes tipos de fragmento para o $TR\alpha$ e o $TR\beta$, respectivamente.

Tabela 3.3 – Influência do tipo de fragmento usando o tamanho de fragmento padrão (4 – 7) para o $TR\alpha$.

Distinção do fragmento	Parâmetros estatísticos - $TR\alpha$					
	q^2	SDEP	r^2	SEE	HL	PC
AB	0,53	0,92	0,85	0,53	307	4
ABC	0,69	0,75	0,86	0,50	353	4
ABCH	0,63	0,82	0,83	0,55	307	4
ABCHCh	0,62	0,83	0,83	0,56	307	4
ABCHChDA	0,63	0,81	0,84	0,54	307	4
ABCHDA	0,64	0,80	0,82	0,57	151	4
ABH	0,63	0,82	0,86	0,50	353	4
ABHCh	0,59	0,86	0,81	0,59	401	4
ABCCh	0,68	0,76	0,85	0,53	151	4
ACDA	0,64	0,80	0,84	0,54	257	4
ACHDA	0,62	0,83	0,84	0,53	401	4
ABCChDA	0,75	0,67	0,89	0,44	353	4
ABDA	0,67	0,77	0,87	0,49	307	4
ABCDA	0,77	0,65	0,90	0,41	353	4
ACChDA	0,63	0,82	0,84	0,53	257	4

Distinção de fragmentos: A, átomo; B, ligação; C, conectividade; H, hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, doador e aceptor. q^2 , coeficiente de correlação da validação cruzada; SDEP, desvio padrão do erro de predição; r^2 , coeficiente de correlação; SEE, erro padrão da correlação; HL, comprimento do holograma; PC, número ótimo de componentes principais.

Tabela 3.4 – Influência do tipo de fragmento usando tamanho de fragmento padrão (4 – 7) para o TR β .

Distinção do fragmento	Parâmetros estatísticos - TR β					
	q^2	SDEP	r^2	SEE	HL	PC
AB	0,42	1,04	0,76	0,67	151	3
ABC	0,58	0,90	0,80	0,61	151	4
ABCH	0,54	0,94	0,77	0,66	401	4
ABCHCh	0,53	0,95	0,81	0,61	307	4
ABCHChDA	0,59	0,88	0,78	0,65	59	4
ABCHDA	0,60	0,86	0,79	0,63	307	3
ABH	0,49	0,98	0,75	0,69	401	4
ABHCh	0,50	0,98	0,76	0,67	401	4
ABCCh	0,57	0,90	0,80	0,61	151	4
ACDA	0,52	0,95	0,73	0,71	71	3
ACHDA	0,53	0,94	0,78	0,64	401	4
ABCChDA	0,68	0,77	0,85	0,52	353	3
ABDA	0,65	0,82	0,85	0,53	307	4
ABCD	0,69	0,76	0,87	0,50	353	3
ACChDA	0,51	0,97	0,80	0,61	257	4

Distinção de fragmentos: A, átomo; B, ligação; C, conectividade; H, hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, doador e receptor. q^2 , coeficiente de correlação da validação cruzada; SDEP, desvio padrão do erro de predição; r^2 , coeficiente de correlação; SEE, erro padrão da correlação; HL, comprimento do holograma; PC, número ótimo de componentes principais.

Para ambas as isoformas, observou-se que a distinção de fragmento que apresentou os melhores resultados foi átomo/ ligação/ conectividade/ doador & receptor (A/ B/ C/ DA), com parâmetros estatísticos significativamente melhores que os demais modelos. Adicionando outros parâmetros de distinção de fragmentos há uma redução nos coeficientes estatísticos q^2 e r^2 .

Posteriormente, foi explorada a influência dos diferentes tamanhos de fragmento⁶⁷ nos parâmetros estatísticos dos modelos com a distinção de fragmento A/ B/ C/ DA, como mostrado nas Tabelas 3.5 e 3.6.

Tabela 3.5 – Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos utilizando a melhor distinção de fragmento (A/B/C/DA) para o TR α .

Tamanho do fragmento	Parâmetros estatísticos - TR α					
	q^2	SDEP	r^2	SEE	HL	PC
2 – 5	0,72	0,71	0,85	0,53	61	4
3 – 6	0,76	0,65	0,87	0,47	151	4
4 – 7	0,77	0,65	0,90	0,41	353	4
5 – 8	0,78	0,63	0,90	0,43	401	4
6 – 9	0,76	0,66	0,89	0,44	401	4
7 – 10	0,74	0,68	0,88	0,47	353	4
8 – 11	0,72	0,71	0,88	0,47	353	4

q^2 , coeficiente de correlação da validação cruzada; SDEP, desvio padrão do erro de predição; r^2 , coeficiente de correlação; SEE, erro padrão da correlação; HL, comprimento do holograma; PC, número ótimo de componentes principais.

Tabela 3.6 – Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos utilizando a melhor distinção de fragmento (A/B/C/DA) para o TR β .

Tamanho do fragmento	Parâmetros estatísticos - TR β					
	q^2	SDEP	r^2	SEE	HL	PC
2 – 5	0,64	0,82	0,82	0,59	61	4
3 – 6	0,64	0,82	0,81	0,59	151	3
4 – 7	0,69	0,76	0,87	0,50	353	3
5 – 8	0,68	0,78	0,86	0,51	401	4
6 – 9	0,66	0,81	0,86	0,52	401	4
7 – 10	0,65	0,81	0,87	0,49	401	4
8 – 11	0,60	0,87	0,84	0,55	353	4

q^2 , coeficiente de correlação da validação cruzada; SDEP, desvio padrão do erro de predição; r^2 , coeficiente de correlação; SEE, erro padrão da correlação; HL, comprimento do holograma; PC, número ótimo de componentes principais.

Analisando as Tabelas 3.5 e 3.6 pode-se observar que o aumento do tamanho do fragmento não resultou em mudanças significativas nos valores dos coeficientes estatísticos dos modelos, embora os sete intervalos de tamanho de fragmentos tenham resultado na seleção de comprimentos de holograma que forneceram o melhor valor de q^2 diferentes para o TR α e o TR β . A seleção de diferentes comprimentos de hologramas sugere um diferente nível

de ocupação das posições do holograma durante o processo de distribuição de fragmentos. Sendo assim, pode-se inferir que tipos de fragmentos importantes para diferenciar ligantes com maior e menor afinidade por TR α foram mais bem distinguidos no modelo com tamanho de fragmento 5–8 e comprimento de holograma 401 e, para TR β , com tamanho de fragmento 4–7 no holograma com comprimento igual a 353, ambos com a distinção A/ B/ C/ DA.

Também foram avaliados outros modelos, pois os parâmetros de alguns modelos são estatisticamente muito semelhantes, contudo os modelos selecionados, ambos com distinção A/ B/ C/ DA e tamanho de fragmentos de 5 - 8 para TR α e de 4 - 7 para TR β , se mostraram os melhores modelos.

Como uma etapa adicional de validação foi empregada a estratégia de LMA (“deixe muitos de fora”, do inglês, *Leave-Many-Out*), dividindo o conjunto treinamento em grupos de 5, 10 e 15 compostos. Os resultados não foram significativamente diferentes dos obtidos pelo procedimento de validação cruzada empregado anteriormente LOO (“deixe um de fora”, do inglês, *Leave-One-Out*), sugerindo que os valores de q^2 representam de forma apropriada o poder preditivo dos modelos.

Esses resultados demonstram que o processo de aperfeiçoamento do modelo foi bem sucedido, uma vez que houve um aumento na capacidade preditiva interna e redução dos erros associados, mesmo com um baixo número de componentes principais.

A fase final do estudo do QSAR consiste na validação externa do modelo, na qual os modelos gerados com as moléculas no conjunto treinamento são utilizados para prever as atividades biológicas dos compostos no conjunto teste, que não foram utilizadas na calibração dos modelos.

Tabela 3.7 - Valores de IC₅₀ preditos e experimentais do conjunto teste obtidos com o melhor modelo para o TR α .

Código	pIC₅₀ experimental	pIC₅₀ predito	Resíduo^a
56	9,85	9,88	-0,03
57	8,01	8,45	-0,44
58	6,89	6,50	0,39
59	7,74	7,36	0,38
60	6,34	6,31	0,03
61	7,52	6,97	0,55
62	5,93	6,37	-0,44
63	6,47	6,94	-0,47
64	6,37	6,66	-0,29
65	4,58	5,14	-0,56
66	5,16	4,98	0,18
67	6,60	5,79	0,81
68	6,21	6,71	-0,50

^aDiferença entre o valor de pIC₅₀ experimental e predito.

Utilizando essa metodologia foram calculados os valores preditos de IC₅₀ para as 13 moléculas do conjunto teste, apresentados na Tabela 3.7, juntamente os resíduos da predição, que correspondem à diferença entre o valor experimental e o valor predito da propriedade biológica.

Analisando os resíduos apresentados na Tabela 3.7 pode-se observar que o modelo de HQSAR apresenta boa capacidade preditiva. O maior valor residual é apresentado pelo composto 67 (0,81) e os menores valores residuais são apresentados pelos compostos 56 e 60 (0,03 e -0,03).

O mesmo procedimento foi realizado para o TR β , e os valores preditos de IC₅₀ para as 13 moléculas do conjunto teste são apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Valores de IC₅₀ preditos e experimentais do conjunto teste (13 compostos) obtidos com o melhor modelo para o TR β .

Código	pIC₅₀ experimental	pIC₅₀ predito	Resíduo^a
56	9,96	10,80	-0,84
57	8,68	8,88	-0,20
58	8,54	7,79	0,75
59	8,49	8,78	-0,29
60	7,68	7,82	-0,14
61	9,11	8,41	0,70
62	7,12	7,62	-0,50
63	8,02	8,49	-0,47
64	7,45	7,52	-0,07
65	5,72	5,77	-0,05
66	6,10	5,51	0,59
67	7,29	7,09	0,20
68	6,62	7,53	-0,91

^aDiferença entre o valor de pIC₅₀ experimental e predito.

A Tabela 3.8 mostra que o modelo de HQSAR para TR β também apresenta capacidade preditiva da propriedade biológica. O maior valor residual é apresentado pelo composto 68 (0,91) e o menor valor residual é apresentado pelo composto 65 (0,05).

O procedimento de validação externa dos modelos mostrou que, para ambas as isoformas, os modelos apresentam boa correlação entre os valores experimentais e os valores preditos, o que indica que ambos os modelos são confiáveis. Os valores residuais são baixos e indicam que os modelos podem ser utilizados para prever a atividade de novos compostos estruturalmente relacionados.

Os valores de afinidade de ligação experimentais e calculados com o uso desses modelos estão demonstrados nas Figuras 3.6 e 3.7.

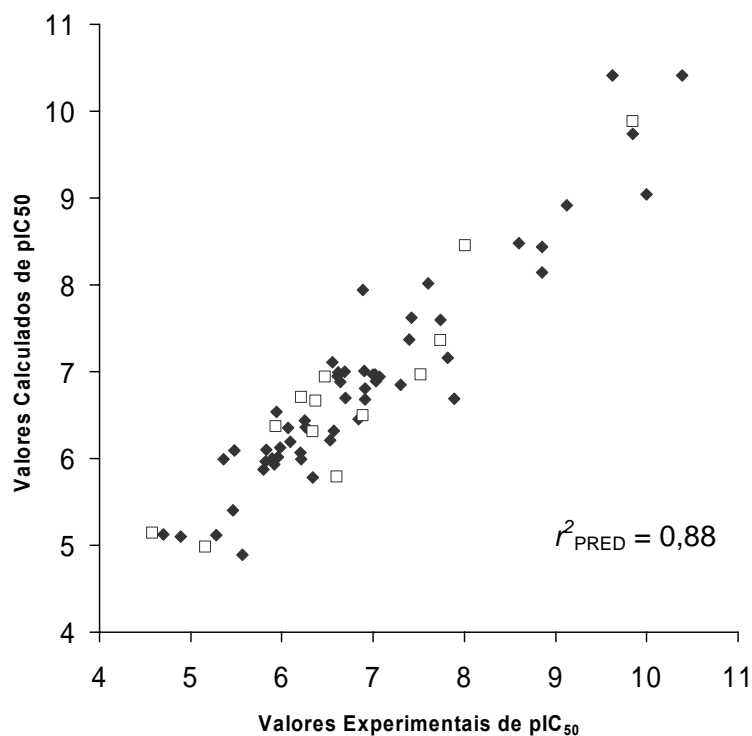


Figura 3.6 - Valores experimentais e calculados de pIC₅₀ para o modelo final com 4 componentes principais para o conjunto de dados de 68 ligantes do TR α . Os losangos preenchidos representam os compostos do conjunto treinamento e os quadrados os compostos do conjunto teste.

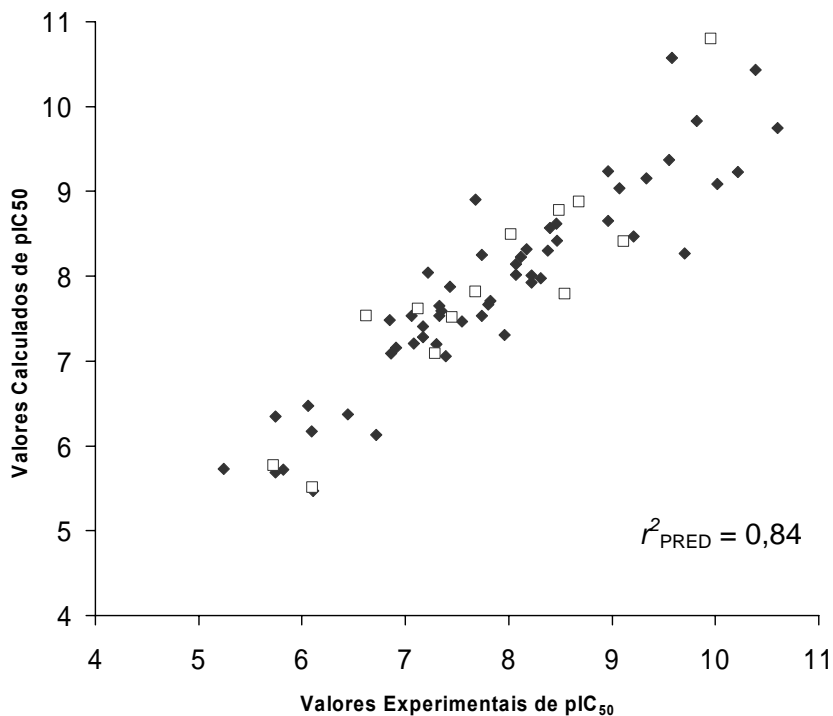


Figura 3.7 - Valores experimentais e calculados de pIC₅₀ para o modelo final com 3 componentes principais para o conjunto de dados de 68 ligantes do TR β . Os losangos preenchidos representam os compostos do conjunto treinamento e os quadrados os compostos do conjunto teste.

Uma função importante dos modelos de QSAR, além de prever a atividade biológica de novas moléculas, é fornecer sugestões sobre quais fragmentos moleculares desempenham função importante para a atividade observada⁷⁵. Essa informação, aliada ao conhecimento de síntese química, pode levar a síntese de novas moléculas com propriedades aperfeiçoadas. Como no HQSAR a estrutura molecular está codificada nos hologramas moleculares provenientes dos fragmentos, o módulo disponível no SYBYL 7.2 possui uma ferramenta de visualização baseada em código de cores para apresentar os resultados da análise de PLS. Esta ferramenta permite analisar os fragmentos que contribuem positivamente (verde e amarelo) e negativamente (vermelho e laranja) para a atividade biológica; os átomos que são neutros para as contribuições são exibidos em branco.

Utilizando esse código de cores, na Figura 3.8 são apresentados os fragmentos estruturais que contribuem positivamente e negativamente para a atividade biológica do composto **52**, sintetizado por Garcia Collazo e colaboradores⁷¹, com o objetivo de explorar o volume do sítio ativo não ocupado por outros ligantes. Estas contribuições são resultados das análises de PLS obtidas para os modelos descritos acima.

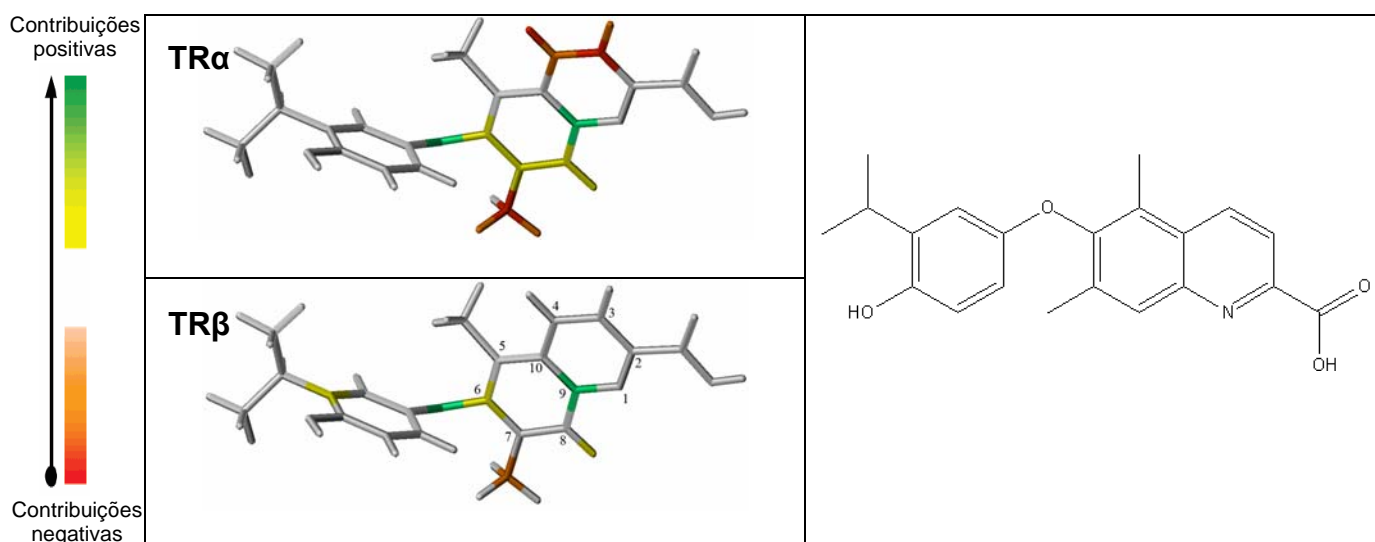


Figura 3.8 - Mapas de contribuição de HQSAR para o composto **52**. As contribuições positivas para a atividade biológica são representadas pelas cores amarela e verde, enquanto que as negativas pelas cores laranja e vermelha. A cor branca define as regiões neutras. O mapa superior foi gerado utilizando o modelo para o TR α e o inferior com o modelo para o TR β . A figura mostra também as posições dos átomos no anel quinolina e a fórmula estrutural do composto **52**, para facilitar visualização.

De acordo com os modelos de HQSAR, as posições 3 e 4 do anel quinolina apresentam fortes contribuições negativas para a interação com o TR α , mas exercem pouco efeito sobre o TR β . Esse resultado pode estar associado a impedimentos estéricos do ligante dentro do sítio de ligação do TR α . Essa hipótese condiz com o fato do composto **49**, um análogo menor, que contém um anel indol ao invés do anel quinolina, apresentar uma afinidade cem vezes maior que o composto **52**. Esse resultado indica que o volume do grupo presente nessa parte do ligante é importante para sua ligação ao TR α , mas tem menor efeito na ligação ao TR β . Essa informação pode ser valiosa para o desenvolvimento de compostos seletivos para a isoforma β .

Uma segunda característica apontada pelos mapas de contribuição individuais são as diferentes magnitudes de contribuição dos substituintes nas posições 5 e 7 do anel quinolina. Esse resultado pode estar relacionado ao ajuste induzido durante o evento de ligação do composto ao receptor^{68,73,74}. A flexibilidade das isoformas do TR parece ser responsável por esse resultado e, se a polarizabilidade e a alta eletronegatividade do átomo de bromo nessas posições o torna ótimo para a afinidade e estabilidade⁷⁶, grupos químicos menores nessas posições podem ter um papel na seletividade entre as duas isoformas dos receptores dos hormônios da tireóide. Contudo, como o conjunto de compostos utilizado para gerar os modelos não explora completamente o espaço químico nessas posições, seria interessante avaliar a atividade de ligantes com diferentes substituintes nessas posições para investigar melhor esses resultados.

Algumas conclusões gerais podem ser obtidas pela análise de todos esses resultados. Desde o início do processo de modelagem, os modelos para o TR α apresentaram melhores parâmetros estatísticos que os modelos para TR β . Isso pode ter acontecido porque a literatura reporta que a maioria desses compostos apresenta maior afinidade para o TR β de forma que a distribuição desses compostos pelo intervalo de potência é diferente para os dois receptores.

Curiosamente, para o TR α apenas 6 compostos apresentam pIC₅₀ entre 9 e 11, ao passo que para o TR β 14 compostos se encontram nesse intervalo de potência, e para 12 desses compostos o melhor modelo prediz valores de afinidade de ligação menores que os reportados na literatura.

3.2 Triagem virtual com os receptores dos hormônios tireoidianos

3.2.1 Triagem Virtual de Compostos

Uma estratégia alternativa promissora para a identificação de novos ligantes surgiu no final da década de 80 quando foram combinados os métodos de ensaios biológicos automatizados em larga escala (HTS) e a química combinatória. A expectativa de obtenção de um número elevado de novos compostos-líderes era grande, e acreditava-se que a integração dessas técnicas resultaria num aumento substancial no número de novos fármacos lançados no mercado. Entretanto, a expectativa inicial não foi contemplada da forma esperada, como pode ser observado nos baixos índices de novos ligantes descobertos e nos altos custos envolvidos no processo⁷⁷. Este cenário propiciou o desenvolvimento de novas técnicas, como a triagem virtual de compostos ou ensaio virtual (VS, do inglês, *virtual screening*). Esta técnica, fundamentada em métodos computacionais, surgiu como estratégia alternativa para a descoberta de novos compostos com potencial terapêutico.

A VS é uma estratégia que envolve a análise de grandes bases de dados virtuais de compostos através de métodos computacionais com o objetivo de identificar um pequeno subgrupo de compostos que podem ser adquiridos através de representantes comerciais ou obtidos por síntese orgânica para avaliação de sua atividade biológica⁷⁸. Diferentemente do HTS, que necessita de um investimento substancial e disponibilidade física de coleções de moléculas, na VS, os compostos em estudo não precisam, num primeiro momento,

necessariamente existir. Além disso, esta técnica não requer a utilização de tecnologias sofisticadas de automação e robótica como no HTS.

Com o advento dos projetos genoma e proteoma o conhecimento da estrutura tridimensional de uma grande variedade de macromoléculas tornou-se disponível. Grande parte deste conhecimento é armazenada em base de dados de acesso público como o Banco de Dados de Proteínas (PDB)⁵³ onde se encontram atualmente depositadas as coordenadas tridimensionais de mais de 50.000 macromoléculas, muitas delas consideradas potenciais alvos terapêuticos.

A VS é uma estratégia baseada no conhecimento (do inglês, *knowledge-based*), que, classicamente, orienta e pontua uma base de dados de pequenas moléculas em uma cavidade do alvo molecular, gerando modelos de interação entre os compostos e o alvo macromolecular. Um pré-requisito para o sucesso desse método é o conhecimento detalhado das propriedades estruturais do alvo molecular e as características energéticas que determinam o processo de reconhecimento molecular da molécula do ligante^{57,78}.

Dessa forma, a triagem virtual baseada na estrutura do alvo macromolecular compreende uma variedade de etapas computacionais, incluindo o preparo da base de dados e do alvo molecular, a utilização qualificada de programas de VS, análise posterior a docagem e priorização dos compostos para análise (Figura 3.9).

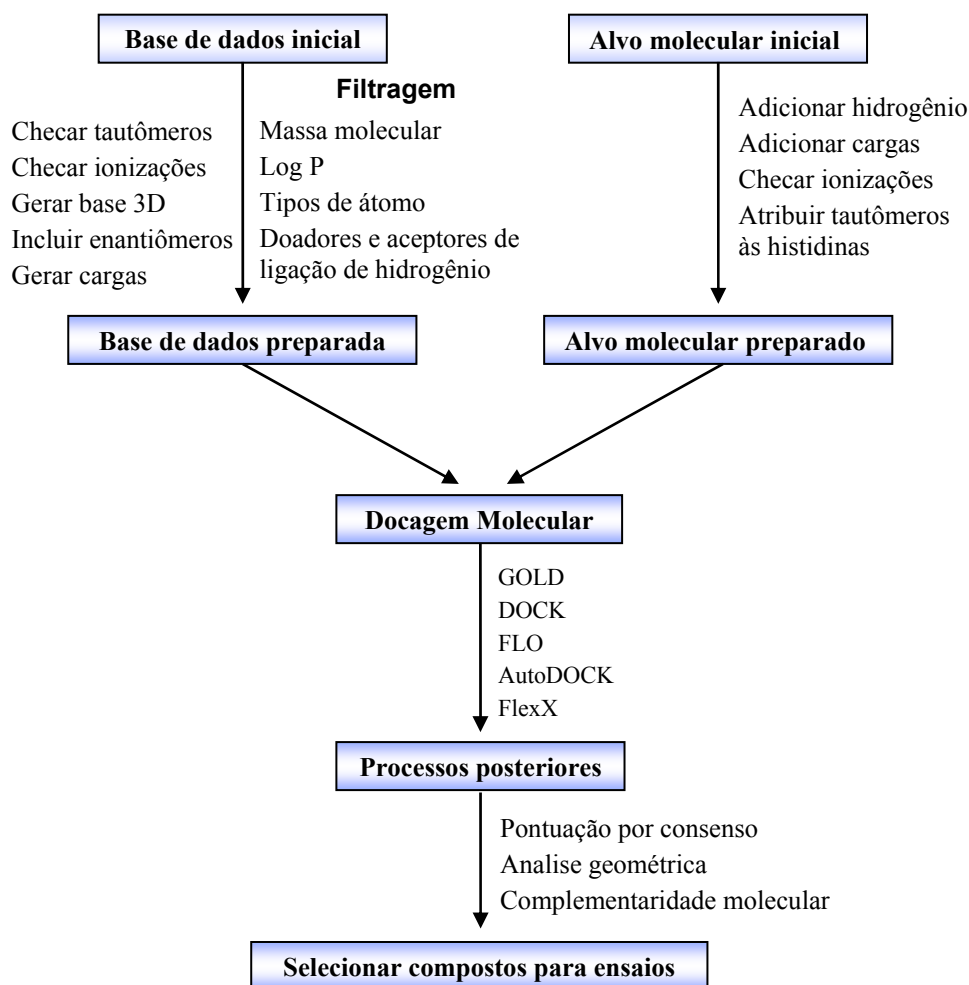


Figura 3.9 - Fluxograma simplificado da metodologia de um procedimento de triagem virtual. O esquema indica os procedimentos nas etapas de preparo da base de dados e do alvo molecular, e apresenta os programas utilizados na VS e algumas das técnicas de avaliação dos resultados utilizadas nesse trabalho.

3.2.2 Bases de dados

Muitos formatos de arquivos capazes de armazenar e transferir informações estruturais sobre compostos químicos foram desenvolvidos para serem utilizados em diversos programas de manipulação de estruturas químicas. Esses formatos são capazes de armazenar estruturas individuais ou bases de dados completas, contendo informações 2D ou 3D⁷⁹.

Os formatos SDF e MOL2 são amplamente utilizados por programas de VS, como DOCK^{64,65}, GOLD⁸⁰⁻⁸², AUTODOCK⁸³ e FlexX^{84,85}.

O estágio inicial de um projeto de VS inclui a escolha e o preparo da base de dados, que deve levar em consideração a facilidade para aquisição ou síntese das moléculas pertencentes à base de dados. Uma abordagem bastante difundida é a utilização de bases de dados de compostos disponíveis comercialmente, por exemplo, coleções oriundas de uma única empresa como a *Maybridge* (<http://www.maybridge.com>), ou bases de dados maiores, contendo informações sobre compostos comercialmente disponíveis em diversas empresas, como a base de dados **ZINC**⁸⁶ <http://zinc.docking.org/> que atualmente possui mais de oito milhões de compostos.

O número de compostos nessas bases de dados pode ser reduzido pela utilização de diversos filtros. Esse processo de filtragem visa à obtenção de uma base de dados menor, com compostos com propriedades físicas e funções químicas consistentes com a maioria dos fármacos conhecidos⁷⁸ ou com outros critérios como similaridade aos compostos-líderes (do inglês, *lead compounds*)⁸⁷. Protocolos de filtragem comuns⁸⁸ apresentam variações das regras de Lipinski, um conjunto empírico de regras baseado em valores de massa molecular, coeficiente de partição n-octanol/água (P, dado por log P) e doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, que corresponde a um perfil simples para compostos com biodisponibilidade oral⁸⁹.

A essência da busca em banco de dados baseada na estrutura do alvo terapêutico é simular eventos de reconhecimento molecular, por isso é necessária especial cautela ao gerar uma base de dados com coordenadas tridimensionais a partir de uma base de dados com compostos em duas dimensões. Além disso, a ionização e os estados tautoméricos devem ser atribuídos aos compostos na base de dados. A estereoquímica dos centros assimétricos geralmente não é conhecida antes de se gerar a base tridimensional e por esse motivo é necessário gerar os pares de enantiômeros para essas moléculas⁷⁸.

3.2.2.1 Filtragem por massa molecular

Um aspecto importante, de grande impacto na seleção de compostos e que pode influenciar de modo adverso os resultados, é o intervalo de massa molecular das moléculas da base de dados^{90,91}. Existe uma tendência de algumas funções de pontuação em selecionar moléculas maiores, mesmo quando estas apresentam uma menor complementaridade ao sítio de ligação alvo que compostos menores⁹². Isso ocorre porque um dos termos dessas funções consiste na energia de interação proveniente dos contatos do tipo van der Waals. Tal propriedade usualmente leva em consideração a soma de todos os contatos entre o ligante e a proteína, dentro de um determinado raio de corte.

Dessa forma, funções de pontuação que consideram esse tipo de interação podem favorecer a seleção de compostos que possuem um maior número de átomos para interagir com a molécula alvo, com uma tendência maior para a seleção de compostos com maior massa molecular, apesar dessas moléculas não necessariamente apresentarem complementaridade estrutural com o sítio de ligação.

A análise das propriedades físico-químicas dos fármacos disponíveis na base de dados *Comprehensive Medicinal Chemistry* (CMC), mostrou que 80% dos fármacos apresentam massa molecular entre 160 e 480, o intervalo contendo 50% dos fármacos é entre 230 a 390, e a média da massa molecular é 360⁹³.

3.2.2.2 - Filtragem por tipos de átomos

Usualmente bases de dados contêm compostos com átomos como lítio, berílio, elementos de transição e alguns elementos radioativos. Esses compostos devem ser removidos

da base de dados, pois não se enquadram como compostos ‘aceitáveis’ como possíveis compostos-líderes⁹³.

3.2.2.3 Filtragem por número de átomos de nitrogênio e oxigênio

A “regra dos 5 de Lipinski”⁸⁹ mostra que compostos com biodisponibilidade oral geralmente tem no máximo 5 doadores de ligações de hidrogênio, e não mais que 10 átomos de nitrogênio e oxigênio (uma estimativa do número de aceptores de ligações de hidrogênio).

3.2.2.4 Filtragem por número máximo de átomos de halogênios

Para considerar a tendência das funções de pontuação em selecionar moléculas maiores foram propostas estratégias de filtragem baseadas no número total de átomos de halogênios em cada molécula a ser utilizada na triagem virtual. Essa estratégia reduz o custo computacional e aumenta a taxa de sucesso do processo do VS⁹².

3.2.2.5 Filtragem por lipofilicidade (logP)

A “regra dos 5 de Lipinski”⁸⁹ mostra que compostos com biodisponibilidade oral geralmente apresentam uma faixa de lipofilicidade, medida pelo coeficiente de partição n-octanol/água (log P), menor que 5, e a análise das propriedades físico-químicas dos fármacos disponíveis na base de dados CMC, mostrou que 80% dos fármacos apresentam o log P no intervalo entre -0,4 e 5,6, a média do log P é 2,3 e o intervalo contendo 50% dos fármacos é de 1,3 a 4,1⁹³.

Foi proposto⁸⁷ que bases de dados com moléculas com log P entre 1 e 3 são melhores para obtenção de compostos-líderes que bases de dados contendo compostos com propriedades similares a fármacos.

3.2.3 Desenvolvimento de programas em PERL

Tendo em vista a necessidade de filtrar as bases de dados disponíveis, com o intuito não apenas de remover as moléculas com características indesejáveis, mas também de reduzir o número de compostos dessas bases e conseqüentemente o custo computacional do ensaio virtual a ser posteriormente realizado, desenvolvi diversos programas em linguagem PERL, um vez que nosso laboratório não dispunha de ferramentas computacionais capazes de realizar essa filtragem.

Esses programas são flexíveis, de forma que o usuário pode escolher e especificar os parâmetros que deseja em sua filtragem. Entre esses parâmetros estão o intervalo de massa molecular permitido, quais tipos de átomos serão incluídos na base filtrada, número máximo da soma de átomos de nitrogênio e oxigênio, número máximo de átomos de halogênios permitido e intervalo de log P permitido na filtragem.

Para facilitar sua utilização por outros usuários no Instituto de Física de São Carlos, os programas desenvolvidos para o preparo e filtragem de bases de dados foram unificados em um programa robusto e com interface amigável. Foi implementado suporte aos formatos de bases de dados disponibilizados pelo banco de dados ZINC⁸⁶. Também foi desenvolvida uma versão em inglês.

O programa possui 10 funcionalidades principais e detecta automaticamente o formato de bases de dados (SDF e MOL2) e sua origem (Linux ou Windows[®]). A Figura 3.10 mostra a

interface gráfica do programa em funcionamento e nela podem ser observadas as suas principais funções.

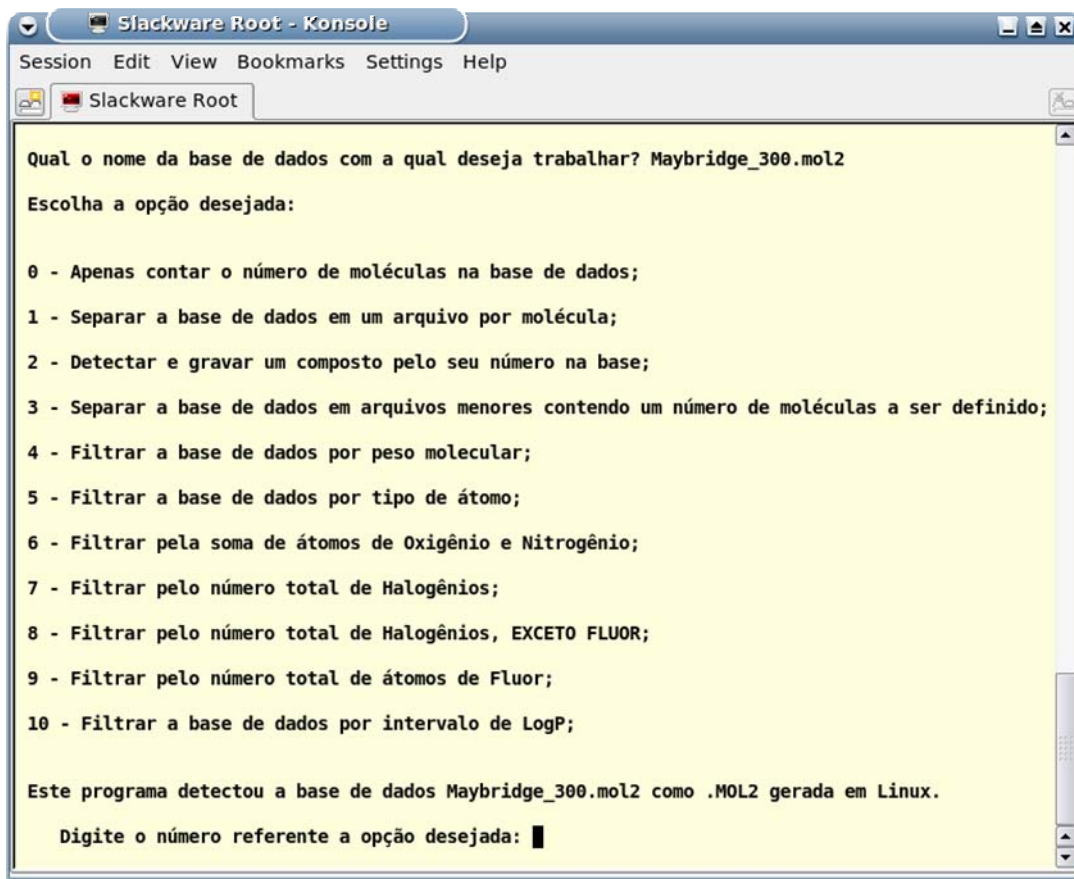


Figura 3.10 - Exemplo da interface gráfica do programa desenvolvido e utilizado para a manipulação de base de dados de moléculas em formatos mol2 e sdf.

3.2.4 Filtragem da base de dados utilizando programas em PERL

A base de dados comercialmente disponível *Maybridge* (<http://www.maybridge.com>), em formato SDF, foi submetida a dois protocolos de filtragem distintos, que se diferenciam principalmente pelo intervalo de massa molecular permitido.

3.2.4.1 Filtragem original da base de dados *Maybridge*

No primeiro processo de filtragem, os compostos apresentando massa molecular menor que 150 ou maior que 350 foram excluídos. Como no formato SDF as moléculas não continham átomos de hidrogênio, a massa desses átomos não foi considerada nessa filtragem. Inicialmente a base de dados continha 58.895 compostos, após a filtragem a base foi reduzida a 39.410 moléculas, que correspondem a 66,9% da base de dados original.

Na etapa posterior, a base de dados filtrada por massa molecular, foi processada de maneira a excluir compostos que apresentavam átomos diferentes de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, flúor, cloro, bromo e iodo. Após o processo de filtragem a base foi reduzida a 39.379 compostos.

Utilizando o programa CORINA, foram geradas as estruturas tridimensionais e os estereoisômeros dos compostos nessa base de dados já filtrada por massa molecular e tipo de átomo, que se encontrava no formato SDF. Este procedimento adicionou átomos de hidrogênio em todas as moléculas e gerou uma nova base de dados, em formato MOL2, própria para ser utilizada pelo programa GOLD para a realização do ensaio virtual.

Gerar pares de enantiômeros para todos os centros assimétricos de cada molécula na base de dados pode aumentar significativamente o tamanho dessas bases, pois muitas moléculas possuem mais de um centro assimétrico. Isso pode tornar o procedimento de VS inviável, devido ao elevado custo computacional. A limitação do número de estereoisômeros gerados para cada composto pode ser considerada um filtro. Assim, o número de estereoisômeros gerados foi limitado ao máximo de 4 por molécula. Ainda assim, essa etapa adicionou 19.516 isômeros à base de dados, de forma que o número de moléculas aumentou para 54.999, correspondendo a 93,4% da base original.

Foram removidas desta base de dados de estruturas tridimensionais todos os compostos com mais de 3 átomos de halogênios (flúor, cloro, bromo e iodo), reduzindo seu tamanho para 53.455, o que corresponde a 90,8% da base original. Foi verificado que a soma dos átomos de nitrogênio e oxigênio nesses composto era menor que 8.

Para determinar o log P de cada composto, foi utilizado o programa XLOGP 2.0, que calcula o log P de todos os compostos em formato MOL2 em uma base de dados. Essa informação foi utilizada para filtrar a base de dados de forma a selecionar apenas as moléculas que possuíam log P no intervalo entre 0 e 3. O número de compostos foi então reduzido a 27.545, correspondendo a 46,8% da base de dados original. Os resultados desse procedimento de filtragem, denominado “filtragem original”, se encontram resumidos na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Resultados dos procedimentos de filtragem da base *Maybridge*.

Filtragem	Filtragem Original		Filtragem Modificada	
	Número de compostos	% da base <i>Maybridge</i>	Número de compostos	% da base <i>Maybridge</i>
Base <i>Maybridge</i>	58.895	100	58.895	100
Massa (150 a 350 Da)	39.410	66,9	NA	NA
Massa (300 a 500 Da)	NA	NA	32.201	54,6
Átomos (C, N, O, S, P, F, Cl, Br, I)	39.379	66,9	32.185	54,6
Adicionar estereoisômeros	54.999	93,4	46.016	78,1
Halogênios (máximo 3)	53.455	90,8	39.702	67,4
Log P (0 a 3)	27.545	46,8	10.214	17,3

NA = filtragem não aplicada.

3.2.4.2 Filtragem modificada da base de dados *Maybridge*

Uma outra filtragem da base de dados *Maybridge* foi realizada, se diferenciando da apresentada na sessão anterior apenas pelo intervalo de massa molecular permitido, entre 300 e 500 Daltons. Novamente, os átomos de hidrogênio não foram considerados nessa etapa. A

base de dados inicial continha 58.895 compostos, e foi reduzida a 32.201 moléculas, que correspondem a 54,6% da base de dados original. Os mesmos procedimentos de filtragem por tipos de átomos, soma do número de átomos de nitrogênio e oxigênio, geração de isômeros, soma do número de átomos de halogênio e log P anteriormente descritos foram então executados e resultaram na redução da base de dados para 10.214 compostos, correspondendo a 17.3% da base de dados original. Os resultados desse procedimento de filtragem, denominado “filtragem modificada”, se encontram resumidos na Tabela 3.9.

3.2.5 Preparo do Receptor

O preparo da cavidade de interação do receptor a ser estudado depende das ferramentas de VS a serem utilizadas. Alguns métodos requerem a cuidadosa adição dos átomos de hidrogênio, evitando choques atômicos. É necessária a determinação dos estados de protonação dos resíduos ionizáveis no sítio ativo, a orientação correta dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilas das cadeias laterais e a atribuição correta dos tautômeros de histidina⁹⁴. Após a adição dos átomos de hidrogênio na estrutura 3D da proteína, é recomendado que seja realizada uma minimização de energia para remover qualquer choque estérico que tenha sido introduzido pela adição desses átomos⁷⁸. Além desses cuidados, a estrutura do receptor alvo pode ser avaliada por diversos programas capazes de identificar erros em estruturas cristalográficas, como anéis de histidina mal orientados. Programas como o PROCHECK⁹⁵, o qual analisa a estereoquímica da estrutura, e o Quality, do pacote de programas WHAT IF⁹⁶, capaz de analisar o ambiente químico que envolve cada resíduo da estrutura, são freqüentemente empregados com a finalidade de averiguar a qualidade de estruturas cristalográficas.

Uma minuciosa análise da estrutura tridimensional do TR α 1 (código do PDB 2H79) foi realizada durante o procedimento de preparo do receptor, incluindo desde o acompanhamento do processo de refinamento da estrutura, obtida por difração de raios-X pelo grupo de cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, utilizando os programas PROCHECK e Quality, até as etapas posteriores de adição dos átomos de hidrogênio e verificação das cadeias laterais. Nenhum erro grave foi encontrado num raio de 10 Å do sítio de ligação.

Os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura na sua geometria padrão utilizando o programa INSIGHT II. Um procedimento de minimização da energia da estrutura, na qual as posições de todos os átomos, exceto os de hidrogênio, se mantiveram fixas, foi também realizado. Posteriormente, realizou-se uma cuidadosa inspeção visual dos resíduos da cavidade de interação para a orientação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila das cadeias laterais de serina, tirosina e treonina, verificação dos tautômeros de histidina e das rotações de 180° nas cadeias laterais dos resíduos de asparagina, glutamina e histidina. Nessa etapa verificou-se que a cadeia lateral do resíduo His381, essencial para a atividade⁹⁷, se encontra depositada no PDB de forma incorreta, sendo necessária sua rotação em 180° em torno de χ_2 para que o nitrogênio NE2 possa realizar uma ligação de hidrogênio com a hidroxila do T3. Posteriormente foi gerado um arquivo MOL2, que pode ser utilizado pelos programas GOLD e DOCK, contendo a estrutura tridimensional do TR α devidamente adequada ao processo de ensaio virtual.

3.2.6 Programas para ensaio virtual

Uma das etapas críticas de um procedimento de ensaio virtual é a seleção de ferramentas computacionais robustas, capazes de gerar resultados confiáveis. Portanto, a

escolha do método de docagem molecular mais apropriado é fundamental para obtenção de modos de interação plausíveis e estimativas coerentes da afinidade de ligação das moléculas em estudo⁵⁷.

Atualmente, mais de 60 programas para ensaio virtual e mais de 30 funções de pontuação (SF) são conhecidas⁹⁸. Contudo, apenas alguns desses programas estão disponíveis para uso acadêmico ou comercial, e somente um número limitado deles é amplamente utilizado (AutoDock, DOCK, FlexX, FRED, Glide, GOLD, ICM, QXP/Flo+, Surflex). Todos os programas de ensaio virtual apresentam dois componentes complementares: uma função de busca para explorar o espaço conformacional do ligante e/ou da proteína alvo e uma função de pontuação para avaliar os modos de ligação propostos, denominados “poses”. A função de pontuação deve ser capaz de atribuir uma boa pontuação para poses nativas (fidelidade), observadas em estruturas cristalográficas, dessa forma guiando a função de busca. Esse aspecto é crítico para prever com exatidão o modo de ligação. Da mesma forma, as melhores poses de compostos apresentando alta afinidade devem ser mais bem pontuadas que as de compostos sem atividade ou com menor afinidade (enriquecimento). Esse aspecto é importante no processo de aperfeiçoamento de compostos-líderes e no ensaio virtual, em que moléculas com afinidade pelo receptor-alvo são identificadas em grandes bases de dados.

3.2.6.1 Métodos de amostragem conformacional

Métodos de docagem de corpo rígido podem usar uma conformação ou diversas conformações para considerar a flexibilidade do ligante. Essas abordagens geralmente usam

complementaridade de forma ou algoritmos de encaixe na cavidade de interação (do inglês, *matching algorithms*). Programas como DOCK, FRED e FTDock utilizam essa estratégia.

Programas de ensaio virtual que utilizam construção incremental dividem o ligante em um conjunto de fragmentos, um deles é selecionado e posicionado no sítio de ligação por um algoritmo de encaixe e o ligante é construído dentro do sítio ativo em tempo real para considerar sua flexibilidade, muitas vezes utilizando bibliotecas de conformações preferenciais para conectar os fragmentos (por exemplo, DOCK, FlexX, FLOG, Surflex).

Métodos estocásticos de amostragem conformacional exploram o espaço conformacional do ligante por inteiro e em tempo real. Diversas formas de busca estocástica são utilizadas em programas de VS, sendo as mais comuns os algoritmos genéticos (GA) e o método de Monte Carlo (MC). Muitos programas utilizam GA (AutoDOCK, DARWIN, DIVALI, GOLD, EADock, FITTED and PSI-DOCK) que empregam abordagens inspiradas pela biologia evolutiva como hereditariedade, mutação, seleção e recombinação⁹⁸. Como ilustrado na Figura 3.11, a pose do ligante é representada por um cromossomo, que é feito de genes que codificam os ângulos torcionais e a rotação e translação do ligante no espaço. Essas poses evoluem através da transmissão de sua informação genética (reprodução), alterada por operadores genéticos como mutações e recombinação. Muitos métodos podem ser utilizados para a seleção da próxima geração, sendo o mais popular a sobrevivência do mais apto, onde as duas conformações de mais baixa energia se tornam a próxima geração.

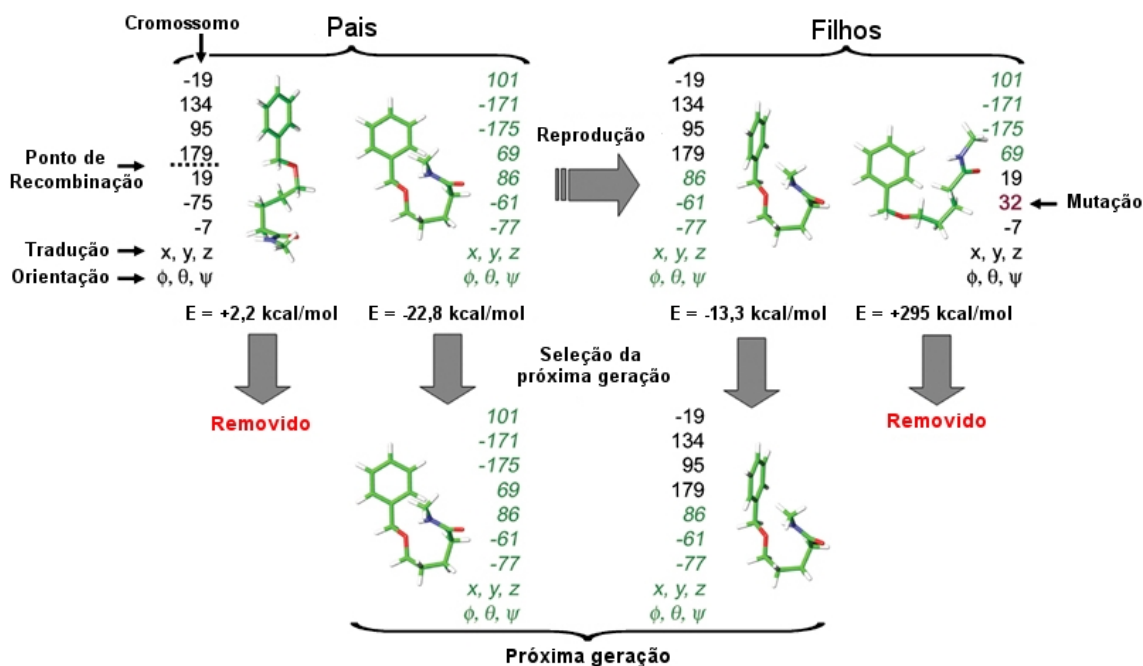


Figura 3.11 - Representação esquemática simplificada de um algoritmo genético⁹⁸.

Já no método de Monte Carlo (implementado nos programas ICM, FLO, MCDOCK, ProDOCK, SLIDE) a pose do ligante é sequencialmente modificada através da rotação de ângulos, translação ou os dois simultaneamente, e a nova conformação é avaliada e mantida dependendo do critério de seleção.

3.2.6.2 Funções de pontuação

As funções de pontuação são utilizadas para prever a energia livre de ligação de compostos ao alvo macromolecular ou pontuar compostos de acordo com sua atividade biológica. Geralmente apresentam parâmetros que podem ser modificados pelo usuário.

Nas funções de pontuação que utilizam métodos empíricos, a avaliação da energética de interação entre o ligante e a proteína (usualmente de complexos cristalográficos) é decomposta em termos mais simples e mensuráveis, por exemplo, ligações de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos, ligação a metais e restrição da mobilidade conformacional. Esses vários

termos da função de pontuação são definidos para ajustar os valores de afinidade dos complexos ligante-proteína determinados experimentalmente. Cada uma dessas funções difere pelo número e natureza dos termos utilizados para formar sua equação. Dentre as funções empíricas mais utilizadas está a ChemScore, que foi implementada em vários programas de VS (por exemplo, GOLD e FRED)⁸².

Um pequeno número de funções de pontuação que utilizam exclusivamente campos de força foi desenvolvido. Mais comumente, termos de campos de força são combinados com termos de funções empíricas de forma variada, por exemplo, os programas AutoDOCK e DOCK combinam as energias de ligações de hidrogênio, van der Waals e eletrostáticas utilizando o campo de força AMBER.

Outras funções de pontuação populares, como a DrugScore, foram desenvolvidas a partir da análise estatística de estruturas cristalográficas de complexos proteína-ligante. Essas análises utilizam a frequência em que átomos do ligante interagem com átomos da proteína, agrupando-os em pares e convertendo esses dados em potenciais de preferência de pares em função da distância. A pontuação é calculada pela soma de todos os pares de interações entre cada átomo da proteína e do ligante dentro de certo raio de corte. Em muitos casos, termos adicionais são utilizados, como o termo que considera a mudança na área da superfície exposta ao solvente presente na função DrugScore⁹⁹, sendo uma descrição indireta do efeito de solvatação.

3.2.6.3 Pontuação por consenso

Artigos publicados recentemente^{82,100-103} indicam que o método denominado pontuação por consenso (do inglês, *consensus scoring*) reduz o número de falsos positivos no ensaio virtual. Nesse método um programa de VS é utilizado para a obtenção de modelos de

conformação bioativa de compostos em um sítio de ligação e o confôrmero de melhor pontuação de cada composto é reavaliado por múltiplas funções de pontuação. Apenas os compostos de mais alta pontuação em diversas funções de pontuação serão indicados para aquisição e avaliação biológica. Este método parece ser independente do receptor alvo, do método de docagem e mesmo das funções de pontuação utilizadas, se estas apresentarem grau de confiabilidade semelhante. De fato, alguns softwares comerciais para modelagem molecular, como SYBYL 7.2, incluíram a pontuação por consenso como parte de seu pacote de desenvolvimento de fármacos⁸². Uma das formas de pontuação por consenso que tem sido utilizada com sucesso^{101,103} é a estratégia de “posição por posição”. Nessa estratégia, todos os candidatos são pontuados por todas as funções de pontuação e uma ordem de pontuação é definida para cada função de pontuação. Por exemplo, se uma molécula obtém a décima posição de acordo com uma função de pontuação e a vigésima posição de acordo com outra função de pontuação, então sua posição média será $(10+20)/2 = 15$. Essa estratégia utiliza posições relativas ao invés de valores de afinidade de ligação para pontuar as moléculas.

3.2.6.4 Desempenho em um ensaio virtual

A característica fundamental de um programa de VS é sua capacidade de tentar reproduzir o modo de ligação dos ligantes. A fidelidade (do inglês, *pose-fidelity*) é a capacidade de um programa de VS de reproduzir poses cristalográficas. Visando validar as ferramentas de VS, um ligante pode ser removido da estrutura cristalográfica de seu complexo proteína-ligante e ter sua posição definida em seu sítio de ligação utilizando um programa de VS. O modo de ligação encontrado é então comparado ao modo de ligação experimental e a distância do desvio quadrático médio (RMSD) entre os dois é calculado. Uma predição de modo de ligação é tida como aceitável se o RMSD é abaixo de certo valor (usualmente 2.0Å

ou menos)^{82,104}. O resultado desse tipo de validação é favorecido pelo uso da estrutura de um complexo que já contém uma cavidade apropriada para o encaixe do ligante em determinada orientação.

Outra característica importante de um programa apropriado para a VS é a capacidade de sua função de pontuação em pontuar ligantes de acordo com seus valores de afinidade de ligação experimentais. Enriquecimento (do inglês, *enrichment*) é a capacidade de pontuar bem moléculas com atividade biológica conhecida, e separá-las de compostos inativos. Contudo, quando se empregam grandes bases de dados de compostos em um estudo de VS, o tempo para se explorar o espaço conformacional de cada composto e para avaliar seus modos de interação com a proteína precisa ser curto. O aumento da velocidade de um protocolo de VS freqüentemente é feito ao custo de uma menor amostragem de modos de ligação, estratégia que pode reduzir a taxa de enriquecimento da base de dados. É importante escolher parâmetros de busca com velocidades apropriadas ao ensaio virtual e com uma perda aceitável na precisão do VS⁸².

3.2.6.5 Programa GOLD

GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) é um programa de docagem molecular que utiliza um algoritmo genético para explorar a flexibilidade conformacional da molécula do ligante associado a uma flexibilidade parcial da molécula da proteína⁸¹. O programa utiliza um método singular para situar o ligante no sítio de ligação, atribuindo pontos de interação para grupos capazes de realizar ligação de hidrogênio na proteína e no ligante, e mapeando os pontos aceptores de ligações de hidrogênio do ligante em pontos doadores de ligações de hidrogênio na proteína e vice-versa. O GOLD também gera pontos de interação hidrofóbicos na cavidade da proteína.

3.2.6.5.1 Função de busca

O programa GOLD utiliza como função de busca o GA, que oferece um modelo diferenciado de função de busca, permitindo uma rápida identificação de possíveis modos de interação⁸¹. Durante a execução do GA os seguintes parâmetros são modificados/otimizados de forma aleatória⁸².

- (a) os ângulos diédricos das ligações rotacionáveis da molécula do ligante;
- (b) a geometria dos grupos cíclicos da molécula do ligante;
- (c) os ângulos diédricos dos grupos OH e NH₃⁺ da proteína;
- (d) o mapeamento dos pontos de interação (posição do ligante no sítio de ligação);

Cada cromossomo codifica uma possível orientação da molécula do ligante no interior do sítio de ligação para a qual é atribuída uma pontuação baseada no mérito da solução. Esta pontuação será utilizada posteriormente para organizá-los de forma hierárquica dentro população. A população de cromossomos é otimizada iterativamente. A cada passo, uma mutação pontual pode ocorrer ou dois cromossomos podem combinar-se para gerar um cromossomo filho. A seleção dos cromossomos pais é realizada de maneira a selecionar os melhores membros da população posicionados no sítio de ligação (cromossomos que correspondem aos ligantes com maior pontuação). Um número definido de parâmetros controla o funcionamento do GA, como tamanho da população, pressão de seleção, número de operadores, número de ilhas, tamanho dos nichos e peso dos operadores (migração, mutação, recombinação).

Um resumo das etapas realizadas pelo GA está ilustrado segundo a rotina abaixo^{80,81}:

1. Um conjunto de operadores de reprodução (recombinação, mutações, etc) é escolhido. Para cada operador é atribuído um peso;
2. Uma população inicial é gerada aleatoriamente e o modo de interação de cada membro no sitio de ligação é avaliado;
3. Um determinado operador é escolhido (baseado no peso de cada operador);
4. Uma vez escolhido o operador, este seleciona os “cromossomos pais” baseando-se na pontuação atribuída a eles (os quais estão ordenados de maneira hierárquica);
5. O operador é aplicado e cromossomos filhos são gerados, estes são posicionados no sitio de ligação e o modo de ligação avaliado (uma pontuação é atribuída);
6. Se os cromossomos filhos gerados ainda não fazem parte da população, estes substituem os membros que apresentam os piores ajustes (menor pontuação);
7. Após a aplicação de 10.000 operadores encerra-se o processo do GA.

3.2.6.5.2 Função de Pontuação

O programa GOLD oferece ao usuário a possibilidade de escolha da função de pontuação, onde duas funções estão implementadas: GoldScore e ChemScore. Ambas as funções são igualmente confiáveis, mas para determinados casos uma pode apresentar melhores resultados que a outra¹⁰⁵. Verdonk e colaboradores realizaram um estudo de comparação entre as duas funções de pontuação e mostraram que a função GoldScore apresenta melhores resultados para ligantes com maior massa molecular, por outro lado, a função ChemScore realiza a docagem molecular dos ligantes três vezes mais rápido quando comparada com a GoldScore⁸².

A função GoldScore é uma função tipo mecânica molecular com quatro termos:

$$\text{GoldScore} = S_{\text{hb_ext}} + S_{\text{vdw_ext}} + S_{\text{hb_int}} + S_{\text{vdw_int}}$$

Onde o termo $S_{\text{hb_ext}}$ pontua as ligações de hidrogênio entre a molécula do ligante e da proteína; $S_{\text{vdw_ext}}$ avalia as interações de van der Waals entre o ligante e a proteína; $S_{\text{hb_int}}$ corresponde à contribuição das ligações de hidrogênio intramoleculares no ligante para a docagem molecular e o termo $S_{\text{vdw_int}}$ representa a contribuição das interações de van der Waals intramoleculares no ligante.

A função de pontuação ChemScore estima a energia livre de ligação entre um ligante e a proteína, levando em consideração ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e a perda de entropia conformacional do ligante.

Os parâmetros do algoritmo genético afetam diretamente o tempo do procedimento de docagem e a possibilidade de encontrar os melhores modos de ligação. Os parâmetros principais que afetam o tempo e a precisão são o número de docagens e o número de operações do algoritmo genético em cada docagem⁸².

A docagem de cada composto pode ser interrompida prematuramente se os melhores modos de ligação forem reproduzidos continuamente. Por padrão esta opção se encontra ativada, pois poupa tempo computacional, e a docagem de cada composto termina se as três melhores conformações encontradas tiverem um valor da RMSD menor que 1.5 Å entre si. Contudo, essa opção não poupa muito tempo, pois a finalização prematura tende a ocorrer principalmente para compostos rígidos, com poucas ligações rotacionáveis, que de qualquer forma requerem pouco tempo computacional. A indicação de finalização prematura da docagem está indicada na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Parâmetros do algoritmo genético do programa GOLD.

Opções	Tamanho da	Pressão	Número	Máximo de	Finalização
--------	------------	---------	--------	-----------	-------------

	população	de seleção	de ilhas	operações	prematura
Padrão 1	100	1,100	5	100.000	Não
Padrão 2	100	1,100	5	50.000	Sim
Padrão 3	100	1,100	3	30.000	Sim
Padrão 4	100	1,100	1	10.000	Sim
GOLD triagem	50	1,125	1	1.000	Sim

Todas as opções para o controle dos parâmetros do algoritmo genético e das funções de pontuação podem ser escolhidos nos arquivos **gold.conf** e **gold.params**, que devem ser modificados de acordo com as necessidades do protocolo de VS a ser utilizado.

3.2.7 Metodologia do ensaio virtual

Utilizando as bases de dados filtradas a partir da base original *Maybridge* e a estrutura do receptor previamente preparada foram realizados diversos experimentos de ensaio virtual com o programa GOLD 2.1, visando reproduzir a posição cristalográfica do T3 no sítio ativo. Esses estudos consistem na modificação sistemática dos diversos parâmetros encontrados nos arquivos **gold.conf** e **gold.params**.

A sobreposição do modo de ligação experimental do T3 e do modo de ligação encontrado pelo programa GOLD após a otimização de diversos parâmetros pode ser observado na Figura 3.12. O RMSD entre as duas conformações é 0,33 Å. Esse excelente resultado mostra que o programa GOLD é capaz de reproduzir com sucesso o modo de ligação experimental do T3.

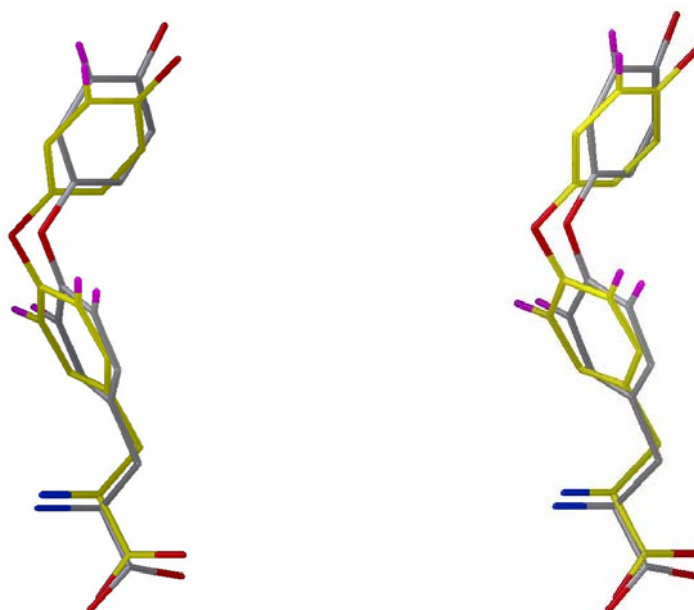


Figura 3.12 - Imagem estéreo do modo de ligação do T3 ao LBD de TR α encontrado experimentalmente (cinza) e do modo de ligação encontrado pelo programa GOLD 2.1 (amarelo). O RMSD entre as duas conformações é 0,33 Å.

Utilizando os parâmetros do algoritmo genético “Padrão 2” (vide Tabela 3.10), mas modificando o RMSD necessário para finalização prematura para 1,0 Å, foi realizado o ensaio virtual com as bases de dados previamente preparadas. Nessa primeira triagem, foi utilizada a função de pontuação GoldScore.

Uma base de dados menor, contendo apenas as 1.000 moléculas melhor pontuadas pelo GoldScore foi gerada. Utilizando esta nova base de dados e a função de pontuação ChemScore, foi realizado um novo procedimento de ensaio virtual empregando a opção “Padrão 1” do algoritmo genético, e com o arquivo **gold.conf** modificado para a realização de 15 procedimentos de docagem para cada composto.

Para a maior base de dados, filtrada por massa molecular entre 150 e 350, foi realizado duas vezes todo o procedimento, sendo que na segunda vez (Tabela 3.12) foi acrescentada uma restrição, a obrigatoriedade da satisfação de uma ligação de hidrogênio com a arginina 228 do receptor, pois esta ligação é observada em estruturas cristalográficas do TR em complexo com diferentes ligantes.

Tabela 3.11 - Moléculas mais bem pontuadas pelo método posição por posição na filtragem sem restrição. MAY1 se refere ao composto com melhor pontuação, MAY2 ao composto com a segunda melhor pontuação e assim por diante. As pontuações relativas ao GoldScore e ChemScore estão indicadas. Entre parênteses está a soma das posições relativas ao GoldScore e ChemScore. Também estão indicadas a massa molecular e o log P de cada molécula.

Pontuações das moléculas selecionadas <i>Maybridge</i> sem restrição				
Posição por posição	GoldScore	ChemScore	Massa molecular	Log P
MAY1 (14)	1	13	359	2,48
MAY2 (21)	10	11	361	2,86
MAY3 (29)	23	6	361	2,86
MAY4 (32)	8	24	325	3,00
MAY5 (35)	21	14	356	2,63
MAY6 (37)	2	35	359	2,48
MAY7 (49)	11	38	353	2,77
MAY8 (55)	6	49	356	2,63
MAY9 (58)	32	26	353	1,94
MAY10 (60)	20	40	342	1,80
MAY11 (61)	5	56	353	1,94
MAY12 (73)	63	10	350	2,99

Em todos os casos foi utilizada a estratégia de pontuação por consenso. Um programa em PERL foi desenvolvido para auxiliar na realização do método de "posição por posição". Esse programa verifica a posição de cada molécula na ordem de pontuação pelo GoldScore e pelo ChemScore e atribui uma nova pontuação a cada composto, igual à soma das posições nas pontuações pelas duas funções de pontuação utilizadas. Os 12 melhores compostos pontuados pelo método em cada caso estão listados nas Tabelas 3.11 e 3.12. O número apresentado no código de cada composto refere-se a sua pontuação no método de posição por posição. Assim, MAY1 se refere ao composto com melhor pontuação, MAY2 ao composto com a segunda melhor pontuação e assim por diante.

Tabela 3.12 - Moléculas mais bem pontuadas pelo método posição por posição na filtragem com obrigatoriedade da satisfação de uma ligação de hidrogênio com a arginina 228 do receptor. MR1 se refere ao composto com melhor pontuação, MR2 ao composto com a segunda melhor pontuação e assim por diante. As pontuações relativas ao GoldScore e ChemScore estão indicadas. Entre parênteses está a soma das posições relativas ao GoldScore e ChemScore. Também estão indicadas a massa molecular e o log P de cada molécula.

Pontuações das moléculas selecionadas *Maybridge* com restrição Arg228

Posição por posição	GoldScore	ChemScore	Massa molecular	Log P
MR1 (12)	6	6	356	2,63
MR2 (14)	5	9	353	1,94
MR3 (16)	8	8	325	3,00
MR4 (22)	21	1	356	2,63
MR5 (22)	4	18	361	2,02
MR6 (34)	32	2	353	1,94
MR7 (43)	14	29	341	2,09
MR8 (49)	19	30	357	2,05
MR9 (64)	50	14	328	2,01
MR10 (74)	55	19	350	1,66
MR11 (83)	11	72	353	2,77
MR12 (93)	82	11	329	1,84

Os resultados apresentados nas Tabelas 3.11 e 3.12 parecem indicar que as funções de pontuação do programa GOLD estão atribuindo pontuações elevadas para compostos com maior massa, pois todos os compostos apresentam massa próxima ao limite superior da base de dados. Uma estratégia para verificar essa hipótese seria a reavaliação dos resultados por uma função de pontuação capaz de levar em conta os efeitos da dessolvatação parcial do ligante e do receptor.

3.2.8 Análise dos resultados do ensaio virtual

Foram realizadas análises visuais das poses dos 250 compostos mais bem pontuados nas filtragens com e sem restrição, levando em consideração distâncias e ângulos para

realização de ligações de hidrogênio com grupos do receptor e complementaridade ao sítio ativo. Como esperado, não foi observado nenhum choque estérico entre o receptor e a conformação indicada pelo programa GOLD para essas moléculas. A maioria das moléculas selecionadas realiza uma ou mais ligações de hidrogênio com o receptor, principalmente com os resíduos Arg228, Ser277 e His381 (Figuras 3.13 e 3.15). Muitas moléculas apresentam grupos doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio não satisfeitos.

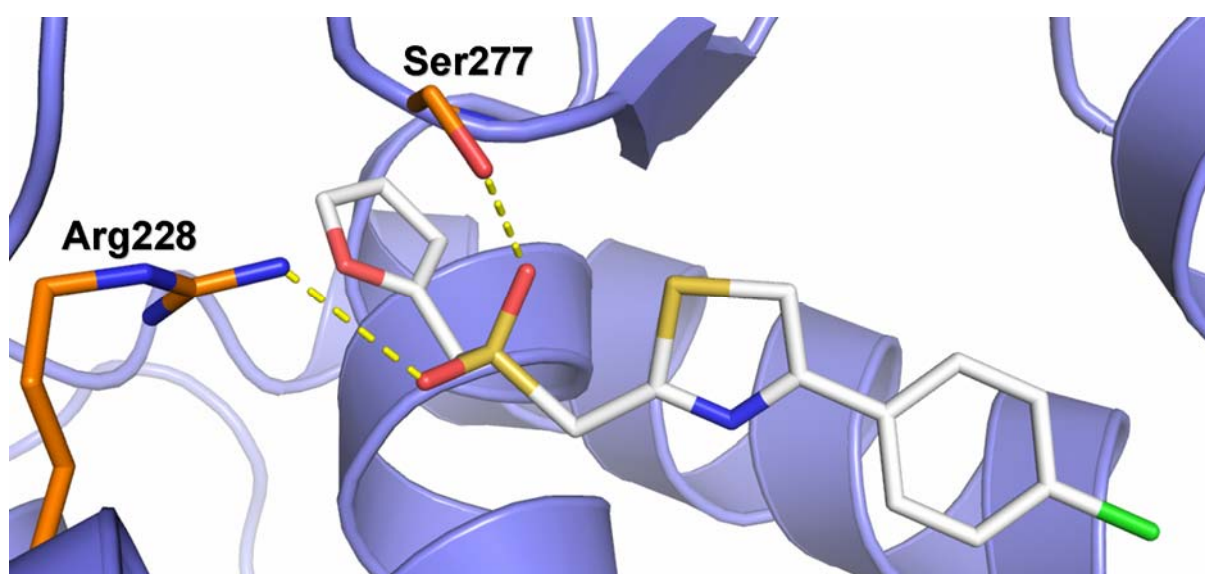


Figura 3.13 - Modelo de interação no sítio de ligação do TR α proposto pelo programa GOLD para o composto KM 03218, selecionado independentemente nos dois procedimentos de triagem virtual apresentados nas Tabelas 3.11 e 3.12, onde recebe os códigos MAY7 e MR11 respectivamente.

Visualmente, a complementaridade ao sítio ativo é relativamente boa em todos os casos. Novamente foi observada uma tendência do programa GOLD em posicionar anéis aromáticos e grupos cíclicos dos ligantes em regiões do sítio ativo ocupadas pelos átomos de iodo do T3 no complexo TR-T3. Contudo, as moléculas selecionadas não ocupam completamente a cavidade do sítio de ligação, por exemplo, a maioria não preenche por completo o local onde o anel benzênico com dois iodios do T3 se encaixa. Nesse local uma molécula de água poderia estar mediando ligações de hidrogênio entre os ligantes e o receptor.

Estratégias de docagens de fragmentos ou pequenas moléculas nesse local podem auxiliar a compreensão de como esse volume livre pode ser ocupado.

As posições MAY4 e MR3, MAY5 e MR1, e MAY7 e MR11 representam o mesmo composto, que foi selecionado independentemente nos dois critérios de busca na base de dados *Maybridge*.

Também 9 análogos estruturais foram selecionados pelos procedimentos de ensaio virtual aqui apresentados, apresentando diferenças apenas em sua estereo-química e em um grupo substituinte.

3.2.9 Avaliação da função de pontuação do programa GOLD

Inicialmente sugerimos que as funções de pontuação do programa GOLD teriam uma tendência a pontuar melhor compostos com maior massa molecular, e os resultados apresentados nas Tabelas 3.11 e 3.12 sugerem que essa hipótese pode estar correta, uma vez que todos os compostos melhor pontuados apresentam elevada massa molecular. Para verificar essa hipótese, duas abordagens experimentais foram planejadas.

Na primeira, utilizamos a base de dados ACD da empresa MDL[®] contendo 344.603 moléculas disponíveis comercialmente. Após filtragem pelos mesmos parâmetros utilizados na filtragem original da base *Maybridge* (Seção 3.2.4.1) restaram 141.979 compostos. Um programa foi desenvolvido em PERL para distribuir os compostos dessa base de dados ACD filtrada de acordo com a massa molecular de cada composto. Foi realizado o VS utilizando os mesmos parâmetros que para a base de dados *Maybridge*, inclusive a pontuação por consenso. O mesmo programa em PERL foi utilizado para distribuir os 1.000 compostos melhor pontuados pelo procedimento de VS e pontuação por consenso de acordo com a massa molecular de cada composto.

Os resultados podem ser observados na Figura 3.14, que mostram que nesse procedimento compostos de maior massa molecular são bem pontuados com maior frequência, e que compostos com massa molecular menor que 250 não são bem pontuados. Nesse caso e nos anteriores todas as bases de dados utilizadas haviam sido filtradas de forma a conter apenas compostos com massa molecular menor que 350 (sem incluir os átomos de hidrogênio) e, no entanto, a média das massas dos compostos melhores pontuados sempre foi próxima a 350, por exemplo, no caso das Tabelas 3.11 e 3.12 a média da massa molecular (incluindo os átomos de hidrogênio) é respectivamente 352 e 346, valores muito próximos ao máximo.

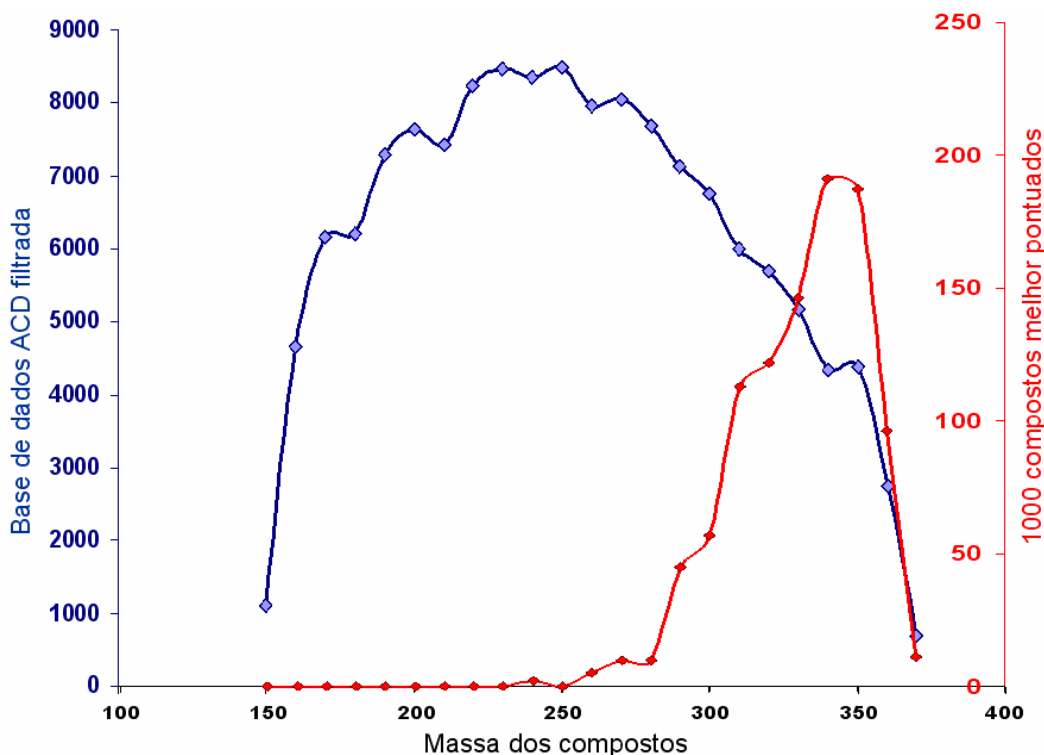


Figura 3.14 - Distribuição de peso molecular dos compostos na base de dados ACD filtrada em azul, com eixo das ordenadas a esquerda, e dos 1.000 compostos melhor pontuados pelo procedimento de pontuação por consenso, em vermelho com eixo das ordenadas a direita.

A segunda estratégia, planejada para verificar o quanto as funções de pontuação do programa GOLD tendem a pontuar melhor compostos de maior massa molecular, consistiu de uma outra filtragem da base de dados *Maybridge*, igual a anterior exceto que os limites para a

massa molecular foi estabelecido entre 300 e 500 Daltons (filtragem apresentada na Seção 3.2.4.2). O mesmo procedimento de VS foi realizado com essa base de dados. Os compostos melhor pontuados após a pontuação por consenso estão apresentados na Tabela 3.13, e a média de suas massas moleculares é 388. Esse resultado sugere que compostos com massa molecular entre 320 e 420 geralmente serão mais bem pontuados em procedimentos de VS utilizando o programa GOLD e tendo como alvo os receptores dos hormônios da tireóide, e que a tendência das funções de pontuação do programa GOLD em pontuar melhor os compostos de maior massa molecular não é tão proeminente quando anteriormente proposto.

Tabela 3.13 - Moléculas mais bem pontuadas pelo método posição por posição para a base de dados de compostos com massa molecular entre 300 e 500 Daltons. MM1 se refere ao composto com melhor pontuação, MM2 ao composto com a segunda melhor pontuação e assim por diante. As pontuações relativas ao GoldScore e ChemScore estão indicadas. Entre parênteses está a soma das posições relativas ao GoldScore e ChemScore. Também estão indicadas a massa molecular e o log P de cada molécula.

Pontuações das moléculas selecionadas <i>Maybridge 500</i>				
Posição por posição	Goldscore	Chemscore	Massa molecular	Log P
MM1 (28)	12	16	412	1,43
MM2 (37)	25	12	406	2,37
MM3 (38)	14	24	375	2,85
MM4 (41)	34	7	356	2,63
MM5 (48)	39	9	409	1,27
MM6 (59)	48	11	377	1,77
MM7 (62)	58	4	361	2,86
MM8 (72)	20	52	384	2,65
MM9 (73)	33	40	408	2,02
MM10 (81)	31	50	359	2,48
MM11 (86)	13	73	457	2,63
MM12 (88)	41	47	359	2,48

3.2.10 Seleção de compostos para ensaios biológicos

Usualmente estudos de triagem virtual avaliam a atividade biológica de dezenas ou centenas de compostos^{104,106}, contudo, devido a restrições orçamentárias, foram selecionados para aquisição apenas sete compostos da empresa *Maybridge*, e suas posições após o procedimento pontuação por consenso são mostradas na Tabela 3.14.

Tabela 3.14 - Compostos adquiridos da empresa *Maybridge*. A primeira coluna apresenta o código associado a cada composto pela empresa *Maybridge*. As três outras colunas mostram que posição cada composto obteve após o procedimento de pontuação por consenso, e conseqüentemente quais as posições desses compostos nas Tabelas 3.11, 3.12 e 3.13.

Código	Posição nos procedimentos de ensaio virtual		
	<i>Maybridge</i> original (Tabela 3.11)	<i>Maybridge</i> com restrição (Tabela 3.12)	<i>Maybridge</i> 500 (Tabela 3.13)
RJC 02449	4	3	
KM 03218	7	11	
KM 10572	12		
KM 06860	1		10
KM 06803	5	1	4
HTS 05756			2
CD 07715	-	-	-

Os compostos foram selecionados após um rigoroso processo de inspeção visual dos modos de ligação propostos pelo programa GOLD. Esse procedimento foi realizado no contexto do receptor e as interações composto-receptor propostas foram analisadas e avaliadas (Figura 3.15). É interessante notar que não apenas os 12 compostos de melhor pontuação foram inspecionados, e sim mais de 250 compostos para cada procedimento de VS, totalizando mais de 700 modelos inspecionados. Esse trabalho exaustivo e necessário levou à seleção do composto CD 07715, que se encontra na posição 92 após o procedimento de pontuação por consenso da base de dados *Maybridge* 500 (resultados na Tabela 3.13), tendo sido pontuado na 303^a posição pela função Goldscore e na 25^a posição pela função Chemscore.

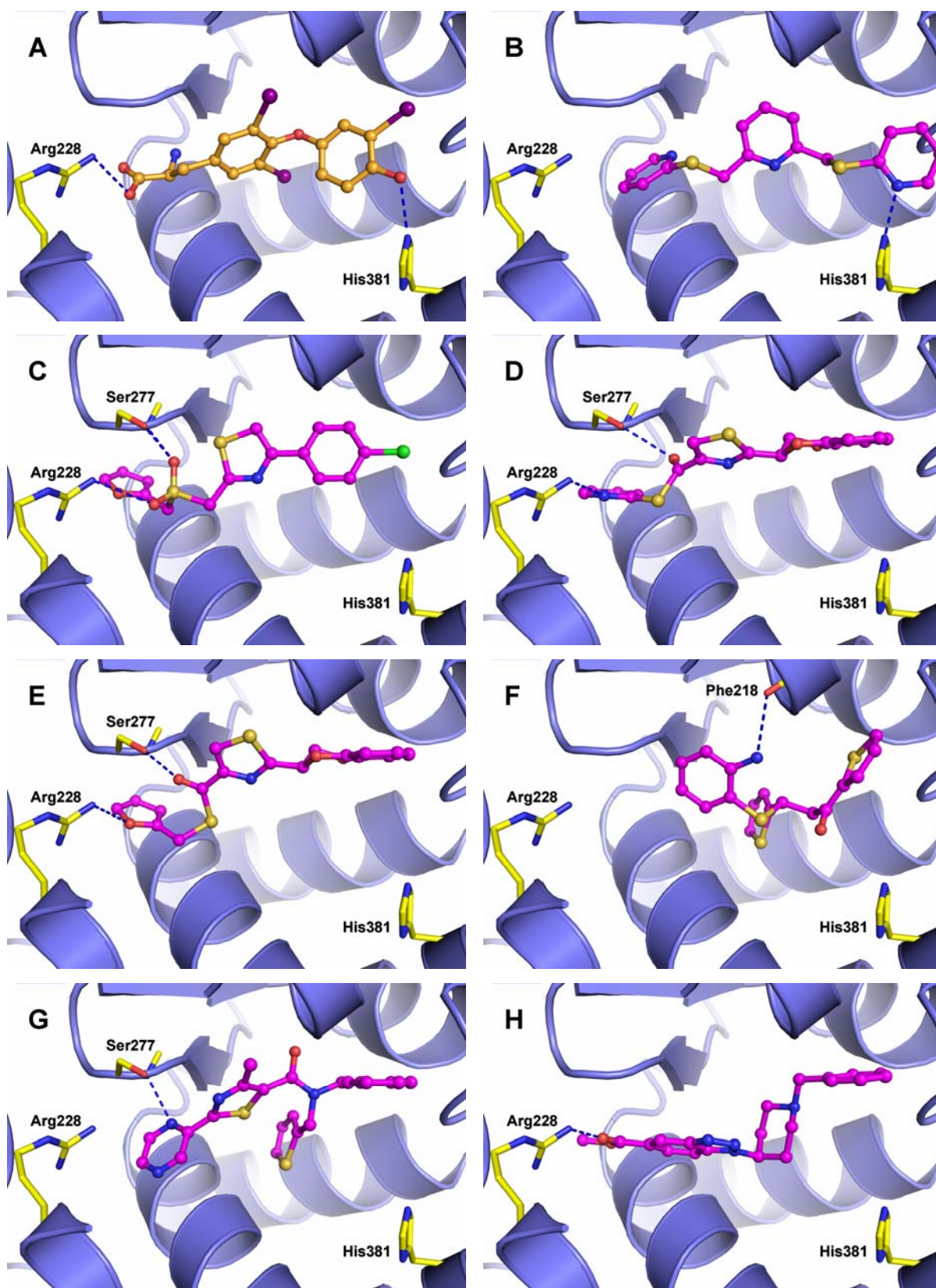


Figura 3.15 - Estrutura cristalográfica do T3 em complexo com o TR α e modelos de interação no sítio de ligação do TR α propostos pelo programa GOLD para os compostos adquiridos da empresa *Maybridge*. (A) T3. (B) RJC 02449. (C) KM 03218. (D) KM 06803. (E) KM 06860. (F) CD 07715. (G) HTS 05756. (H) KM 10572.

Os critérios utilizados para a seleção desses compostos foram:

- Disponibilidade do composto pela empresa: alguns compostos presentes nas bases de dados não estão disponíveis para compra.

- Complementaridade ao sítio de ligação do receptor: todos os compostos tiveram suas conformações e orientações no interior do receptor cuidadosamente avaliadas por inspeção visual.

- Solubilidade: alguns dos compostos presentes na base de dados possuem baixa solubilidade, o que pode tornar os ensaios biológicos inviáveis.

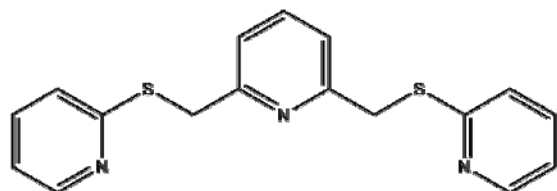
- Presença de centro assimétrico: A presença de centros assimétricos em compostos-líderes não é desejável, pois pode dificultar a síntese e desenvolvimento de análogos.

- Flexibilidade: Compostos com muitas ligações rotacionáveis não são desejáveis, pois sua interação com o receptor pode se tornar entropicamente desfavorável, e esses compostos frequentemente são promíscuos.

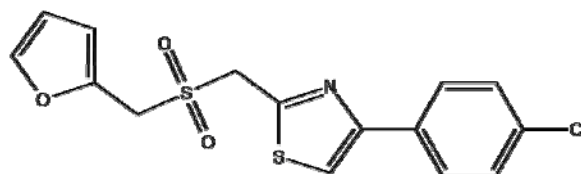
- Disponibilidade de compostos com similaridade química para compra: caso um composto apresente atividade biológica, seria interessante a aquisição de compostos análogos e avaliação biológica para o estabelecimento de relações de estrutura-atividade.

As fórmulas estruturais dos sete compostos da empresa *Maybridge* selecionados para a aquisição podem ser observadas na Figura 3.16. Esses compostos foram adquiridos e ensaios biológicos para determinar suas atividades biológicas foram realizados (apresentados no capítulo 4).

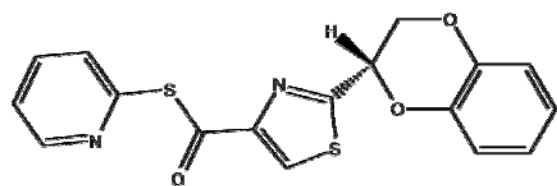
RJC 02449



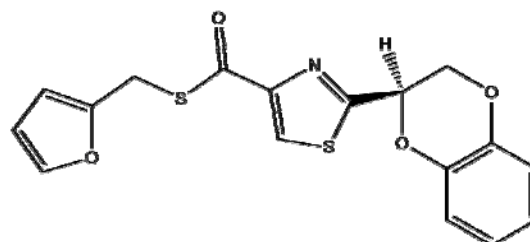
KM 03218



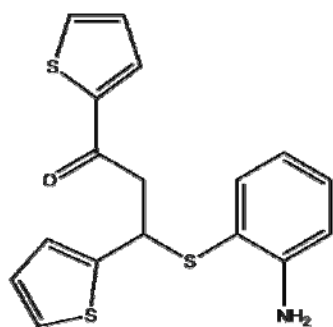
KM 06803



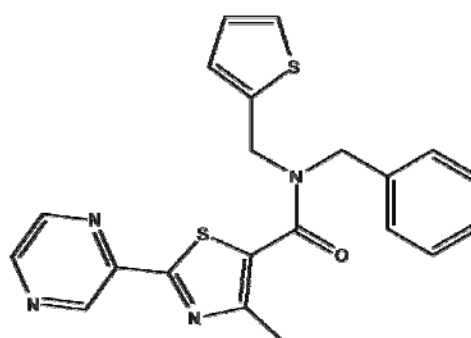
KM 06860



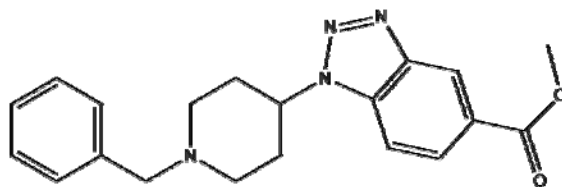
CD 07715



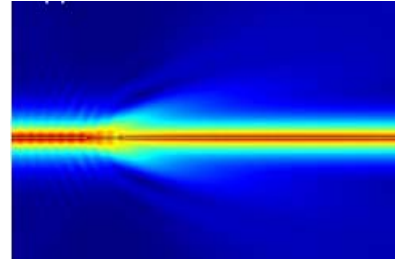
HTS 05756



KM 10572

Figura 3.16 - Compostos da base de dados *Maybridge* selecionados e adquiridos.

Capítulo 4



Ensaio Biológico

Nesse capítulo são apresentadas as metodologias utilizadas nos ensaios biológicos realizados para verificar a atividade dos compostos obtidos pelo procedimento de triagem virtual. Além disso, são apresentados os estudos utilizando a técnica de ressonância plasmônica de superfície para investigar a natureza das interações entre os receptores dos hormônios da tireóide, alguns de seus ligantes e peptídeos derivados de seus coativadores.

*“Are you a robot or an alien?
'Cause everyone in the world is one or the other.
Robots do what they're told. Stick with the herd.
Aliens, on the other hand, do their own thing.”*

4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1 Ensaio celulares

Um extensivo estudo teórico sobre a possível atividade biológica de compostos não faz sentido sem validação experimental. Para averiguar a atividade biológica de potenciais compostos de partida, é necessária a realização de ensaios de atividade biológica que verifiquem a interação dos compostos selecionados com seu alvo molecular.

Experimentos de transfecção e ensaios com gene repórter em células humanas são ensaios de atividade biológica utilizados rotineiramente para comparar a atividade entre ligantes endógenos e outros ligantes, identificando compostos com atividade agonista ou antagonista para o alvo molecular^{41,107,108}. Esse procedimento também é chamado ensaio de transativação.

4.1.1 Vetores de expressão dos receptores dos hormônios tireoidianos e genes repórteres

O gene GAL4 codifica um dos fatores de transcrição mais conhecidos¹⁰⁹. Na presença de galactose, GAL4 ativa a transcrição dos genes estruturais GAL, que codificam proteínas envolvidas no metabolismo da galactose.

O domínio de ligação ao DNA do GAL4 (GAL4-DBD) pode ser fisicamente separado de seu domínio de ativação de transcrição, de forma que muitos sistemas comerciais utilizam o GAL4-DBD associado ao domínio de ativação de transcrição de outros genes¹⁰⁹.

O vetor de expressão do TR contém o DNA completo do LBD do TR α 1 humano, ou TR β 1 humano, e GAL4-DBD sob o controle do promotor do citomegalovírus, CMVTR α 1 e

CMVTR β 1, respectivamente. O plasmídeo repórter, derivado do vetor pUC19 (New England Biolabs, Beverly, EUA), contém o elemento responsivo do GAL4 com duas cópias clonadas imediatamente acima (-32/+45) do promotor mínimo da timidina quinase (tk). O promotor mínimo contém as seqüências responsáveis para ligação da maquinaria basal de transcrição e RNA polimerase II e não possui seqüências conhecidas para outros fatores de transcrição, as quais poderiam interferir na transcrição induzida pelos TRs. Este promotor está associado à seqüência que codifica a enzima luciferase (LUC).

4.1.2 Cultura de células, transfecção e ensaio de gene repórter de células HeLa

Foram utilizadas células HeLa, derivadas células epiteliais de câncer cervical transformadas pelo *Papillomavirus* humano 18, obtidas através de uma colaboração com o professor Francisco de Assis Rocha Neves, do Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB). Estas células foram cultivadas em meio DMEN contendo 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina, 50 U/mL penicilina e 50 μ g/mL estreptomicina e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

Os procedimentos de transfecção foram realizados de acordo com métodos descritos anteriormente^{41,107,108} e que aqui são descritos brevemente. Células HeLa crescem aderidas ao frasco de cultura. Após a remoção do meio de cultura do frasco onde as células são cultivadas, o frasco foi lavado com 3 a 5 ml de PBS estéril para uma melhor retirada do meio de cultura. Adicionaram-se ao frasco de 2 a 3 mL da solução de tripsina, para eliminar a adesão das células ao frasco. As células foram transferidas para um tubo com meio DMEN e contadas em uma câmara de “NeuBauer”.

Às células (5×10^6 M) foram adicionados 2 μ g do vetor de expressão do CMVTR α 1 ou CMVTR β 1 e 5 μ g do plasmídeo repórter que possui o elemento responsivo do GAL4 seguido

do gene da luciferase. Em seguida, estas foram ressuspensas em solução PBS (0,5 mL/transfecção) contendo 0,1% dextrose. Após agitação, as células foram transferidas para uma cubeta apropriada e eletroporadas em um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 300 volts e 950 μ F. As células eletroporadas, foram logo a seguir colocadas em meio DMEN com 10% soro fetal bovino, plaqueadas em placas de 12 poços (1 mL/poço), e tratadas com veículo (etanol), hormônio (T3) ou outro composto a ser testado. T3 foi usado em concentrações crescentes de 10^{-12} M a 10^{-5} M. Depois de mantidas por 24 horas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂, o meio de cultura das placas com as células HeLa foi descartado, e uma solução de tripsina foi adicionada para a remoção das células HeLa do fundo do frasco. As células foram transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 13.000 rpm por 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e as células lisadas por 10 min com 0,1 mL de tampão de lise e transferidas para tubos de 1,5 mL. As células lisadas foram centrifugadas a 13.000 rpm, em temperatura ambiente, por 2 min. Logo depois, 50 μ L do lisado celular foi removido e misturado a 50 μ L de uma solução contendo o substrato para enzima luciferase (luciferina), e a medida da atividade desta enzima foi quantificada imediatamente após a mistura por 10 s à temperatura ambiente. A luz emitida pela reação foi medida em um luminômetro⁴¹.

4.1.3 Cálculo da taxa de ativação

Para o cálculo da taxa de ativação nos experimentos de transfecção e ensaio com gene repórter, utilizamos os valores da leitura da luciferase nos experimentos tratados com T3 e/ou composto e dividimos pelo valor da leitura nos experimentos tratados com etanol (controle). Este valor é definido como a taxa de ativação, e demonstra quantas vezes a leitura da amostra contendo o composto é maior que a leitura da amostra controle⁴¹.

4.1.4 Padronização dos ensaios

Um protocolo de transfecção e ensaio com gene repórter similar ao anteriormente descrito para células HeLa também foi estabelecido para uma outra linhagem de células humanas, chamada U937. Contudo, a utilização de células HeLa propiciou uma maior sensibilidade nos ensaios de transativação para o receptor dos hormônios tireoidianos TR β 1. Valores de taxa de ativação de mais de 35 vezes foram obtidas com o ligante endógeno T3 na concentração de 10^{-6} M (Tabela 4.1). Portanto, foram mantidas, estas células nos testes que se seguiram, e foi feita uma curva dose resposta para o ligante T3 (Figura 4.1). Os dados apresentados na Figura 4.1 são semelhantes aos descritos na literatura⁴³. O valor de EC₅₀ obtido pelo ajuste dos dados foi $4,2 \pm 0,8$ nM, comparável ao valor de 3 nM obtido para uma linhagem de células diferente⁴³.

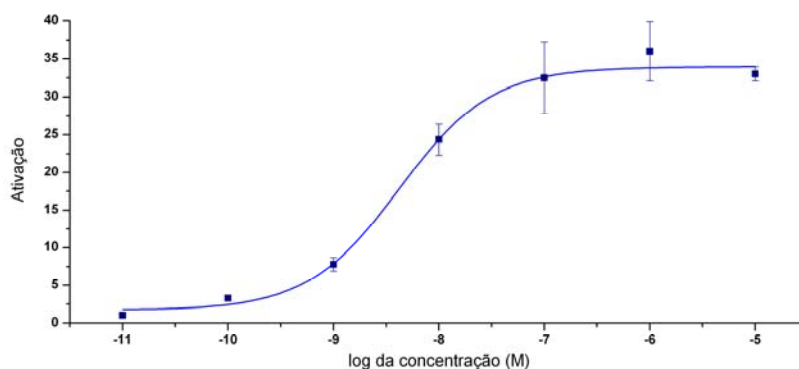


Figura 4.1 – Curva de dose-resposta para o T3. Células HeLa transfectadas com o plasmídeo de expressão Gal4DBD-TR β 1LBD e o vetor repórter Gal4-LUC foram incubadas por 20 horas com crescentes concentrações de T3. Os dados se encontram na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resultado dos ensaios de transfecção com T3.

Tratamentos	Média	Desvio Padrão	Ativação
Etanol	18,47	1,29	1,00
T3 10 ⁻¹¹ M	19,20	2,61	1,04
T3 10 ⁻¹⁰ M	60,33	5,38	3,27
T3 10 ⁻⁹ M	144,10	16,20	7,80
T3 10 ⁻⁸ M	450,03	37,85	24,37
T3 10 ⁻⁷ M	600,07	87,70	32,49
T3 10 ⁻⁶ M	672,23	71,98	36,40
T3 10 ⁻⁵ M	580,23	16,84	31,42

Também foram feitos ensaios com o ligante sintético GC-1, que confirmaram a robustez desse ensaio e sua capacidade de identificar a atividade biológica de diferentes compostos para os receptores dos hormônios da tireóide.

4.1.5 Ensaio com compostos adquiridos da empresa *Maybridge*

Foram realizados ensaios em dose única com os sete compostos adquiridos da empresa *Maybridge*. Tipicamente, em ensaios de ativação transcricional⁴¹, a atividade dos compostos é comparada a de dois controles, usualmente etanol e um ligante agonista, no caso T3, e os compostos são incubados na ausência e na presença do agonista. A atividade antagonista pode ser observada se o composto for capaz de reduzir a taxa de ativação do composto agonista quando incubado na presença deste. Os resultados são apresentados nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4. A Tabela 4.5 mostra a reprodutibilidade dos resultados obtidos com o composto CD 07715. As Figuras 4.2 e 4.3 mostram, respectivamente, a atividade agonista e antagonista dos compostos.

Tabela 4.2 – Ensaio de dose única com os compostos RJC 02449 e KM 03218 comprados da empresa *Maybridge*. Para verificar se os compostos apresentam atividade agonista, células HeLa foram incubadas durante 20 horas com cada composto. Para verificar se os compostos apresentam atividade antagonista, células HeLa foram incubadas com T3 e cada composto.

Tratamentos	Média	Desvio Padrão	Ativação
Etanol	3,15	0,23	1,00
T3 10 ⁻⁸ M	19,10	3,43	6,08
RJC 02449 10 ⁻⁵ M	6,49	0,32	2,06
RJC 02449 10 ⁻⁵ M + T3 10 ⁻⁸ M	19,86	5,25	6,32
Etanol	3,23	1,00	1,03
T3 10 ⁻⁸ M	17,7	3,53	5,64
KM 03218 10 ⁻⁵ M	4,26	0,67	1,36
KM 03218 10 ⁻⁵ M + T3 10 ⁻⁸ M	15,84	4,87	5,04

Tabela 4.3 – Ensaio de dose única com os compostos KM 10572, KM 06803 e HTS 05756 adquiridos da empresa *Maybridge*. Para verificar se os compostos apresentam atividade agonista, células HeLa foram incubadas durante 20 horas com cada composto. Para verificar se os compostos apresentam atividade antagonista, células HeLa foram incubadas com T3 e cada composto.

Tratamentos	Média	Desvio Padrão	Ativação
Etanol	2,81	0,31	1,00
T3 10 ⁻⁸ M	17,49	1,15	6,22
KM 10572 10 ⁻⁵ M	3,18	0,63	1,13
KM 10572 10 ⁻⁵ M + T3 10 ⁻⁸ M	17,83	3,85	6,35
KM 06803 10 ⁻⁵ M	2,28	0,47	0,81
KM 06803 10 ⁻⁵ M + T3 10 ⁻⁸ M	18,29	3,75	6,51
HTS 05756 10 ⁻⁵ M	2,33	0,15	0,83
HTS 05756 10 ⁻⁵ M + T3 10 ⁻⁸ M	20,76	3,09	7,39

Tabela 4.4 – Ensaio de dose única com os compostos KM 06860 e CD 07715 adquiridos da empresa *Maybridge*. Para verificar se os compostos apresentam atividade agonista, células HeLa foram incubadas durante 20 horas com cada composto. Para verificar se os compostos apresentam atividade antagonista, células HeLa foram incubadas com T3 e cada composto.

Tratamentos	Média	Desvio Padrão	Ativação
Etanol	0,85	0,17	1,00
T3 10 ⁻⁸ M	14,65	2,48	17,23
KM 06860 10 ⁻⁵ M	1,14	0,04	1,34
KM 06860 10 ⁻⁵ M + T3 10 ⁻⁸ M	15,41	1,17	18,13
CD 07715 10 ⁻⁵ M	3,15	0,06	3,71
CD 07715 10 ⁻⁵ M + T3 10 ⁻⁸ M	47,17	6,02	55,49

Tabela 4.5 – Repetição dos ensaios de dose única com o composto CD 07715. A atividade biológica apresentada pelo composto foi reproduzida.

Tratamentos	Média	Desvio Padrão	Ativação
Etanol	0,92	0,10	1,00
T3 10 ⁻⁸ M	12,76	1,72	13,87
CD 07715 10 ⁻⁵ M	2,79	0,35	3,03
CD 07715 10 ⁻⁵ M + T3 10 ⁻⁸ M	37,40	4,25	40,65

Os resultados dos ensaios para identificação de agonista demonstram que o composto CD 07715 e, em menor grau, o composto RJC 02449 propiciaram um aumento da taxa de ativação. Já no ensaio de atividade antagonista, o composto CD 07715 propiciaram um aumento da taxa de ativação, atividade essa oposta à esperada para antagonistas.

Para verificar se esses compostos apresentam toxicidade às células HeLa, foram realizados ensaios com um plasmídeo contendo o gene da luciferase e a seqüência promotora do CMV. Nesse ensaio, as células HeLa expressam o gene da luciferase mesmo quando incubadas na ausência de um composto agonista. Espera-se para compostos tóxicos uma

redução da taxa de ativação, e para compostos de baixa ou nenhuma toxicidade uma taxa de ativação similar a dos compostos controle. Os resultados são apresentados na Tabela 4.6.

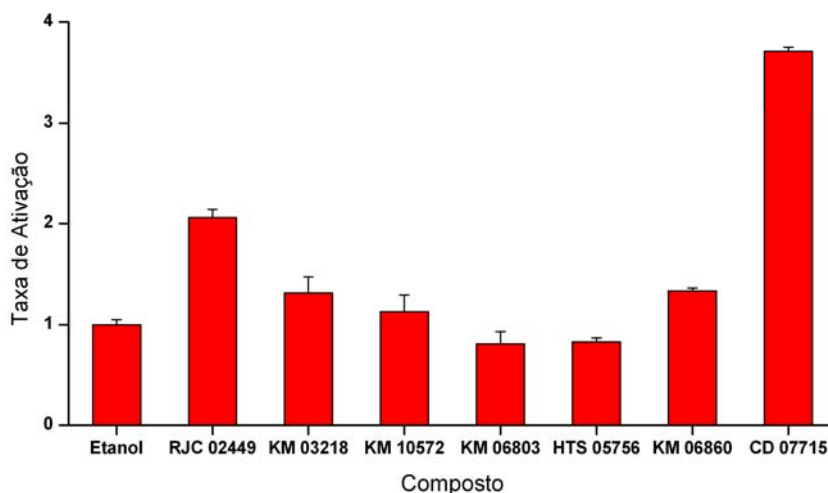


Figura 4.2 - Atividade biológica dos compostos no teste de atividade agonista. Para avaliação de sua atividade agonista, os compostos foram dissolvidos em etanol e utilizados em ensaios de transfecção de dose única em células HeLa. A taxa de ativação de cada composto foi obtida através da razão de sua atividade pela do controle (etanol). Os dados se encontram nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4.

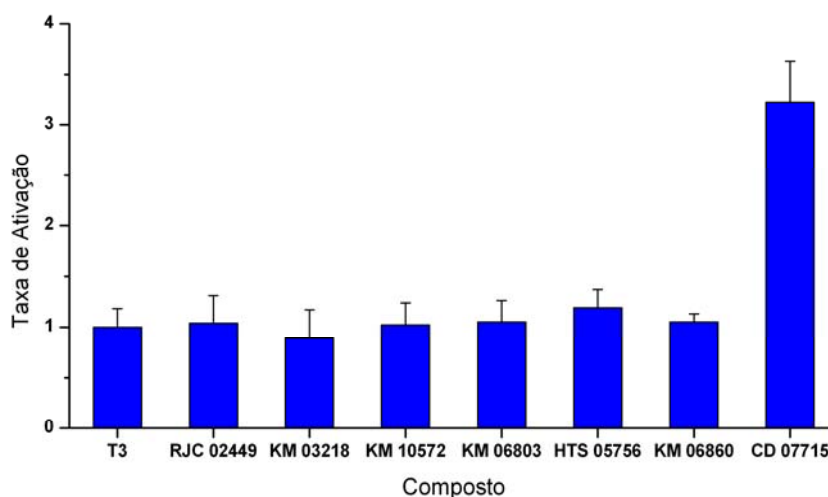


Figura 4.3 - Atividade biológica dos compostos no teste de atividade antagonista. Para avaliação de sua atividade antagonista, os compostos foram dissolvidos em etanol e utilizados em ensaios de transfecção de dose única em células HeLa onde cada amostra foi tratada com T3. A taxa de ativação de cada composto foi obtida através da razão de sua atividade pela do controle (T3). Os dados se encontram nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4.

Tabela 4.6 – Ensaio de toxicidade dos compostos adquiridos da empresa *Maybridge*. Células HeLa foram transfectadas com um plasmídeo contendo o gene da luciferase e a sequência promotora do CMV, de forma a expressar a enzima luciferase constitutivamente. Em nenhum dos casos foi observada a redução na contagem do luminômetro, indicando que os compostos testados não apresentam toxidez na concentração utilizada.

Tratamentos	Média	Desvio Padrão	Ativação
Etanol	831,07	83,00	1
T3 10 ⁻⁸ M	825,4	66,81	0,99
RJC 02449 10 ⁻⁵ M	1577,3	112,65	1,90
KM 03218 10 ⁻⁵ M	1012,7	86,41	1,22
KM 10572 10 ⁻⁵ M	913,5	96,52	1,10
KM 06860 10 ⁻⁵ M	942,3	4,88	1,13
HTS 05756 10 ⁻⁵ M	872,3	66,38	1,05
CD 07715 10 ⁻⁵ M	2218,3	8,02	2,67

Nos ensaios de expressão constitutiva do gene da luciferase, os compostos RJC 02449 e CD 07715 produziram um aumento na taxa de ativação, e os demais compostos apresentaram atividade similar aos controles (etanol e T3). Esse resultado sugere que os compostos não apresentam toxidez para as células nas condições desse ensaio. Além disso, o aumento da taxa de ativação verificado para os compostos RJC 02449 e CD 07715 nos ensaios de toxicidade sugere que a atividade anteriormente verificada nos ensaios para identificação de agonistas é inespecífica, e não devida à ligação desses compostos na cavidade de interação do receptor. Esses ensaios foram repetidos diversas vezes, produzindo resultados similares.

A necessidade de difusão pela membrana plasmática e a interação com outras proteínas celulares podem influenciar os resultados dos ensaios celulares, e são limitações conhecidas nesse tipo de ensaio. Dessa forma, foram realizados experimentos de cristalização visando detectar a ligação dos compostos ao receptor de uma forma direta.

4.2 Experimentos de cristalização

4.2.1 Cristalização

Dada a dificuldade em detectar a atividade biológica de eventuais ligantes nos ensaios com gene repórter, foram realizados ensaios de cristalização para averiguar de forma direta a interação dos compostos comprados com os TRs.

A cristalização de macromoléculas biológicas é considerada uma técnica de tentativa e erro por se tratar de um processo multiparamétrico. Parâmetros de caráter físico (e.g., temperatura, pressão, superfície da molécula, tempo, etc.), químico (e.g., pH, agente precipitante, força iônica, grau de supersaturação, etc.) e biológico (e.g., pureza da amostra, estado de agregação, ponto isoelétrico, estabilidade, etc.) interferem diretamente na formação de um cristal, de maneira que os diversos métodos existentes tentam variar este espaço multiparamétrico para examinar os efeitos de combinações dessas variáveis. Esses métodos são geralmente aplicáveis à maioria das proteínas, DNAs e RNAs, complexos multimoleculares e vírus existentes¹¹⁰.

O processo de formação dos cristais ocorre a partir de uma solução supersaturada de proteína sendo a velocidade com que se atinge esse estado essencial para formação de cristais, microcristais ou precipitado amorfo. Devido ao fato da grande maioria das proteínas serem muito instáveis e rapidamente perderem sua estrutura nativa, os cristais de proteínas crescem geralmente em condições toleráveis de temperatura, força iônica e com pequenas faixas de variação pH, próximas ao pH fisiológico¹¹⁰. O preparo de monocristais de proteínas de boa qualidade para difração de raios-X requer uma quantidade considerável de proteína pura. Assim, seja a proteína de interesse extraída diretamente do organismo fonte, ou produzida por expressão em sistema heterólogo, a mesma deve passar por um processo de purificação, visando a obtenção de uma amostra homogênea¹¹¹.

Existem diversos métodos de cristalização de proteínas, os quais são utilizados de acordo com o tipo da amostra e com as condições do laboratório. O método de difusão de vapor é um processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor num meio fechado. A solução menos concentrada perde seu solvente volátil até que os potenciais químicos das duas soluções se igualem. Para se poder controlar a concentração final da solução de proteína, realiza-se o experimento de difusão de vapor com um volume pequeno de proteína contra um volume grande de solução precipitante. Assim, uma gota de solução da proteína a ser cristalizada é adicionada à solução tampão contendo agentes precipitantes e aditivos. Em seguida, esta gota é equilibrada contra um reservatório contendo solução de agentes precipitantes a uma concentração maior que a da gota com proteína¹¹¹.

Como ponto de partida para a co-cristalização do LBD de TRβ1, com os diferentes compostos disponíveis, foram utilizadas condições de cristalização já conhecidas e eficientes na obtenção de cristais difratáveis, que são: tampão 0,1 M de cacodilato de sódio contendo entre 0,3 e 1,3 M de acetato de sódio. Os ensaios de cristalização foram realizados com diferentes soluções de proteína pura a 3 mg/mL e 4 mg/mL, e foram realizados em 3 diferentes condições de pH: 7,0, 7,5 e 8,0. A combinação dessas variáveis deu origem a 18 condições de cristalização diferentes para cada concentração de proteína, as quais foram testadas para cada um dos compostos e para o hormônio T3, que foi utilizado como controle. Os compostos utilizados nos ensaios de co-cristalização foram encubados juntamente com a proteína por uma hora em tampão de ligação (200 mM HEPES, 5 mM DTT, 200 mM NaCl e pH 7,5) e suas concentrações finais na gota de cristalização variaram entre 10 e 30 vezes a concentração da proteína.

Apesar de uma condição contendo o composto RJC 02449 apresentar microcristais, não foi observada a formação de cristais de tamanho adequado para difração para nenhum dos

compostos em nenhuma das condições de cristalização testadas, exceto para o T3, que foi usado como controle.

4.3 Estudos sobre os receptores dos hormônios da tireóide e seus co-ativadores utilizando ressonância plasmônica de superfície

Os métodos tradicionalmente utilizados para a avaliação das interações entre os receptores nucleares e seus ligantes dependem de técnicas de custo elevado, como os ensaios de transfecção realizados em células humanas ou ensaios utilizando ligantes com marcadores radioativos, que necessitam permissão especial para a compra. Para contornar essas dificuldades, foi desenvolvida uma metodologia alternativa inédita para a determinação da atividade agonista de ligantes dos receptores dos hormônios da tireóide utilizando a técnica de ressonância plasmônica de superfície.

A metodologia baseia-se no fato de que os receptores dos hormônios da tireóide apresentam uma mudança conformacional decorrente de sua interação com ligantes agonistas, e apenas após essa mudança a superfície de interação com os co-ativadores (AF-2) é formada^{16,33,112}. Dessa forma, através do monitoramento da interação entre o complexo TR-ligante e o peptídeo co-ativador é possível determinar se o ligante apresenta atividade agonista. Esse monitoramento pode ser realizado através da técnica de ressonância plasmônica de superfície, que propicia medidas diretas em tempo real, dispensa marcadores, requer baixa quantidade de amostras e permite a caracterização cinética completa e de forma simples.

Para a implementação dessa nova tecnologia, foram projetados e adquiridos peptídeos derivados dos co-ativadores dos TRs. O equipamento Biacore X[®], adquirido em 2005 pelo

grupo de cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, foi utilizado para a realização de todas as medidas.

4.3.1 Introdução ao equipamento Biacore®

O equipamento Biacore X® é um sistema que utiliza o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície para monitorar em tempo real as interações entre duas ou mais moléculas. São utilizados chips denominados sensor chips, que consistem de uma superfície de vidro coberta com uma fina camada de ouro, frequentemente modificada com uma camada de dextrano carboximetilado, que forma um ambiente hidrofílico para a ligação de biomoléculas, preservando-as em um estado não desnaturado.

A tecnologia envolve a ligação de uma molécula a um sensor chip e posterior aplicação de uma amostra contendo outra molécula sobre a superfície do sensor chip. Geralmente uma dessas moléculas é uma proteína e a outra pode ser um pequeno ligante, um carboidrato, um peptídeo ou outra proteína. A ligação de moléculas à superfície do sensor chip gera uma resposta proporcional à massa dessas moléculas, e mudanças na quantidade ligada podem ser detectadas até picogramas por milímetro quadrado na superfície do sensor chip. Conforme apresentado na Figura 4.4, a técnica é fundamentada em três componentes principais:

- Um sistema micro fluídico capaz de controlar a velocidade do fluxo desde 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ a mais de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, apresentando células de detecção com volume de 0,06 μL e temperatura controlada. Esse sistema é capaz de manter concentrações constantes do analito na superfície do *sensor chip*, e permite o uso de amostras em quantidades muito pequenas, a partir de 20 μL .

- Um sistema de detecção do sinal de ressonância plasmônica de superfície.

- Sensor chips de superfície ouro-dextrano, onde os grupos ácidos na cadeia de dextrano podem ser ativados através do emprego de reagentes específicos, de forma a propiciar a imobilização covalente de uma proteína ao sensor chip. Existem diversos tipos de chips e reagentes disponíveis comercialmente, sendo o mais comum o sensor chip CM5, que apresenta cadeias de dextrano carboximetilado com grupos ácidos disponíveis. Cada tipo de chip proporciona diferentes tipos de imobilização, sendo mais comuns o acoplamento amina (do inglês, *amino coupling*) e o acoplamento tiol (do inglês, *thiol coupling*).

A técnica apresenta uma terminologia própria que será utilizada nessa tese. É chamada “ligante” a molécula que se encontra imobilizada na superfície do sensor chip e “analito” a molécula que for injetada no sistema micro fluídico para interagir com esse ligante. A etapa chamada de regeneração consiste na injeção de uma solução capaz de remover o analito da superfície do sensor chip após uma medida, sem reduzir a atividade do ligante, propiciando assim a reutilização desse sensor chip. O equipamento Biacore X[®] possui duas células de detecção do sinal de SPR denominadas respectivamente *Flow Cell 1* (FC1) e *Flow Cell 2* (FC2). Como padrão, a FC1 é utilizada como controle, e o ligante é covalentemente imobilizado apenas na superfície da FC2. Frequentemente, os resultados são apresentados como a diferença do sinal medido na FC2 e na FC1.

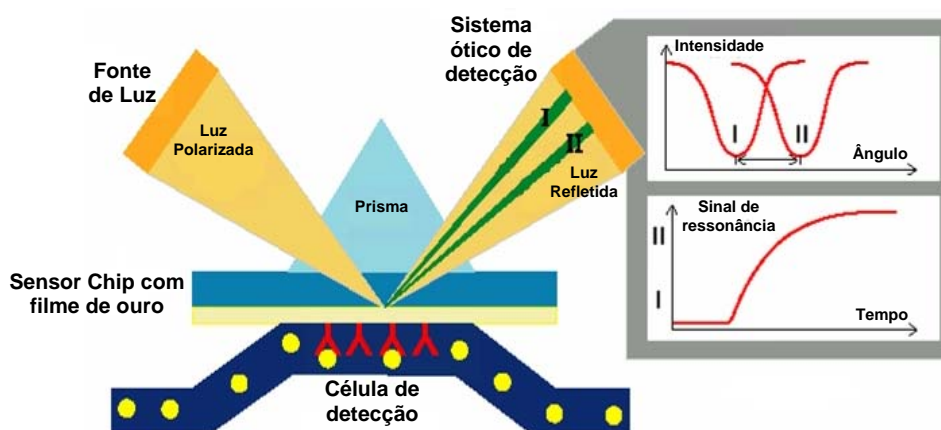


Figura 4.4 – Esquema geral do sistema de detecção de SPR do equipamento Biacore X[®].

Sensorgrama é um gráfico obtido em tempo real em que as medidas realizadas no equipamento Biacore X[®] podem ser visualizadas. Em um sensorgrama, o eixo das abscissas apresenta o tempo e o eixo das ordenadas a resposta medida em unidades de ressonância (RU). Um RU é equivalente a um pico grama por milímetro quadrado na superfície do sensor chip. Geralmente os sensorgramas apresentam uma etapa de associação na qual o tampão contendo o analito passa pela célula de detecção contendo o ligante imobilizado. Durante essa etapa é comum que o complexo ligante-analito se acumule na superfície do sensor chip, o que resulta em um aumento do sinal de SPR. Então, tem início a etapa de dissociação, na qual apenas o tampão passa pela célula de detecção e, à medida que o complexo ligante-analito se dissocia, o analito é removido da célula de detecção. A Figura 4.5 mostra um sensorgrama típico.

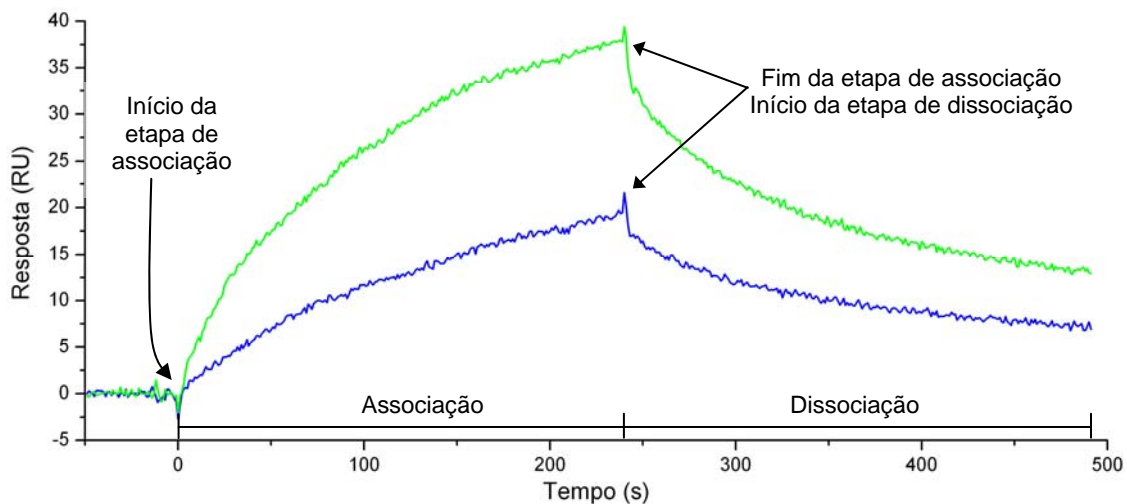


Figura 4.5 – Sensorgrama típico. As linhas coloridas em azul e verde mostram a variação do sinal de SPR em função do tempo em duas medidas diferentes. As etapas de associação e dissociação estão indicadas no próprio sensorgrama.

No caso de ensaios cinéticos, modelos matemáticos são utilizados na tentativa de reproduzir os dados experimentais para a determinação das taxas de associação e dissociação. Cada modelo possui termos que levam em consideração diversos fatores, por exemplo, a possibilidade de mais de um analito se ligar a cada ligante, a influência do tampão ou da

proteína no índice de refração da amostra (efeito *bulk*) ou mesmo uma possível instabilidade do sinal de SPR. Após o ajuste dos dados, cada um desses modelos gera curvas que idealmente deveriam reproduzir os dados experimentais. Diversos parâmetros são utilizados para avaliar quão bem os modelos reproduzem os dados experimentais, entre eles o desvio padrão de cada parâmetro ajustado pelo modelo, o χ^2 do ajuste das curvas e o gráfico dos valores residuais, que mostra a diferença entre os valores experimentais e os obtidos pelo modelo.

Entretanto, o modelo que se ajusta melhor aos dados experimentais pode não ser o modelo correto para descrever a cinética observada, e a decisão de qual modelo deve ser utilizado deve se basear na biologia do sistema estudado.

4.3.2 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

Na interface entre dois meios transparentes com índice de refração diferentes (vidro e água), a luz proveniente do lado de maior índice de refração é parcialmente refletida e parcialmente refratada. Acima de um ângulo de incidência crítico, nenhuma luz é refratada através da superfície, e a reflexão interna total é observada. Quando a luz incidente é totalmente refletida, seu componente elétrico do campo eletromagnético penetra uma pequena distância no meio de menor índice de refração, criando um campo de onda evanescente (do inglês, *evanescent field wave*) que decai exponencialmente com a distância da superfície. Se a interface entre os meios é coberta com uma camada suficientemente fina de metal, usualmente ouro, e a luz é monocromática e p-polarizada, a intensidade da luz refletida em um ângulo incidente específico é reduzida produzindo uma sombra (mínimo na intensidade), devida à transferência de energia pela ressonância entre o campo de onda evanescente e plasmons na superfície do metal^{113,114}.

As condições de ressonância são influenciadas pelo material adsorvido no filme de metal. Existe uma relação linear entre o ângulo de ressonância e a concentração de massa de moléculas bioquimicamente relevantes como proteínas, carboidratos e DNA. Assim o sinal de SPR, expresso em unidades de ressonância (RU), é uma medida indireta da massa na superfície do sensor chip. Isso significa que a associação e dissociação entre o ligante e o analito são observadas em tempo real, e que as taxas cinéticas e as constantes de equilíbrio podem ser calculadas.

A fonte de luz para SPR geralmente é um diodo de alta eficiência que emite luz próxima ao infravermelho com um intervalo fixo de ângulos de incidência. O sinal de SPR é monitorado por uma placa de diodos sensíveis a luz cobrindo todos os ângulos da luz refletida, e é detectado como um mínimo na luz refletida. O ângulo no qual a ressonância ocorre é detectado e convertido em unidades de ressonância. O sinal de SPR depende de vários fatores, principalmente do índice de refração do lado não iluminado da superfície onde o campo de onda evanescente se propaga e moléculas biológicas são imobilizadas. Além disso, o comprimento de onda da luz incidente e as propriedades do filme de metal também influenciam o sinal de SPR.

4.3.3 Imobilização de peptídeos ao sensor chip CM5

Para avaliar as interações entre os complexos TR-ligantes e os coativadores dos receptores dos hormônios da tireóide foram projetados 3 peptídeos derivados dos coativadores SRC2-2, DAX1-1 e TRBP-1, seus códigos e seqüências são **SRC2-2** (CGSGKHKILHRLQDSS), **DAX1-3** (CGSQGSILYSLTSSK) e **TRBP-1** (CGSGTSPLLVNLLQSDI). A literatura apresenta dados sobre a afinidade de peptídeos derivados desses co-ativadores e o complexo TR-T3¹¹², e a escolha das seqüências priorizou

peptídeos com maior afinidade, solubilidade e que não contivessem cisteínas em sua seqüência. Esses peptídeos apresentam a seqüência consenso LXXLL, necessária e suficiente para a interação com receptores nucleares. Estudos revelaram que o motivo LXXLL assume a conformação de alfa hélice ao se ligar a um sulco hidrofóbico no LBD dos TRs^{16,112}.

Todos os peptídeos tiveram a seqüência cisteína-glicina-serina-glicina adicionada a suas porções N-terminais. Essa seqüência de 4 aminoácidos foi projetada para aumentar a solubilidade dos peptídeos e servir de espaçadora entre a seqüência consenso e a matriz de dextrano, visando evitar impedimentos estéricos. Outra importante função dessa seqüência é disponibilizar um grupo tiol (presente na cisteína) para a realização do procedimento de acoplamento tiol.

4.3.3.1 Imobilização de peptídeos ao sensor chip CM5 por acoplamento amina

Os peptídeos derivados dos coativadores dos receptores do hormônio da tireóide foram imobilizados em sensor chips CM5 no equipamento Biacore X[®] utilizando a técnica de acoplamento amina. O procedimento foi realizado à temperatura de 20°C e fluxo de 5 uL/min, e está apresentado na Figura 4.6.

Sobre a superfície de um sensor chip CM5 foi aplicada uma mistura dos reagentes N-hidroxisuccinimida (NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) durante 1 minuto para a ativação da superfície pela modificação dos grupos carboximetil para ésteres de N-hidroxisuccinimida. A imobilização se deu pela injeção de 2 µL do peptídeo DAX1-3 em uma concentração de 85 µg/mL, em acetato de sódio 10 mM, pH 5.5, seguida pela lavagem com tampão HBS-EP, que é composto de HEPES 0.01 M (pH 7,4), NaCl 0.15 M, 3 mM EDTA e 0.005% do surfactante P20. Após a injeção do peptídeo foi realizada uma injeção de 40 µL de uma solução N-Etanolamina, para a inativação dos grupos reativos restantes. A

Figura 4.6 ilustra esse procedimento, realizado com o peptídeo DAX1-3, e nesse caso foram imobilizados aproximadamente 120 RU do peptídeo.

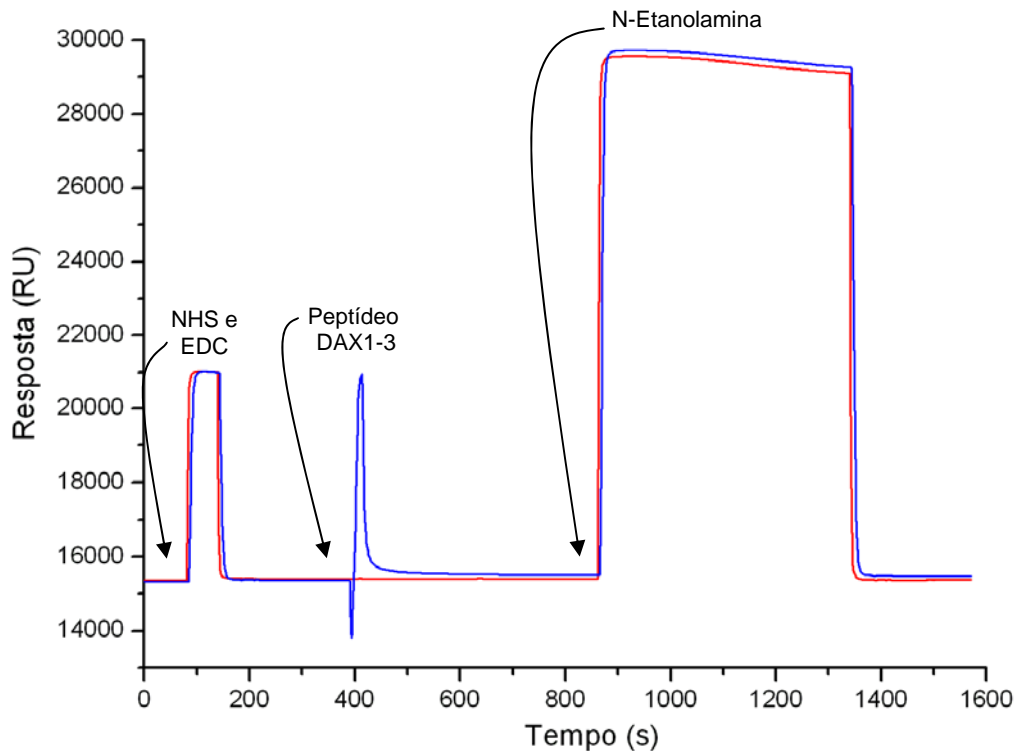


Figura 4.6 – Sensorgrama mostrando a imobilização do peptídeo DAX1-3 ao sensor chip CM5 pelo método de acoplamento amina. A linha vermelha mostra as medidas realizadas na FC1 e a linha azul as realizadas na FC2. As setas com legendas indicam as injeções de NHS e EDC, do peptídeo DAX1-3 e de N-Etanolamina. Note que todas as injeções ocorreram simultaneamente nas duas células de detecção, à exceção da injeção do peptídeo SRC2-2, que foi injetado apenas na FC2.

4.3.3.2 Avaliação e comparação entre os métodos de imobilização de peptídeos ao sensor chip CM5

Foram utilizadas as técnicas de imobilização dos peptídeos por acoplamento amina e acoplamento tiol. Ambas as abordagens propiciaram níveis aceitáveis de imobilização, e deve-se ter em mente que variando o tempo de contato com os reagentes e com o peptídeo é possível obter níveis ainda maiores de imobilização. Curiosamente, os chips imobilizados com os peptídeos DAX1-3 e SRC2-2 apresentaram atividade frente a complexos TR-ligantes, ao passo que os chips imobilizados com o peptídeo TRBP-1 não apresentaram nenhuma

atividade. Uma das possíveis explicações pode ser o fato do peptídeo TRBP-1 possuir um baixo ponto isoelétrico, o que tanto dificulta sua imobilização quanto pode interferir com sua atividade nas condições do experimento. Finalmente, o fator determinante na escolha do procedimento de imobilização foi a eficiência da etapa de regeneração após a realização de medidas utilizando complexos TR-ligantes como analitos. No sistema estudado a regeneração se mostrou difícil de ser realizada de forma a remover todo o analito do sensor chip, e mesmo após avaliar a capacidade de mais de 100 diferentes soluções de regeneração, incluindo condições extremas, não foram obtidos resultados satisfatórios para os chips imobilizados por acoplamento tiol.

A obtenção de uma condição onde a regeneração se dá de forma a remover totalmente o analito da superfície do sensor chip sem causar a perda da atividade do ligante imobilizado é essencial para a obtenção de medidas confiáveis e reprodutíveis. A condição que apresentou melhores resultados de regeneração foi a injeção de uma solução 50 mM de NaOH e 1 M de uréia, seguida de uma injeção de uma solução 50 mM de NaOH e finalmente mais uma injeção de tampão HBS-EP para a estabilização da linha de base. Essa condição de elevado pH pode reduzir a ligação dissulfeto responsável pela ligação do peptídeo imobilizado por acoplamento tiol ao sensor chip, o que torna impossibilita seu uso no caso de imobilizações por acoplamento tiol, mas não por acoplamento amina. Dessa forma, o método de acoplamento amina foi escolhido para a realização de todos os ensaios posteriores.

4.3.4 Padronização do método utilizando diferentes complexos TR-ligantes

Visando estabelecer um ensaio para a determinação da atividade agonista de diferentes ligantes dos receptores dos hormônios da tireóide foram realizados diversos experimentos utilizando vários complexos TR-ligantes como analitos. Controles positivos e negativos foram

realizados com agonistas e antagonistas conhecidos previamente incubados com diferentes concentrações de TR β , demonstrando a capacidade do método em discernir entre agonistas e antagonistas mesmo em diversas concentrações do receptor e dos ligantes.

Os sensorgramas resultantes desses ensaios são apresentados na Figura 4.7 e 4.8, que diferem apenas nas concentrações de TR β e T3 utilizadas. Nos dois ensaios os agonistas utilizados foram os hormônios endógenos T3 e T4, e o ligante sintético GC-1. Todos eles apresentaram clara atividade agonista. Como antagonista foi utilizado o ligante NH-3 e o TR β sem ligante foi utilizado como controle. Dois ensaios foram realizados utilizando diferentes concentrações de TR β e dos ligantes para demonstrar que o perfil das curvas nos sensorgramas é independente das concentrações pelo menos dentro do intervalo utilizado. Adicionalmente, as curvas foram feitas em duplicata para demonstrar a reprodutibilidade das medidas.

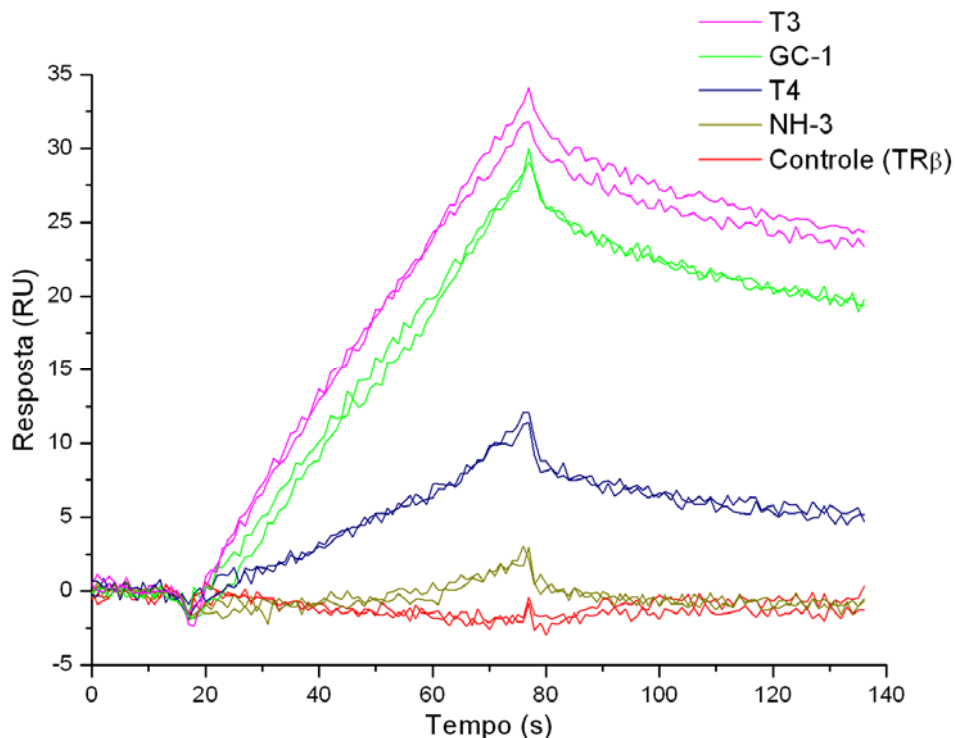


Figura 4.7 – Sensorgrama proveniente do ensaio com o peptídeo DAX1-3 e diferentes complexos TR-ligantes. As curvas apresentam as etapas de associação e dissociação do complexo TR β -ligantes ao peptídeo, as curvas foram realizadas em duplicatas. A legenda relaciona os ligantes utilizados em cada medida ao código de cores. As concentrações do receptor e dos ligantes foram respectivamente 112 nM e 400 nM.

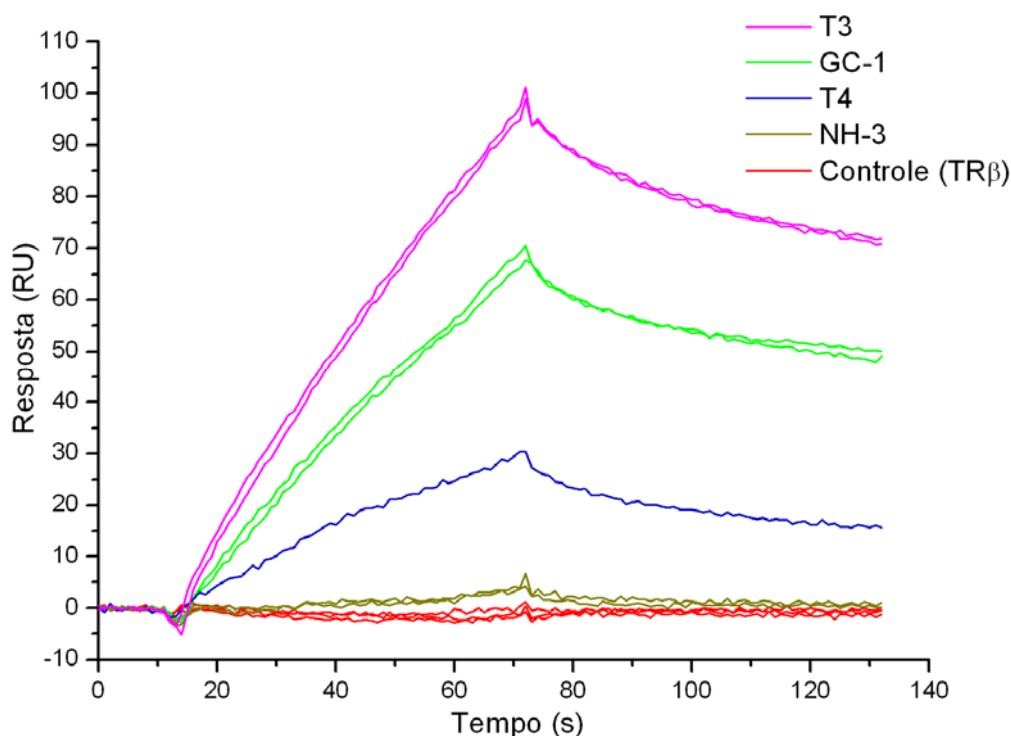


Figura 4.8 – Sensorgrama proveniente do ensaio com o peptídeo DAX1-3 e diferentes complexos TR β -ligantes. As curvas apresentam as etapas de associação e dissociação do complexo TR β -ligantes ao peptídeo, diversas curvas foram realizadas em duplicatas. A legenda relaciona os ligantes utilizados em cada medida ao código de cores. As concentrações do receptor e dos ligantes foram respectivamente 186 nM e 800 nM.

4.3.5 Determinação da atividade agonista dos compostos adquiridos da empresa *Maybridge*

Para verificar a possível atividade agonista dos compostos identificados anteriormente nos ensaios de triagem virtual e adquiridos da empresa *Maybridge*, foram realizados diversos experimentos utilizando o equipamento Biacore X[®]. Na ausência de informações sobre a atividade desses compostos, diversas concentrações de cada um foram testadas, e aqui apresentamos alguns desses resultados. No sensorgrama apresentado na Figura 4.9 são mostrados os resultados obtidos utilizando a concentração fixa de 56 nM do TR β previamente incubado com 0,2 μ M de T3 ou 10 μ M dos compostos adquiridos da empresa *Maybridge*. A curva referente ao complexo TR β -T3 (em magenta) mostra a atividade agonista do T3, e se destaca das outras. Mesmo em uma concentração cinquenta vezes maior que a de T3 os compostos testados não apresentaram atividade.

Também foram realizadas medidas utilizando maiores concentrações do receptor e dos ligantes, contudo os compostos adquiridos da empresa *Maybridge* não apresentam atividade agonista nas concentrações utilizadas, restando apenas as possibilidades de serem antagonistas ou apresentarem baixíssima atividade.

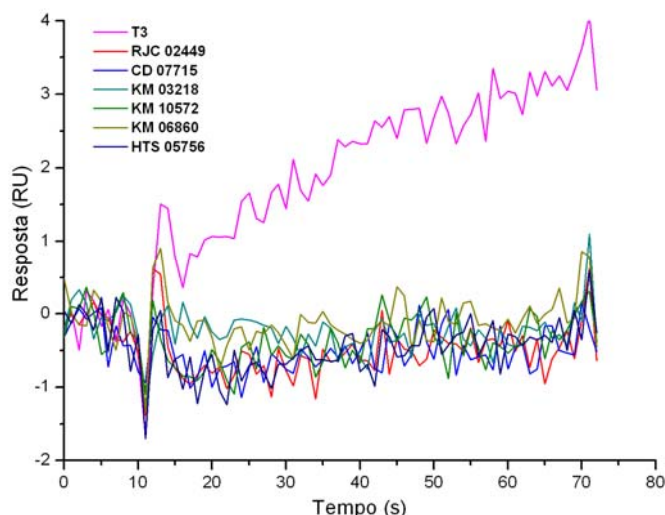


Figura 4.9 – Sensorgramas referentes ao ensaio com o peptídeo DAX1-3 e os compostos adquiridos da empresa *Maybridge*. A legenda de cores relaciona os compostos utilizados em cada medida ao código de cores, sendo que a curva referente ao hormônio T3 está apresentada em magenta. As curvas apresentam os dados de associação durante o período de 60 segundos. A concentração de TR β foi de 56 nM e o receptor foi previamente incubado com 0,2 μ M do hormônio T3 ou 10 μ M dos outros compostos.

4.3.6 Padronização dos ensaios cinéticos

Antes de realizar qualquer medida cinética definitiva, é necessário um meticuloso estudo visando estabelecer e padronizar as condições ideais para a realização desse tipo de medida, desde parâmetros gerais como temperatura, tampão e pH até parâmetros experimentais sutis como tempo de injeção, velocidade do fluxo, faixa de concentração do receptor, concentração do ligante e diversos outros. Dessa forma, nas sub-sessões seguintes apresentamos os ensaios preliminares, sendo que os estudos cinéticos definitivos se encontram na sessão 3.7.7 e a sessão 3.7.8 apresenta uma discussão geral sobre os resultados.

4.3.6.1 Ensaio cinéticos preliminares

Para padronizar as respostas obtidas com agonistas, diferentes concentrações de TR β , previamente incubadas com 2 μ M do hormônio T3, foram injetadas sobre a superfície do sensor chip. A cada injeção foi obtido o perfil cinético da interação entre o peptídeo e o complexo receptor-T3. As medidas de ligação foram realizadas sob um fluxo de 15 μ L/min, a 20 °C, utilizando a proteína purificada nas concentrações de 14, 28, 56, 80, 112, 186, 280 e 373 nM. Algumas curvas foram feitas em duplicata para a obtenção de um melhor ajuste experimental e demonstração da reprodutibilidade das medidas. Foram realizadas injeções de 60 μ L da proteína, equivalentes a 4 minutos de injeção. Durante a injeção a associação do complexo TR-T3 ao peptídeo imobilizado foi monitorada através de um sensorgrama e a dissociação do complexo foi monitorada por 10 min.

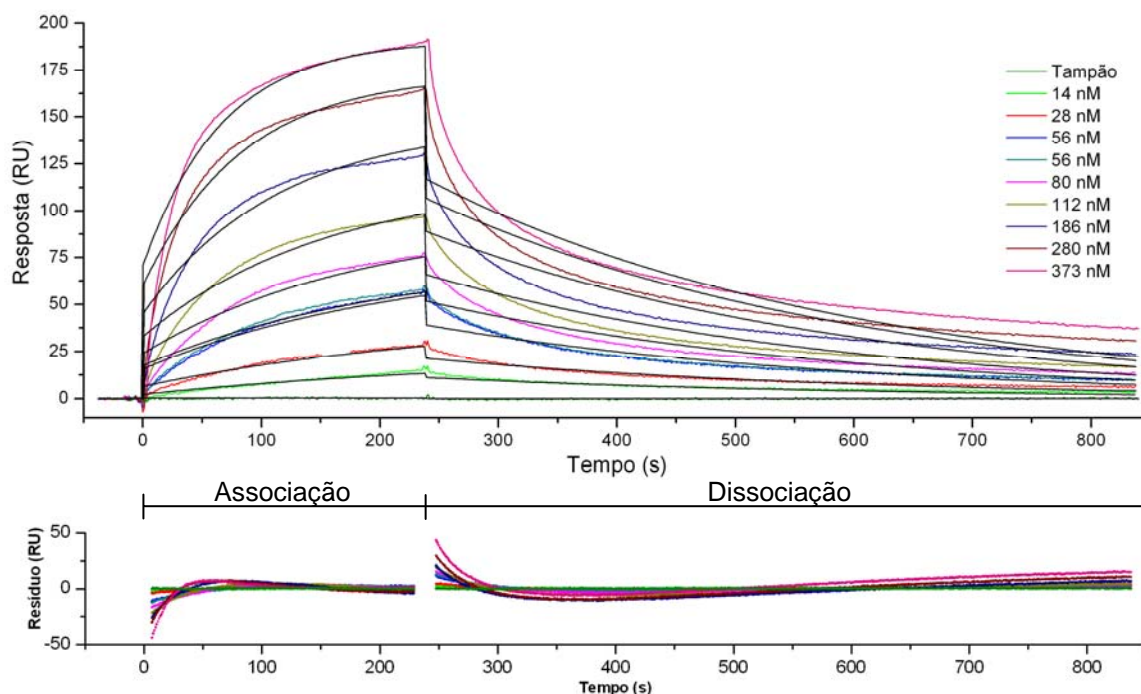


Figura 4.10 – Sensorgrama mostrando as curvas referentes às etapas de associação e dissociação de diferentes concentrações do complexo TR β -T3 ao peptídeo SRC2-2. A concentração do receptor foi de zero, 14, 28, 56, 80, 112, 186, 280 e 373 nM, e a de T3 foi 2 μ M. As linhas negras mostram o ajuste dos dados pelo modelo 1:1 de Langmuir. O gráfico residual também é apresentado, mostrando resíduos elevados e com tendência sistemática que indica o uso de um modelo não apropriado.

Para a análise dos resultados foi utilizado o software BIAevaluation 4.1 e o ajuste das curvas experimentais de acordo com o modelo de ligação 1:1 de Langmuir. Os resultados podem ser visualizados no sensorgrama apresentado na Figura 4.10.

O modelo 1:1 de Langmuir é o mais simples dos modelos cinéticos possíveis, e assume que duas espécies A e B interagem para formar uma nova espécie AB, sendo que taxas de associação e dissociação dessas espécies, respectivamente k_1 e k_{-1} , determinam a cinética do sistema. Contudo, como se pode ver claramente pelo ajuste visivelmente pobre das curvas e pelos elevados resíduos de cada curva, que apresentam tendências sistemáticas, o modelo de Langmuir não foi capaz de apresentar um ajuste satisfatório para os dados experimentais, indicando que a interação entre complexos TR-T3 e seus co-ativadores pode seguir uma cinética um pouco mais elaborada.

4.3.6.2 Ensaio de limitação de transferência de massa

Novos experimentos foram realizados na tentativa de explicar os dados experimentais. Uma das possibilidades levantadas foi a de que estivesse ocorrendo limitação de transferência de massa (do inglês, *Mass Transfer Limitation*). Esse fenômeno ocorre quando as moléculas do ligante imobilizadas no chip removem o analito da solução injetada mais rapidamente que a velocidade de difusão é capaz de repor essas moléculas de analito, de forma que a concentração efetiva do analito nas proximidades da superfície do chip é menor que a concentração injetada¹¹⁵. Quando isso ocorre o sinal de SPR é menor que o esperado para determinada concentração, uma vez que a concentração medida é menor que a injetada.

Limitação de transferência de massa é uma das complicações mais comuns no tratamento de dados cinéticos. A taxa de ligação observada é limitada por transferência de massa se a taxa de transferência do analito para a superfície do sensor chip for

significativamente mais lenta que a taxa de associação. O efeito da transferência de massa é reduzir ambas as taxas - de associação, porque o analito não alcança a superfície do sensor chip rápido suficiente, e dissociação, porque o analito não é transportado suficientemente rápido para longe da superfície, e assim fica disponível para se ligar novamente.

Esse fenômeno ocorre mais comumente quando se usam baixas concentrações de analito, baixa velocidade de fluxo ou quando uma elevada quantidade de ligante é imobilizada no sensor chip.

Em concordância com experimentos anteriores, os quais apontaram para não ocorrência do fenômeno da limitação de transferência de massa no sistema em questão, os experimentos realizados confirmaram que esse fenômeno não ocorre de forma relevante nesse sistema, como mostra a figura 4.11, em se pode observar que a variação da velocidade do fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ não alterou de forma significativa a quantidade total de analito imobilizado (resposta máxima) e nem o perfil de dissociação.

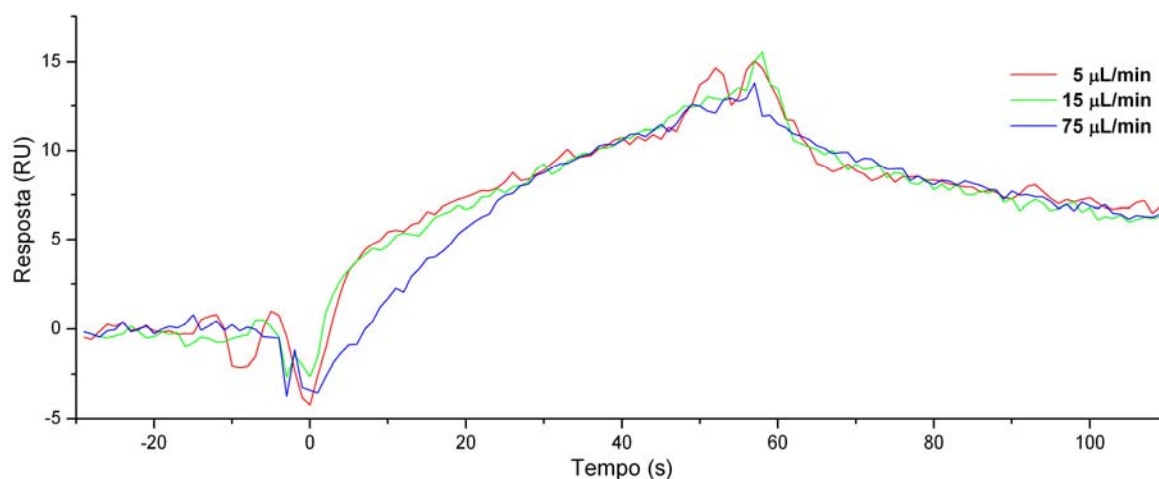
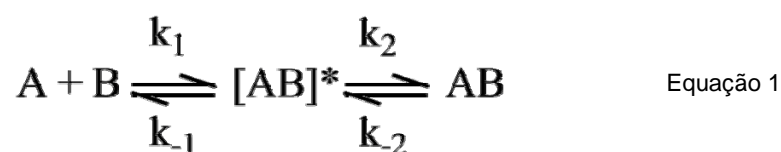


Figura 4.11 – Sensorgrama mostrando as curvas referentes ao ensaio de limitação de transferência de massa. Todas as medidas foram realizadas utilizando as concentrações de 56 nM de TR e 2 μM de T3. A curva vermelha foi feita com um fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, a verde com fluxo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a azul com fluxo de 75 $\mu\text{L}/\text{min}$. O sensorgrama mostra que em todos os casos uma mesma quantidade do complexo TR-T3 se ligou ao sensor chip.

4.3.6.3 Modelo de mudança conformacional

Outra possibilidade, baseada em evidências estruturais^{16,33}, foi a de o coativador ou o complexo TR-T3 sofrer uma mudança conformacional durante sua interação. Foi então planejado e realizado um experimento para testar essa hipótese. Como mencionado anteriormente, o modelo 1:1 de Langmuir assume que duas espécies A e B interagem para formar uma nova espécie AB, sendo que taxas de associação e dissociação dessas espécies, respectivamente k_1 e k_{-1} , determinam a cinética do sistema. Já o modelo de mudança conformacional (também denominado modelo de dois estados ou modelo de encaixe induzido) descreve a ligação 1:1 do analito ao ligante imobilizado, seguido por uma mudança conformacional no complexo. Nesse caso, o ligante e o analito descritos por A e B interagem formando uma espécie intermediária AB^* , que sofre uma mudança conformacional dando origem a uma nova espécie AB, como pode ser observado na Equação 1. Esse modelo no qual uma mudança conformacional ocorre após a formação do complexo representa um encaixe induzido.



Se a interação entre o complexo TR-T3 e seus co-ativadores ocorre em duas etapas, envolvendo um rápido encontro seguido por um rearranjo mais lento no qual o complexo AB mais estável é formado, então a taxa de dissociação observada deve se tornar menor à medida que o tempo de associação é aumentado, porque uma maior fração da espécie mais estável AB (com taxa de dissociação mais lenta) é acumulada.

4.3.6.3.1 Variação do tempo de associação

Para verificar a influência do tempo de associação na etapa de dissociação, o que pode indicar a ocorrência de uma mudança conformacional na interação entre o complexo TR β -T3 e o peptídeo imobilizado, uma alta concentração do analito (280 nM TR β e 10 μ M T3) foi previamente incubada e injetada sobre a superfície do sensor chip utilizando velocidades de fluxo 5 μ L/min por 4 min, 8 min, 12 min e 16 min, e a dissociação foi monitorada por 4 minutos. Os dados foram normalizados tornando a resposta no início da dissociação igual a 1 em cada curva. Os experimentos de variação do tempo de associação mostram que, na medida em que o tempo de contato aumenta, a taxa de dissociação diminui (Figura 4.12). Esse resultado sugere que a interação entre o complexo TR β -T3 e os peptídeos contendo a sequência consenso LXXLL segue uma cinética de dois estados em que as duas espécies participam de um evento de ligação seguido por um encaixe induzido mais lento. Assim, o modelo de mudança conformacional pode ser utilizado para explicar a dependência da taxa de dissociação no tempo de associação, pois o aumento do tempo de associação propicia que uma maior parte do complexo sofra a mudança conformacional que o torna mais estável, dissociando de acordo com k_2 ¹¹⁶. Dessa forma, os mesmos dados apresentados na Figura 4.10 foram ajustados de acordo com o modelo de mudança conformacional, que propiciou um ajuste melhor, conforme apresentado na Figura 4.13.

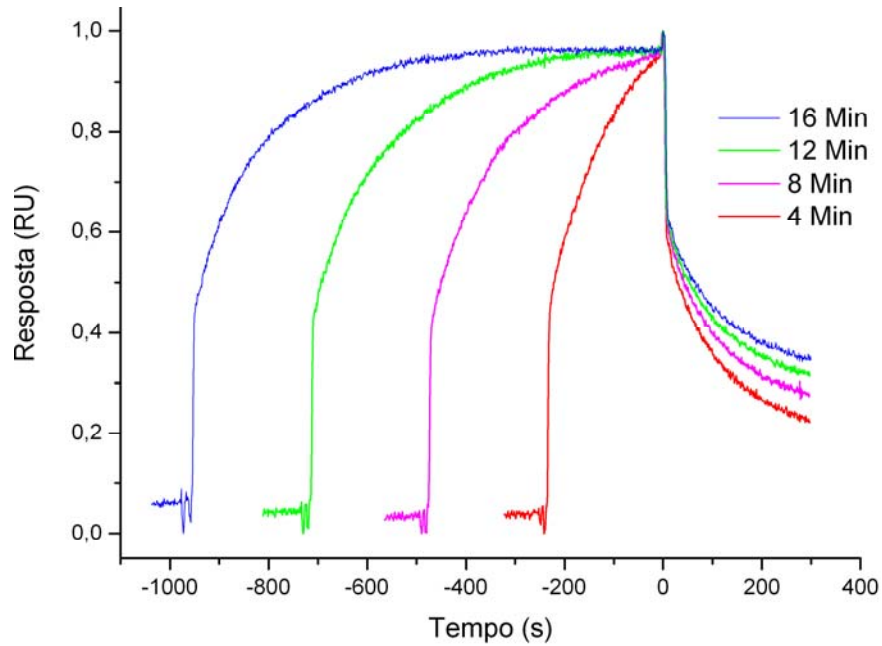


Figura 4.12 – Dependência da taxa de dissociação observada no tempo de associação. Amostras contendo TR β na concentração de 280 nM foram incubadas previamente com 10 μ M de T3 e injetadas por 4, 8, 12, 16 minutos sobre a superfície do sensor chip em que o peptídeo SRC2-2 foi previamente imobilizado. A sobreposição das curvas normalizadas, especialmente as curvas em verde e azul, onde o equilíbrio é atingido, mostram claramente que a taxa de dissociação observada diminui em função do tempo de associação.

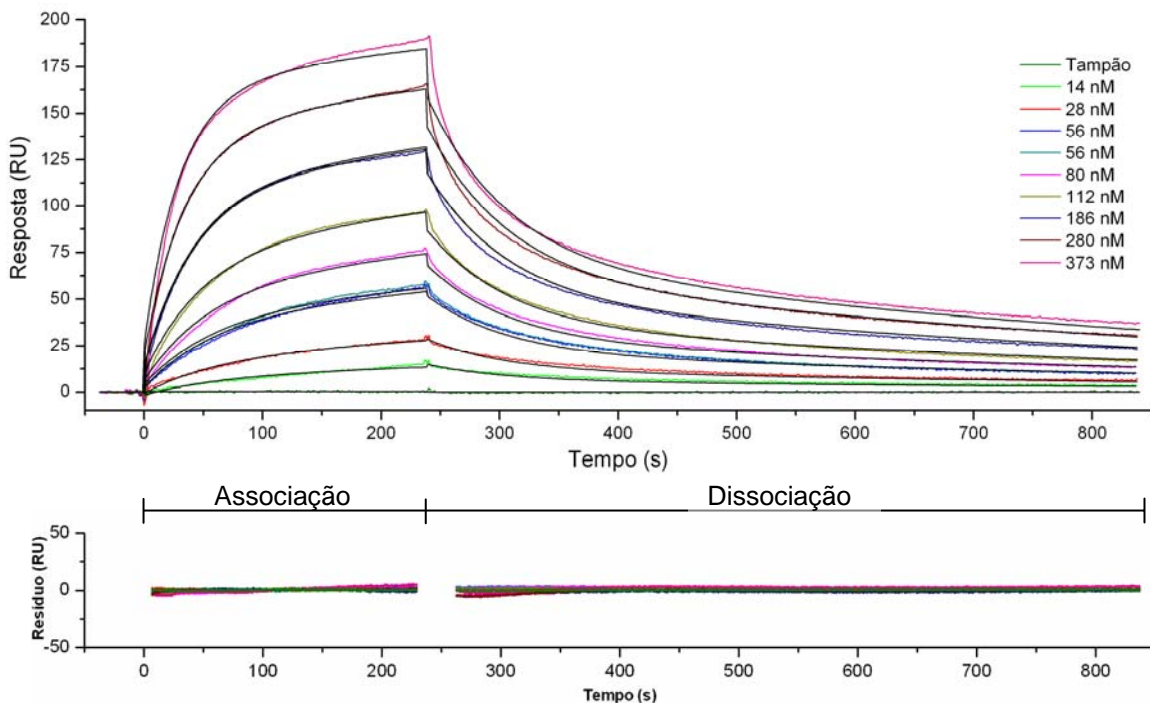


Figura 4.13 – Sensorgrama mostrando os mesmos dados apresentados na **Figura 4.12** ajustados pelo modelo de mudança conformacional. O gráfico residual utilizando a mesma escala para fins de comparação também é apresentado, mostrando resíduos baixos e uniformemente distribuídos, um indicio de que o modelo utilizado é apropriado.

4.3.6.4 Mudança conformacional e simulação das taxas cinéticas

O modelo de mudança conformacional determina as quatro taxas cinéticas descritas pela Equação 1, o que permite a simulação de curvas para as espécies AB* e AB, que somadas ao efeito *bulk* (influência dos componentes do tampão e da própria proteína no índice de refração da amostra) formam a resposta observada. Nesse modelo, a espécie intermediária AB* se forma rapidamente, sendo lentamente convertida na espécie mais estável, AB. No início da etapa de associação, a maioria do complexo se encontra na forma AB*, ao passo que após as duas curvas se cruzarem a espécie AB predomina. O tempo necessário para que as duas curvas se cruzem, no momento em que AB* = AB, é chamado T₅₀ da formação do complexo. O significado biológico do T₅₀ é a existência de uma transição no estado molecular predominante do complexo: antes do T₅₀ a espécie AB* predomina, e após o T₅₀ a espécie mais estável AB predomina. Essa transição tem um impacto direto no planejamento dos experimentos¹¹⁶, pois se o tempo de associação (T_a) utilizado no experimento é significativamente menor que o T₅₀, então a taxa de dissociação observada representa principalmente a taxa de dissociação do complexo AB*, k₋₁, ao passo que se o T_a for muito maior que o T₅₀ a taxa de dissociação observada representa principalmente a forma mais estável AB, k₋₂. Portanto, o planejamento de experimentos cinéticos envolvendo mudanças conformacionais deve incluir diferentes T_a, garantindo que o T₅₀ está representado para que, através do modelo, as taxas k₋₁ e k₋₂ possam ser obtidas de forma precisa¹¹⁷.

Contudo, ao utilizar o modelo gerado para simular um gráfico dos componentes da resposta observada (Figura 4.14), verificou-se que o tempo de injeção de 4 minutos é menor que o T₅₀, pois as curvas não se cruzam na etapa de associação, portanto o modelo ajustado aos dados experimentais não representa de forma plena as taxas k₋₁ e k₋₂.

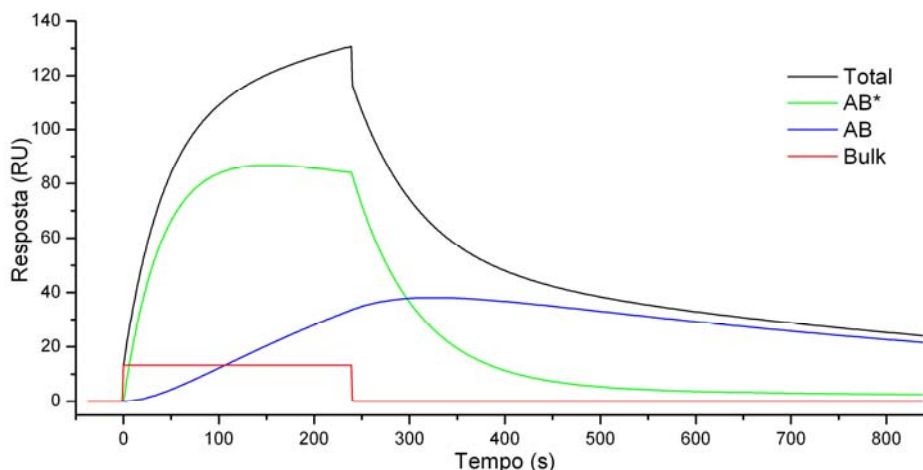


Figura 4.14 – Simulação realizada utilizando as taxas cinéticas obtidas pelo modelo de mudança conformacional para os componentes da resposta observada na curva correspondente a concentração de 186 nM apresentada no sensorgrama apresentado na **Figura 4.13**. A curva em preto corresponde à resposta total, a curva verde a contribuição da espécie AB*, a curva em azul a contribuição da espécie AB e a curva em vermelho a contribuição do efeito de bulk e instabilidade da linha de base. Note que o tempo de associação de 4 minutos (T_a) é menor que o T_{50} , pois as curvas não se cruzam na etapa de associação, portanto o modelo ajustado aos dados experimentais não representa de forma plena as taxas k_1 e k_2 .

Foi então planejado um experimento no qual o tempo de associação (T_a) fosse longo o suficiente para representar de forma correta as taxas k_1 e k_2 . O sensorgrama e o gráfico residual resultantes do ajuste dos dados pelo modelo de mudança conformacional são apresentados na Figura 4.15. As medidas da concentração de 56 nM foram realizadas em triplicata, demonstrando assim a reprodutibilidade das medidas, e o gráfico residual sugere que o modelo de mudança conformacional ajusta os dados de forma satisfatória.

Para a verificação de que o T_a utilizado (20 minutos) foi suficientemente longo para incluir o T_{50} , foi realizada uma simulação do gráfico dos componentes da resposta observada empregando o modelo utilizado para ajustar os dados. As simulações dos componentes das curvas referentes às concentrações de 56 nM e 280 nM estão apresentadas na Figura 4.16, em que observa claramente que as curvas referentes as espécies AB* e AB se cruzam na etapa de associação, o que sugere que o modelo ajustado aos dados experimentais representa ambas as taxas k_1 e k_2 .

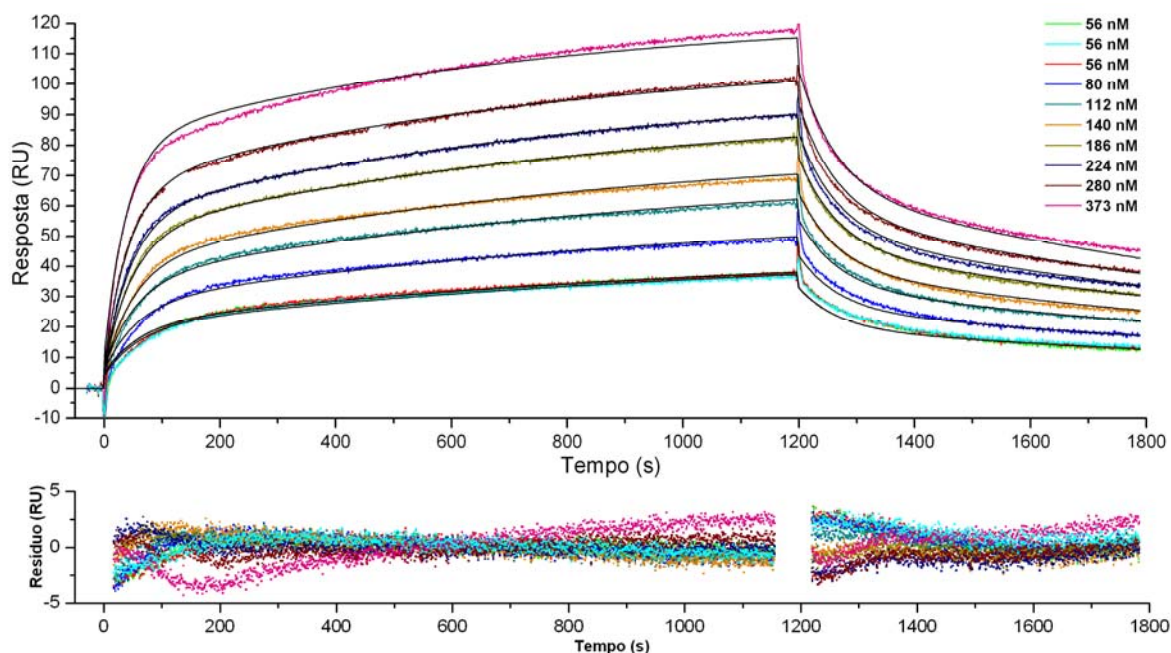


Figura 4.15 – Sensorgrama e gráfico residual referentes ao experimento planejado de forma que o tempo de associação (T_a) represente de forma correta as taxas k_{-1} e k_{-2} . Foi utilizado um T_a de 1200 segundos e as concentrações de TR β utilizadas foram 56, 80, 112, 140, 186, 224, 280 nM e 373 nM. A concentração de 56 nM foi feita em triplicata, mostrando a reprodutibilidade das medidas. Os dados foram ajustados pelo modelo de mudança conformacional. Foi utilizado o peptídeo SRC2-2, e em todas as curvas a concentração de T3 utilizada foi de 12 μ M. O gráfico residual apresenta resíduos baixos, um indício de que o modelo utilizado é apropriado.

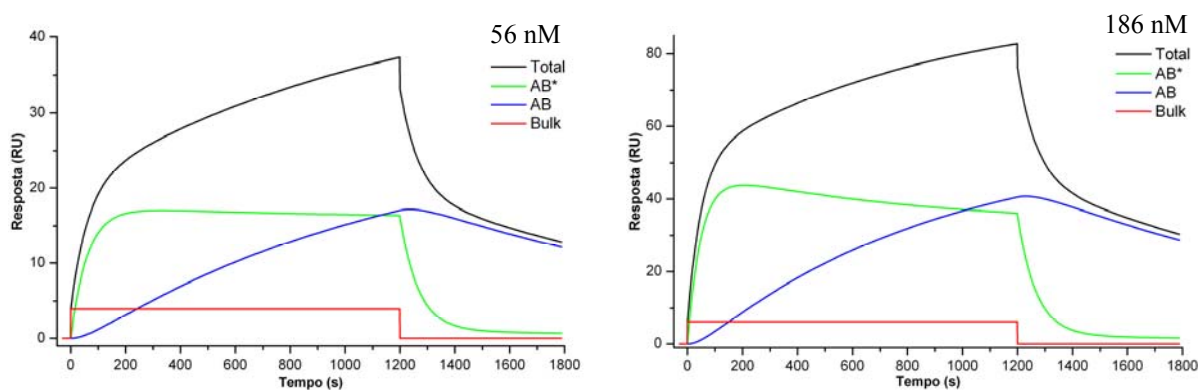


Figura 4.16 – Simulação dos componentes da resposta observada nas curvas correspondentes as concentrações de 56 e 186 nM do sensorgrama apresentado na **Figura 4.15**. A curva em preto corresponde à resposta total, a curva verde a contribuição da espécie intermediária AB*, a curva em azul a contribuição da espécie AB e a curva em vermelho a contribuição do efeito *bulk*. Note que as curvas se cruzam na etapa de associação, portando o tempo de associação de 20 minutos (T_a) é maior que o T_{50} , portanto o modelo ajustado aos dados experimentais representa ambas as taxas k_{-1} e k_{-2} .

O ajuste dos dados ao modelo de mudança conformacional também propiciou a determinação das taxas cinéticas e das constantes de associação (K_A) e dissociação (K_D) para

a interação entre o complexo TR-T3 e o peptídeo DAX1-3. Esses dados estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Taxas cinéticas e constantes de associação e dissociação obtidas pelo ajuste das medidas apresentadas na Figura 4.15 pelo modelo de mudança conformacional.

k_1 (1/Ms)	k_{-1} (1/s)	k_2 (1/s)	k_{-2} (1/s)	K_A (1/M)	K_D (M)
$3,19 \times 10^4$	$1,34 \times 10^{-2}$	$1,36 \times 10^{-3}$	$7,86 \times 10^{-3}$	$6,40 \times 10^6$	$1,56 \times 10^{-7}$

4.3.6.5 Parâmetros estatísticos

Um dos modos mais utilizados para se avaliar a qualidade do ajuste das curvas em um sensorgrama é o gráfico residual, que é um gráfico da diferença entre os dados experimentais e o ajuste obtido pelo modelo para cada curva. Caso o modelo utilizado para o ajuste seja o correto, o espalhamento no gráfico residual é uma medida do ruído no sinal. Para um ajuste ideal os níveis de ruído devem ser da ordem de ± 2 RU, se apresentando como um espalhamento dos valores residuais nesse intervalo. A forma do gráfico residual revela a ocorrência de desvios sistemáticos entre os dados experimentais e o ajuste obtido pelo modelo¹¹⁸. Desvios sistemáticos pronunciados indicam que o modelo utilizado pode não ser o mais apropriado para o ajuste dos dados experimentais.

Para os dados provenientes de um sensorgrama, o número de pontos medidos é muito maior que o número de parâmetros ajustados, de forma que o χ^2 (χ^2) se aproxima da média quadrática dos resíduos (razão sinal/ruído). Valores de χ^2 menores que 10 são frequentemente aceitáveis¹¹⁹. Outro parâmetro estatístico avaliado é o erro padrão, comumente expresso como valor-T (do inglês, *T-Value*), que é o valor do parâmetro estimado dividido pelo seu erro padrão. O uso do valor-T torna mais fácil a comparação do erro padrão de medidas com valores absolutos diferentes (como k_1 e k_{-1}). De uma forma geral, se um valor-T é maior que 10, tem-se uma indicação de que o parâmetro em questão é significativo.

Do ponto de vista estatístico, o modelo de mudança conformacional utilizado para o ajuste dos dados apresentados na Figura 4.15 apresentou um ajuste satisfatório, com um χ^2 de 1,02. Os valores-T associados a cada parâmetro também são aceitáveis, conforme apresentado na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Valores-T das quatro taxas cinéticas obtidas pelo ajuste das medidas apresentadas na Figura 4.15 pelo modelo de mudança conformacional.

T(k ₁)	T(k ₋₁)	T(k ₂)	T(k ₋₂)
206	175	198	177

4.3.7 Medidas nas condições selecionadas

Após o estudo das condições experimentais apresentado nas sessões anteriores, foram realizadas medidas cinéticas nas condições selecionadas, visando a obtenção de dados confiáveis e reprodutíveis. Esses estudos foram submetidos para publicação em revista especializada.

4.3.7.1 Imobilização dos peptídeos

Todos os procedimentos de imobilização foram realizados a 20 °C utilizando HBS-EP como tampão. Sensor chips CM5 novos foram inseridos no equipamento e a função *prime* foi utilizada ao menos três vezes com duas injeções de NaOH 50 mM por 30 segundos intercaladas, e as medidas tiveram início apenas quando uma linha de base estável foi alcançada.

Para a imobilização dos peptídeos foi utilizado um protocolo de acoplamento amina modificado, projetado para a obtenção de um baixo nível de imobilização. Resumidamente, os grupos carboxil do sensor chip CM5 foram ativados por uma injeção de 5 μ L (1 minuto) de uma solução recém preparada de 200 mM de EDC e 50 mM de NHS. 1 μ L de uma solução do peptídeo a 20 mg/mL em tampão acetato de sódio (pH 5.5) foi injetada apenas na FC 2 utilizando o modo de injeção manual, seguido por uma injeção de 40 μ L (8 minutos) de N-etanolamina em ambas FC1 e FC2 para garantir a inativação de qualquer grupo reativo N-hidroxisuccinimida na superfície do sensor chip. Essa metodologia rotineiramente propicia a imobilização de menos de 100 RU de peptídeo. Após a imobilização, um fluxo contínuo de tampão HBS-EP foi mantido sobre a superfície do sensor chip por pelo menos 12 horas. A imobilização dos peptídeos contendo o motivo LXXLL utilizando o acoplamento amina deu origem a superfícies ativas que interagem com o TR β ligado a um agonista de forma dependente da concentração.

4.3.7.2 Determinação das condições de regeneração

Após um estudo cauteloso das possíveis condições de regeneração, o melhor procedimento encontrado foi a injeção por 1 minuto de uma solução contendo 1 M de uréia e 50 mM de NaOH, seguida por uma injeção de 50 mM de NaOH por 1 minuto e finalmente uma injeção de tampão por 1 minuto.

4.3.7.4 Variação no tempo de incubação do receptor com o hormônio

Notamos que a resposta de SPR depende do tempo de incubação da proteína com os ligantes. Para verificar como o tempo de incubação afeta a interação do complexo receptor-hormônio com o peptídeo imobilizado, e para determinar o tempo ideal de incubação a ser

utilizado nos experimentos cinéticos, amostras contendo 373 nM de TR β e 10 μ M de T3 foram preparadas e injetadas imediatamente, e as mesmas amostras foram injetadas novamente em intervalos regulares de pelo menos 80 minutos. A associação e dissociação foram monitoradas por 2 minutos.

A Figura 4.17 mostra que a mesma amostra de TR β -T3 apresenta um aumento em sua ligação aos peptídeos imobilizados em função do tempo de incubação. Amostras recém-preparadas de TR β -T3 apresentam uma resposta menor que a que produzem uma ou duas horas após seu preparo. Para os peptídeos derivados de DAX1-3, a resposta máxima é alcançada duas horas e meia após o preparo da amostra, ao passo que a resposta máxima para os peptídeos derivados de SRC2-2 foi observada após quatro horas de incubação.

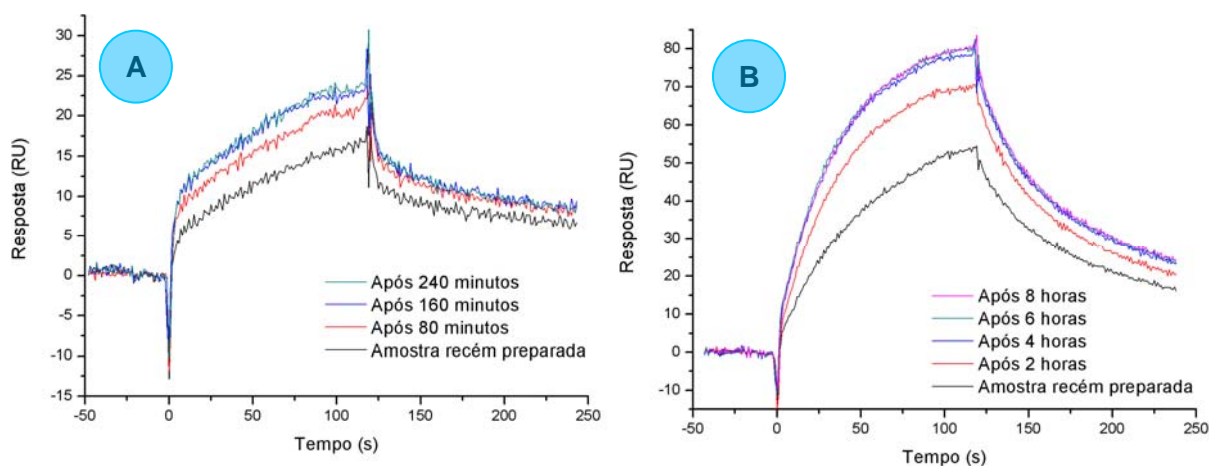


Figura 4.17 - Dependência da resposta de SPR no tempo de incubação. **(A)** Superfície com o peptídeo derivado de DAX-1. Uma amostra contendo 373 nM de TR β e 10 μ M de T3 foi injetada imediatamente após o seu preparo e 80, 160 e 240 minutos depois. **(B)** Superfície com o peptídeo derivado de SRC2-2. Uma amostra contendo 373 nM de TR β e 10 μ M de T3 foi injetada imediatamente após o seu preparo e 2, 4, 6 e 8 horas depois. Em todos os casos a resposta variou em função do tempo de incubação.

Esse período de incubação imprescindível para que as amostras produzam resposta máxima pode corresponder ao tempo necessário para que a hélice 12 do TR β ligado ao T3 assumira a conformação mais estável junto ao LBD, formando assim a superfície de interação com os coativadores, AF-2.

4.3.7.5 Variação da concentração do hormônio

Ao invés de assumir que o TR β seria saturado por uma concentração do hormônio bem acima de seu K_D , decidimos realizar experimentos para verificar que concentrações do hormônio apresentariam resposta máxima. Para avaliar a influência da concentração de hormônio na resposta de SPR e para determinar quais concentrações de ligante geram resposta máxima, 373 nM de TR β foi incubado tipicamente com concentrações de 0,8 μ M, 2 μ M, 8 μ M, 12 μ M e 16 μ M de T3. Os tempos de associação e dissociação foram de 2 minutos cada.

Sabe-se que a interação entre TR β e T3 apresenta o K_D de 112 pM²⁷. Com isso em vista, esperava-se que uma concentração mil vezes maior que 112 pM de T3 deveria produzir a resposta máxima, contudo, surpreendentemente, a resposta máxima foi observada apenas quando concentrações muito maiores de T3 foram empregadas. De fato, como mostrado na Figura 4.18, a resposta de SPR apenas alcança seu máximo por volta de 8 μ M, e concentrações de 0,8 μ M, 2 μ M e 8 μ M claramente produzem respostas distintas. Essa dependência na concentração de ligante foi observada tanto para os peptídeos derivados de DAX1-3 quanto para os derivados de SRC2-2.

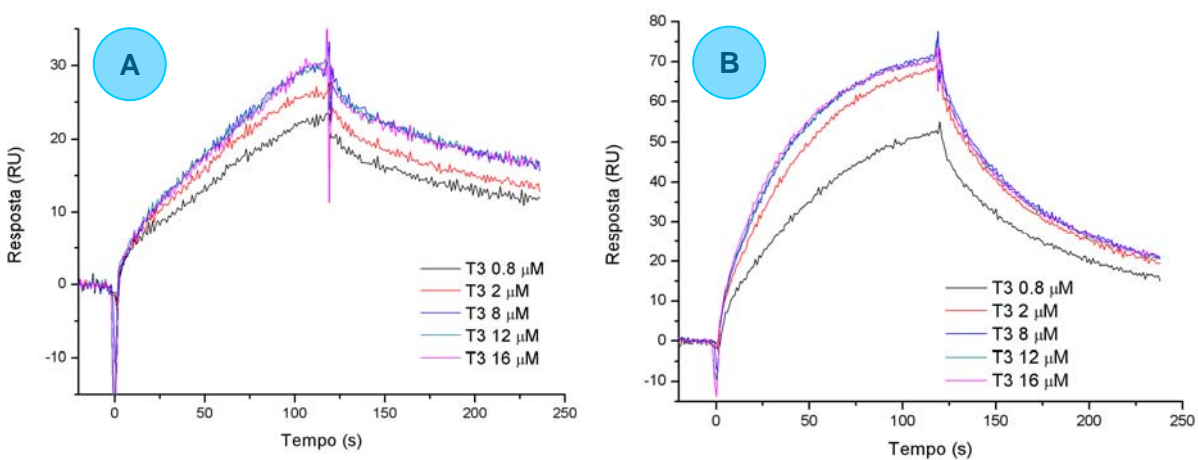


Figura 4.18 - Dependência da resposta de SPR na concentração de hormônio. Amostras recém preparadas contendo 373 nM de TR β e 0,8, 2, 8, 12 e 16 μ M de T3 foram injetadas sobre a superfície do *sensor chip* em que os peptídeos derivados de DAX1-3 e SRC2-2 foram previamente imobilizados. (A) DAX-1. (B) SRC2-2. A sobreposição das curvas mostra a dependência na concentração de hormônio.

Esse padrão de dependência da concentração não varia com o tempo de incubação das amostras, por exemplo, amostras contendo 0,8 μM de T3 apresentam resposta menor que amostras contendo 8 μM de T3, independente de serem incubadas por qualquer período de tempo. Uma conclusão geral é que se deve tomar um cuidado especial a respeito do tempo de incubação e concentração do ligante quando planejando experimentos utilizando o LBD de TR β e agonistas.

4.3.7.6 Influência do ligante no complexo receptor-ligante

As respostas de SPR relativas à interação do complexo TR β com outros ligantes bem conhecidos, como os agonistas T4⁷⁴, Triac⁴⁶, GC-1⁴⁶ e o antagonista NH-3¹²⁰ também foram investigadas (Figura 4.19). Apesar de apresentar uma resposta menor na mesma concentração, os complexos de TR β com esses agonistas apresentaram o mesmo comportamento que o complexo TR β -T3. O antagonista NH-3 claramente apresentou uma resposta menor que todos os agonistas, o que sugere que essa metodologia pode ser utilizada não apenas para a busca de novos ligantes para TR β , mas também para discernir entre agonistas e antagonistas do TR β -T3.

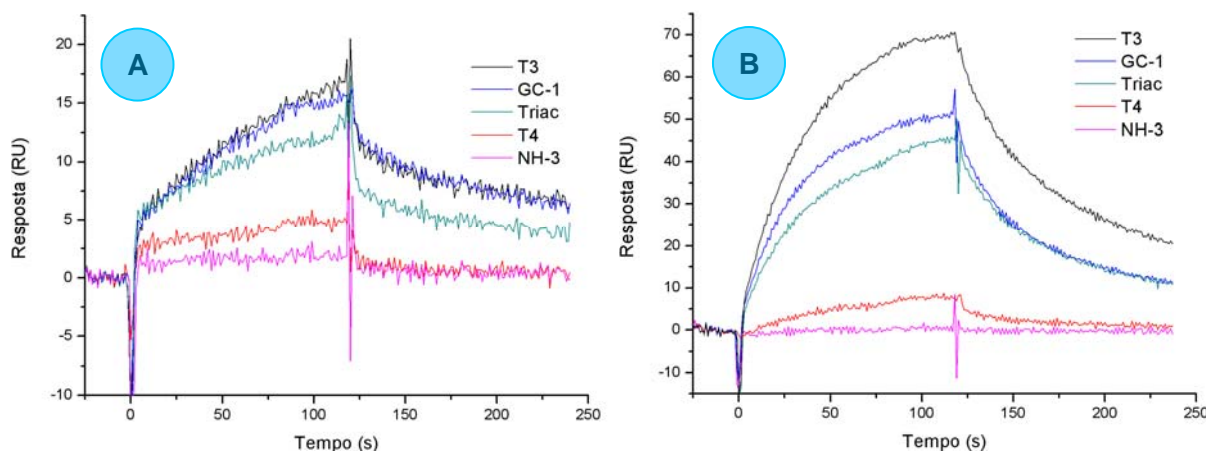


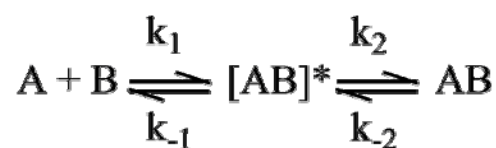
Figura 4.19 - Resposta de SPR causada por diferentes ligantes do TR β . Agonistas (T3, GC-1, Triac e T4) produzem uma resposta muito maior que o antagonista (NH-3). (A) DAX-1. (B) SRC2-2.

4.3.7.7 Ensaio Cinéticos

Em todas as medidas cinéticas, diferentes concentrações de TR β , previamente incubadas com 10 uM de T3 por 2 horas no caso do peptídeo DAX1-3 ou por 4 horas no caso do peptídeo SRC2-2, foram injetadas sobre a superfície ativa e também sobre uma superfície inativa sem o peptídeo imobilizado. Um fluxo de 5 μ L/min foi utilizado para propiciar injeções longas, e o tempo de associação foi de 10 minutos para DAX1-3 e 20 minutos para SRC2-2, e a dissociação foi monitorada por 10 minutos em todos os casos.

4.3.7.8 Tratamento e análise dos dados cinéticos

Para remover as respostas decorrentes da mudança do índice de refração das amostras, as respostas da superfície de referência foram subtraídas das respostas da superfície ativa com os peptídeos imobilizados. Todos os dados cinéticos também foram submetidos ao processo de referência dupla¹²¹, um procedimento no qual a resposta de uma injeção de tampão é subtraída de todas as medidas, corrigindo os dados através da remoção de artefatos que possam ocorrer sistematicamente em todas as injeções. Empregando o programa *BIAevaluation* 4.1 todos os dados cinéticos foram analisados por um ajuste global de pelo menos oito diferentes sensorgramas. Os ajustes individuais das curvas são bem descritos pelo ajuste global. Os melhores ajustes foram obtidos utilizando o modelo de mudança conformacional, que descreve o evento de ligação como um evento em duas etapas (equação 1)¹¹⁶.



Equação 1

As constantes de equilíbrio para as etapas individuais são $K_{a1} = k_{on}/k_{off}$ e $K_{a2} = k_2/k_{-2}$. A constante de equilíbrio para todo o processo de interação é:

$$K_A = K_{a1}(1 + K_{a2}) \quad \text{Equação 2}$$

As medidas cinéticas foram realizadas a partir da injeção de uma série de concentrações de TR β previamente incubadas com 10 μ M de T3 por 2 ou 4 horas, quando utilizando os peptídeos derivados de DAX1-3 ou SRC2-2, respectivamente. As amostras foram injetadas sobre a superfície do sensor chip onde os peptídeos foram imobilizados sob um fluxo de 5 μ L/min para permitir longos tempos de injeção. Como apresentado na Figura 4.20, o complexo TR β -T3 interage com os peptídeos imobilizados de forma dependente da concentração de TR β . Como indicado pelos experimentos de variação no tempo de associação, o melhor ajuste dos dados cinéticos ocorreu de acordo com o modelo de mudança conformacional. Esse modelo descreve a ligação 1:1 do complexo TR β -T3 aos peptídeos imobilizados seguida de uma mudança conformacional (Equação 1). A Figura 4.20 mostra os dados cinéticos e o ajuste obtido com o modelo de mudança conformacional, e a Tabela 4.9 mostra os parâmetros obtidos nesse ajuste.

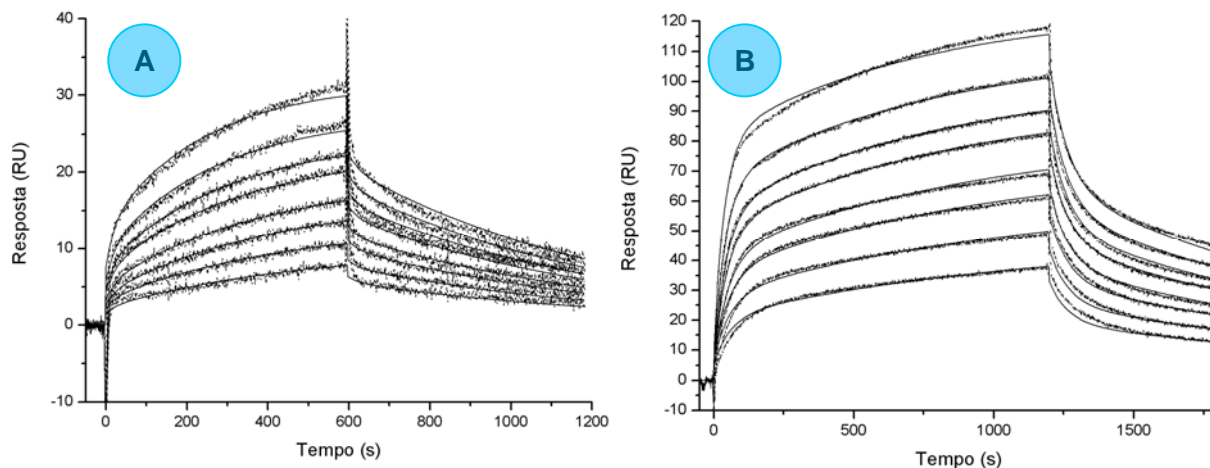


Figura 4.20 - Interação do complexo TR β -T3 com os peptídeos contendo o motivo consenso LXXLL. Concentrações de 56, 80, 112, 140, 186, 224, 280 e 373 nM de TR β foram incubadas com 10 μ M de T3. O ajuste dos dados cinéticos pelo modelo de mudança conformacional também está apresentado. (A) DAX1-3 (B) SRC2-2.

Tabela 4.9 - Constantes de dissociação aparente e as taxas de associação e dissociação entre os peptídeos derivados de SRC2-2 e DAX-1 e o complexo TR β -T3.

	SRC2-2	DAX1-3
K_D (nM)	160	166
$k_1 \times 10^4$ ($M^{-1} S^{-1}$)	$3,15 \pm 0,02$	$2,75 \pm 0,09$
$k_{-1} \times 10^{-2}$ (S^{-1})	$1,38 \pm 0,01$	$3,04 \pm 0,15$
$k_2 \times 10^{-3}$ (S^{-1})	$1,36 \pm 0,01$	$11,9 \pm 0,03$
$k_{-2} \times 10^{-4}$ (S^{-1})	$7,80 \pm 0,04$	$21,1 \pm 0,25$

Os valores de K_D obtidos podem ser comparados aos descritos na literatura. Para a interação entre TR β -LBD e SRC2-2 o K_D reportado é de 170 nM^{122,123}, em concordância os resultados obtidos. Já para DAX1-3, o valor de K_D se encontra entre 0,7 μ M e 10 μ M¹¹². Essas medidas foram obtidas pela técnica de polarização de fluorescência. As diferenças entre os resultados aqui apresentados e os da literatura podem ser atribuídas a diferenças no

tamanho das seqüências de peptídeos utilizadas, na temperatura ou em outras condições experimentais.

O modelo de mudança conformacional determina as quatro taxas cinéticas descritas na Equação 1 e apresentadas na Tabela 4.9. A simulação das curvas referentes às espécies TR β -T3-Coativador* e TR β -T3-Coativador que compõem a resposta de SPR observada são apresentadas na Figura 4.21.

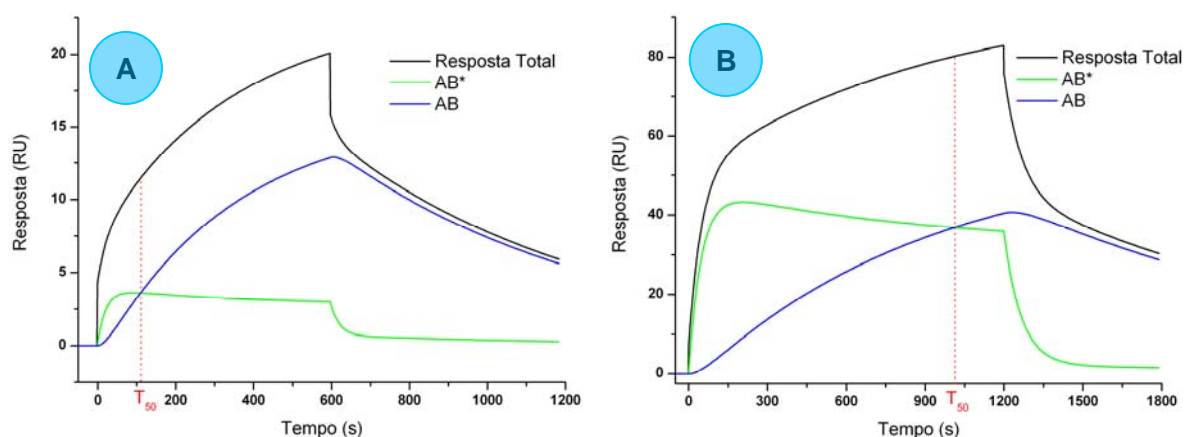


Figura 4.21 - Simulação dos componentes da resposta de SPR observada para os dados ajustados na concentração de 186 nM mostrados na **Figura 4.20**. A simulação foi realizada utilizando as taxas cinéticas obtidas pelo modelo de mudança conformacional [Equação 1]. A resposta total corresponde aos dados ajustados pelo modelo, AB* e AB representam o complexo de encontro e o complexo após a mudança conformacional, respectivamente. **(A)** DAX-1. **(B)** SRC2-2. T_{50} para DAX-1 = 110 s e T_{50} para SRC2-2 = 1010 s. As simulações foram realizadas utilizando o programa BIAevaluation 4.1.

Há referências na literatura a respeito da aplicação do modelo de mudança conformacional para o tratamento de dados de SPR relativos à interação de outros receptores nucleares e peptídeos derivados de seus coativadores, incluindo o receptor de andrógenos¹²⁴ e ambas isoformas do receptor de estrógenos com peptídeos derivados do coativador SRC2-2¹²⁵⁻¹²⁸. Em termos estruturais, esses resultados podem ser decorrentes de uma mudança na conformação do peptídeo ao interagir com a superfície de interação com os coativadores (AF-2), possivelmente adotando uma forma helicoidal, uma vez que estruturas obtidas por difração de raios-x do complexo TR β -T3/SRC2-2 mostram o peptídeo em

conformação de hélice¹⁶. Contudo, a mudança conformacional também pode ocorrer também no LBD do TR β durante sua interação com o peptídeo.

4.3.7.9 Análise de van't Hoff

Visando determinar os parâmetros termodinâmicos da interação entre o complexo TR β -T3 com o peptídeo derivado de DAX-1, a constante de dissociação no equilíbrio foi medida em quatro temperaturas diferentes, 5,5, 10, 15 e 20 °C. Assumindo que a mudança de entalpia (ΔH) e a mudança de entropia (ΔS) não variam com a temperatura¹²⁹, esses parâmetros foram obtidos pelo gráfico de $\ln(K_D)$ em função de $1/T$ utilizando a forma não-integrada da equação de van't Hoff como mostra a Equação 3:

$$\ln K_D = \Delta H_{\text{van't Hoff}}/RT - \Delta S/R \quad [3]$$

Onde R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal/mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta, expressa em Kelvin.

Os valores de K_D foram determinados pela razão das taxas cinéticas descritas pela Equação 2, em quatro temperaturas diferentes ou pelo modelo 1:1 de Langmuir, e foram representados graficamente em função do recíproco da temperatura utilizando a Equação 3, como mostra a Figura 4.22.

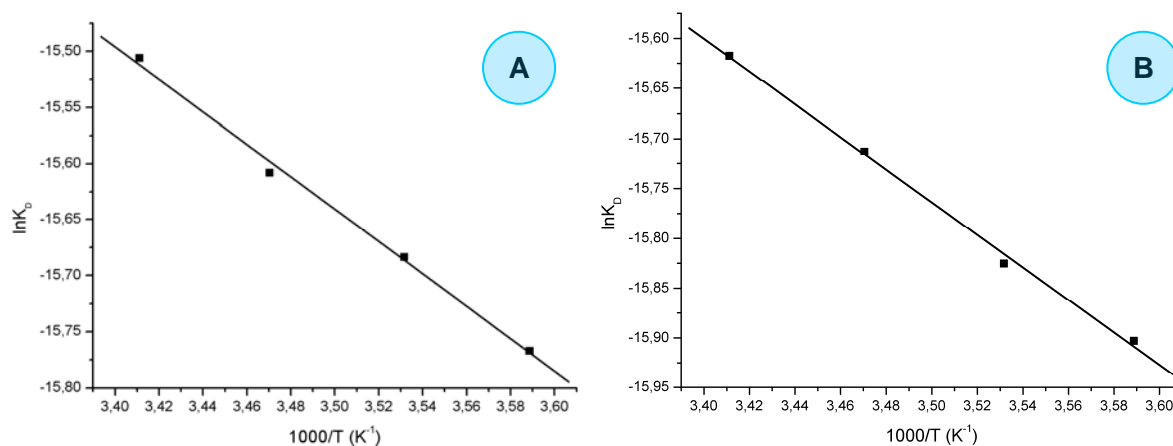


Figura 4.22 - Análise de van't Hoff da interação entre TR β -T3 e DAX1-3. **(A)** Pelo ajuste linear do K_D obtido por SPR com o modelo de dois estados em 4 temperaturas diferentes obteve-se $\Delta H = -2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S = 5,3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, e um coeficiente de correlação de 0,996. **(B)** Os valores de K_D obtidos pelo ajuste dos mesmos dados cinéticos ao modelo 1:1 de Langmuir foram representados graficamente em função da temperatura gerando $\Delta H = -2,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S = 5,0 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, e um coeficiente de correlação de 0,997.

A análise de van't Hoff para as interações do TR β -T3 com SRC2-2 foram limitadas pelo tempo de equilíbrio extremamente longo do complexo (Figuras 4.17 e 4.20) e não puderam ser executadas.

Os resultados mostram que o K_D para essa interação apresenta pouca variação com a temperatura, e indicam que as contribuições entálpica e entrópica são favoráveis para a interação entre TR β -T3 e DAX1-3.

4.3.8 Discussão

A tecnologia de ressonância plasmônica de superfície tem sido amplamente utilizada para caracterizar interações de NRs com seus coativadores, e muitas dessas interações tem suas cinéticas descritas pelo o modelo de mudança conformacional¹²⁴⁻¹²⁸.

Diversas linhas de evidência indicam que o reconhecimento molecular de peptídeos coativadores pelo TR β envolve um lento ajuste conformacional do complexo, dando origem a mudanças graduais na cinética de interação e respostas máximas de SPR. A variação do

tempo de dissociação dos complexos TR β -peptídeos coativadores em função dos tempos de associação ou incubação sugere a ocorrência de uma mudança conformacional na interação entre essas duas espécies (Figura 4.12).

A flexibilidade do LBD de TR β é bem conhecida, e pode ser observada em diversas estruturas obtidas por difração de raios-X, nas quais o sítio de ligação apresenta ajustes conformacionais consideráveis para acomodar ligantes diferentes. Esses ajustes foram observados não apenas para as cadeias laterais de aminoácidos^{68,74}, mas também na posição relativa das hélices 3 e 11⁷³, apesar de que em todos os co-cristais com agonistas a hélice 12 (H12) adota uma posição similar sobre a parte inferior das hélices 3 e 5, participando na formação da superfície de reconhecimento e ligação de coativadores (AF-2). Peculiarmente, nessas estruturas o ligante agonista não interage diretamente com a H12. Ao invés disso, o grupo hidroxila do anel distal forma uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo His435, induzindo uma mudança conformacional na H12 que permite à cadeia lateral do resíduo Phe459 realizar interações complementares com His435, estabilizando sua posição e formando a AF-2, como mostra a Figura 4.23. A interação entre His435 e o resíduo da H12 Phe459 (Figura 4.23a) é observada em todas as estruturas de TR β com agonistas, e foi denominada *His-Phe switch*⁹⁷.

O posicionamento correto da H12 (Figura 4.23b) é de absoluta importância para a função do TR, já que os resíduos Leu454 e Val458 presentes nessa hélice estão envolvidos na formação do sulco hidrofóbico em AF-2, ao passo que o Glu457 é parte do chamado grampo carregado (do inglês, *charge clamp*) juntamente com a Lys288, estabelecendo fortes interações polares com a cadeia principal do coativador^{16,124}.

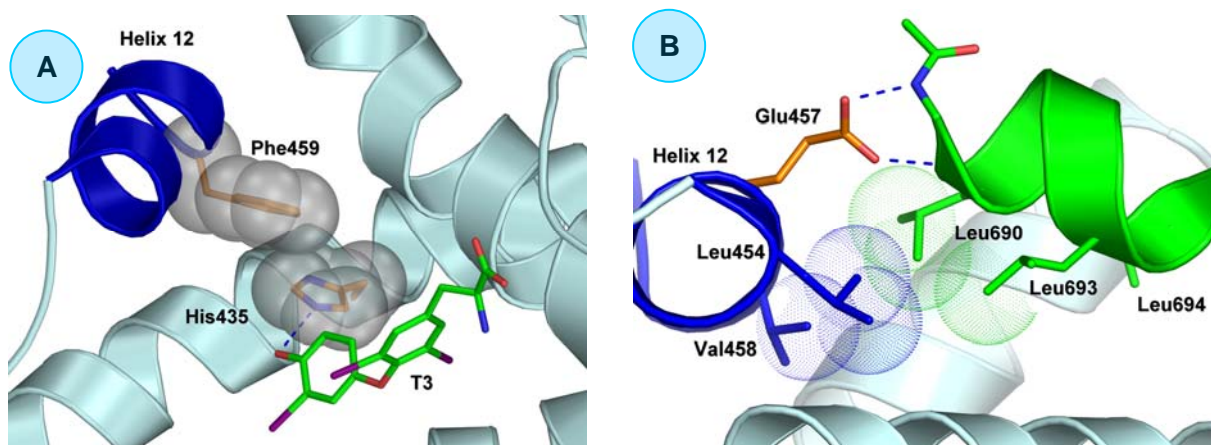


Figura 4.23 - Interações entre TR β e SRC2-2 induzidas pelo hormônio T3. **(A)** O His-Phe *switch* do TR β . Ao se ligar T3 forma uma ligação de hidrogênio com His435, o que estabiliza uma interação favorável com o resíduo Phe459 da hélice 12, estabilizando sua posição e formando AF-2. A hélice 12 está colorida em azul, os resíduos envolvidos no His-Phe *switch* estão coloridos de laranja e o hormônio T3 está colorido de verde. **(B)** Resíduos da hélice 12 que interagem com SRC2-2. Os resíduos Leu454 e Val458 interagem com a Leu690, que é a primeira Leucina do motivo LXXLL presente em SRC2-2, enquanto o resíduo da hélice 12 que faz parte do grampo carregado, Glu457, interage com duas amidas na cadeia principal de SRC2-2. A hélice 12 está colorida em azul, seu resíduo envolvido no grampo carregado, Glu457, está colorido de laranja, o peptídeo SRC2-2 está colorido em verde e os resíduos de Leucina de seu motivo LXXLL estão rotulados. PDB id: 1BSX.

Darimont e colaboradores mostraram que a interação entre TR β e SRC2-2 é fortemente dependente da presença do hormônio¹⁶, o que é corroborado pelos resultados aqui apresentados. A H12 é relativamente móvel³³, e os resultados dos experimentos utilizando TR β apo (sem ligante, Figuras 4.7 e 4.8), ou com o antagonista NH-3 (Figura 4.19) sugerem que ela não forma a superfície de ligação de coativadores (AF-2) na ausência de um ligante agonista.

Os experimentos de variação no tempo de incubação e variação na concentração do hormônio apresentam mais evidências da mobilidade da H12. A resposta de SPR apresenta uma dependência no tempo de incubação entre o receptor e o hormônio, (Figura 4.17), e apenas após 2,5 horas e 4 horas a resposta máxima é alcançada para DAX1-3 e SRC2-2, respectivamente. Esses dados sugerem que um tempo relativamente longo é necessário para o complexo TR β -T3 adotar sua conformação de maior afinidade por peptídeos contendo o motivo LXXLL. Além disso, ao invés de assumir que o TR β estaria saturado por uma

concentração do hormônio muito acima de seu K_D , entre 81 pM¹²² e 112 pM²⁷, foram planejados experimentos para verificar quais concentrações do hormônio geram respostas máximas. Inesperadamente, concentrações dez mil vezes maiores que o K_D apresentado na literatura não propiciaram a resposta máxima, que foram alcançadas apenas em concentrações de 8 μ M ou maiores para ambos DAX1-3 e SRC2-2 (Figura 4.18).

Diversas estruturas cristalográficas de LBDs de receptores nucleares revelam um segundo sítio de ligação para os ligantes na superfície dos LBDs^{73,130,131}. No caso do receptor de androgênios (AR), o segundo sítio de ligação tem sido utilizado no desenvolvimento de ligantes capazes de interferir com as respostas funcionais e o recrutamento de coativadores¹³¹. Curiosamente, dois dos ligantes que reconhecem e se ligam ao AR são os hormônios da tireóide T3 e TRIAC¹³¹. Além disso, a estrutura do TR β co-cristalizado com o ligante sintético GC-24 revela um segundo sítio de ligação para o ligante na superfície da proteína⁷³. Uma possibilidade é que a resposta máxima de SPR na presença de altas concentrações de T3 pode estar relacionada à presença de um segundo sítio de ligação para esse ligante no LBD. A ligação do T3 a esse segundo sítio pode ser responsável pelo aumento da afinidade do TR-T3 pelo coativador. Os resultados aqui apresentados, especialmente a dependência do tempo de incubação e da concentração do ligante, são relevantes e devem ser considerados no planejamento de futuros experimentos utilizando o LBD de TR β e agonistas.

Foi demonstrado que, na presença de T3, concentrações relativamente baixas (2 μ M) de uma construção contendo o DBD e o LBD de TR β (TR β DBD-LBD) existem na forma de monômeros¹³², contudo as constantes de equilíbrio para a dimerização do TR β -LBD na presença ou ausência de ligantes agonistas não estão descritas na literatura. Apesar de as maiores concentrações utilizadas em nossas medidas serem mais de 5 vezes menores que as concentrações de TR β DBD-LBD nas quais a proteína existe como monômeros (2 μ M), tornando improvável a formação de dímeros, baixas quantidades dos peptídeos foram

imobilizadas na superfície dos chips, para minimizar a possibilidade de um dímero se ligar simultaneamente a dois peptídeos imobilizados.

O K_D obtido pelo ajuste global dos dados cinéticos da interação entre o TR β -T3 e SRC2-2 pelo modelo de mudança conformacional, 160 nM (Figura 4.20 e Tabela 4.9), está de acordo com valores previamente reportados¹²², obtidos por polarização de fluorescência. Ajustar os mesmos dados ao modelo 1:1 de Langmuir compromete severamente o ajuste, acarretando um aumento de mais de 10 vezes no χ^2 e causando o aparecimento de tendências sistemáticas nos gráficos residuais. Esses resultados, junto com o resultado do experimento de variação do tempo de associação e as evidências experimentais baseadas na biologia do sistema TR β -T3/SRC2-2 apresentadas nessa seção, sugerem que o modelo de mudança conformacional é mais apropriado para descrever a interação entre o complexo TR β -T3 e SRC2-2 que o modelo 1:1 de Langmuir. Além disso, esses resultados podem ser diretamente comparados com os dados apresentados na literatura para outros NR que foram ajustados pelo modelo de dois estados, incluindo o receptor de andrógenos¹²⁴ e ambas isoformas do receptor de estrógenos com peptídeos derivados de coativadores SRC¹²⁵⁻¹²⁸. Uma vez que o presente estudo foi realizado utilizando peptídeos derivados do coativador e o LBD do TR β , novos estudos são necessários para verificar o modelo mais apropriado para descrever a cinética dessas proteínas inteiras.

Estruturalmente essa mudança conformacional pode corresponder a uma alteração na estrutura do peptídeo imobilizado, pois a estrutura cristalográfica do complexo TR β -T3/SRC2-2 mostra o peptídeo na conformação de alfa hélice e o espectro de UV-CD do peptídeo SRC2-2 indica uma conformação de *random coil*¹⁶. Assim, a formação da α -hélice parece ser induzida pelo contato com AF-2, o que está de acordo com o modelo de mudança conformacional utilizado para ajustar os dados cinéticos. Apesar de uma comparação entre diversas estruturas cristalográficas de TR β -T3^{74,133} e a estrutura do complexo TR β -T3/SRC2-

2¹⁶ não apontar para diferenças dramáticas em TRβ-T3 na presença ou ausência de SRC2-2 nas estruturas estáticas obtidas por difração de raios-X, ainda existe a possibilidade de que o encaixe induzido ocorra na AF-2.

De acordo com dados previamente reportados¹¹², as constantes de equilíbrio aparente obtidas com o modelo de dois estados para a interação entre o TRβ-T3 e os peptídeos derivados de SRC2-2 e DAX1-3 são similares, no entanto uma inspeção mais detalhada das taxas de associação e dissociação para essas interações revela diferenças sutis, que são notadas na simulação gráfica das curvas dos componentes da resposta de SPR. O T₅₀ para a interação entre o complexo TRβ-T3 e SRC2-2 é mais de 9 vezes maior que o T₅₀ para a interação com DAX1-3, indicando que o complexo TRβ-T3/SRC2-2 requer 9 vezes mais tempo para adotar sua forma mais estável que o complexo com DAX1-3. Já que o tempo de incubação para a obtenção da resposta máxima é diferente para DAX1-3 e SRC2-2, esses dois peptídeos devem reconhecer e se ligar ao complexo TRβ-T3 de uma forma ligeiramente diferente, sugerindo inclusive o envolvimento de outros resíduos que não os do motivo LXXLL.

A análise termodinâmica de van't Hoff indica que as interações entre TRβ-T3 e DAX1-3 são ocasionadas por mudanças de entalpia e entropia favoráveis, que contribuem para o ΔG com mesma ordem de magnitude, uma característica de interações complexas. Dessa forma, interações como as do grampo carregado (Figura 4.23) e aspectos conformacionais do peptídeo ou do LBD do TRβ aparentemente desempenham um papel importante nessa interação. Os efeitos de solvatação também podem contribuir de forma importante para a interação, apesar de nenhuma estrutura cristalográfica do LBD de TRβ em complexo com o T3 apresentar moléculas de água na região de interação com o coativador. Os tempos de estabilização muito longos impediram uma análise similar para o complexo TRβ-T3/SRC2-2.

Finalmente, quando incubado com outros agonistas, o TR β -LBD produziu uma menor resposta de SPR, mas apresentou um comportamento similar ao do complexo TR β -T3 (Figura 4.19). A ordem das respostas foi T3 > GC-1 > Triac > T4, similar às obtidas em ensaios celulares com genes repórteres^{74,134}, o que sustenta ainda mais o uso dessa metodologia como uma ferramenta de triagem para novos ligantes. A resposta do TR β incubado com o antagonista NH-3 foi claramente muito menor que a de todos os agonistas (Figura 4.19), sugerindo que essa metodologia pode ser utilizada na triagem de novos ligantes para o TR β e também para discernir entre agonistas e antagonistas. Além disso, tendo em vista os desafios em se desenvolver agonistas ou antagonistas seletivos para o sítio de ligação dos NR, muitos esforços foram direcionados para o desenvolvimento de antagonistas de NR que inibem diretamente a associação do receptor com seus coativadores^{122,131,135}. A metodologia que apresentamos aqui pode ser útil para avaliar a atividade desses ligantes.

Capítulo 5



Conclusões e Perspectivas

Nesse capítulo são apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

*“There's no question that we are organic machines...
If we think of a machine as any physical system capable of performing certain functions, then
of course the brain is a machine. And we are, or our bodies are biological machines.
That doesn't show that we don't have free will. Because the peculiarity of these machines is that
they are conscious machines...”*

*“What we're really talking about is a concept in psychology called spontaneity.
To be able to go with the moment...
To stay with what is, rather than trying to control that which might be...
If we could be with what is we wouldn't need necessarily to attempt so much control over
what might be in the future...”*

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 Conclusões e Perspectivas

Nesta tese de doutorado foram apresentados os resultados obtidos no decorrer de cinco anos de trabalho. Várias abordagens computacionais e experimentais foram empregadas para a obtenção de informações relevantes a respeito dos receptores dos hormônios da tireóide e alguns de seus ligantes.

Entre as abordagens computacionais, o estudo de HQSAR propiciou a obtenção de modelos com bom poder de correlação e predição, e a análise dos mapas individuais de contribuição sugeriu que substituintes mais rígidos na posição 1 do T3 (Figura 5.1) podem resultar em uma maior seletividade para o TR β . De forma similar, os mapas indicaram que diferentes substituintes nas posições 3 e 5 poderiam apresentar um papel na seletividade. Além disso, a substituição dos átomos de iodo eliminaria a potencial rota de desativação metabólica pela desiodação.

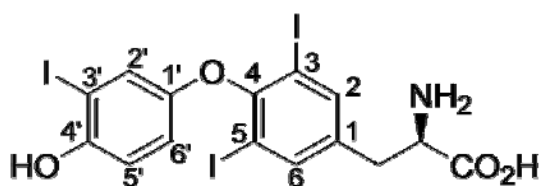


Figura 5.1 - T3, o principal hormônio da tireóide.

O procedimento de ensaio virtual tornou necessário o desenvolvimento de ferramentas computacionais para a manipulação, tratamento e filtragem de bases de dados de compostos em diversos formatos, e culminou na seleção dos compostos mais promissores para aquisição e avaliação de sua atividade biológica. Usualmente estudos de triagem virtual avaliam a atividade biológica de dezenas ou centenas de compostos^{104,106}, contudo, devido a restrições

orçamentárias, foram adquiridos apenas sete compostos da empresa *Maybridge*.

Ensaio celulares foram desenvolvidos e validados para tornar possível a determinação das atividades biológicas dos compostos selecionados pelo procedimento de triagem virtual. O resultado dos ensaios de transfecção e gene repórter, capazes de avaliar a atividade agonista ou antagonista de compostos para os TRs, indica que a maioria dos compostos não apresenta atividade biológica, e sugere que dois deles apresentam uma atividade inespecífica. Nos ensaios celulares diversas variáveis, como a solubilidade do composto no meio de cultura, sua permeabilidade na membrana celular e interação com outras macromoléculas presentes nas células podem tornar difícil o planejamento dos experimentos e a análise dos resultados.

Para superar essas dificuldades, foi desenvolvida uma metodologia inédita para a determinação da atividade agonista de ligantes dos receptores dos hormônios da tireóide utilizando a técnica de ressonância plasmônica de superfície, que propicia medidas diretas em tempo real, dispensa marcadores, requer baixa quantidade de amostras e permite a caracterização cinética completa.

Utilizando essa metodologia, que foi validada com o emprego de 4 agonistas conhecidos e bem caracterizados para os TRs, e o antagonista NH-3, verificou-se que os compostos selecionados para aquisição não apresentam atividade agonista. Esse resultado pode ser um reflexo do número reduzido de compostos adquiridos da empresa *Maybridge*.

A técnica de SPR também foi empregada em um cuidadoso estudo da interação do TR β com seus coativadores, que incluiu estudos cinéticos e termodinâmicos, tornando possível a determinação das taxas cinéticas e parâmetros termodinâmicos para a interação do complexo TR β -T3 com peptídeos derivados de seus coativadores SRC2-2 e DAX1-3. Os resultados sugerem que a flexibilidade do TR β desempenha um papel importante na interação com seus coativadores, e indicam que parâmetros experimentais, como a dependência do

tempo de incubação e da concentração do ligante, são relevantes e devem ser considerados no planejamento de futuros experimentos utilizando o LBD de TR β e agonistas.

O presente estudo foi realizado utilizando peptídeos derivados do coativador e o LBD do TR β , e outros estudos são necessários para verificar o comportamento dessas proteínas inteiras. Os mecanismos responsáveis pelos resultados dos ensaios de variação do tempo de incubação e da concentração do ligante devem ser investigados. Estudos de co-cristalização do receptor com diferentes ligantes e os peptídeos derivados dos coativadores podem ajudar a verificar a hipótese de um segundo sítio para o T3 na superfície do LBD do TR β .

Referências

Nesse capítulo são apresentadas as referencias citadas nesse trabalho.

*“I've just been dreaming this life, and when I finally wake up, I'll be somebody else.
Somebody totally different!”*

“...taking the audience on a Jungian journey into the collective unconscious, using the shadow as a metaphor for the primal self that gets repressed by the modern persona and also by using an underground setting and labyrinth office design to represent both the depths of the psyche and the dungeon-like isolation of our increasingly mechanistic society which prevents people from finding satisfying work or meaningful connections with others.”

“Good evening brothers and sisters... vibrations of the mind of the one true God whose name is LOVE.”

6 REFERÊNCIAS

- 1 DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B.; LIN, H. Y. Promotion by thyroid hormone of cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptors. *Steroids*, v. 73, n. 9-10, p. 1013-17, 2008.
- 2 GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J-K; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature*, v. 3, n. 11, p. 950-965, 2004.
- 3 CHAWLA, A. et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1866-70, 2001.
- 4 BAIN, D.L. et al. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 69, p. 201-20, 2007.
- 5 RAGHURAM, R. et al. Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat. Struct. Biol.*, v. 14, n. 12, p. 1207-13, 2007.
- 6 GUREVICH, I.; FLORES, A. M.; ANESKIEVICH, B. J. Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 223, n. 3, p. 288-98, 2007.
- 7 BOURGUET, W. et al. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature*, v. 375, n. 6530, p. 377-82, 1995.
- 8 LI, Y.; LAMBERT, M. H.; XU, H.E. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure*, v. 11, n. 7, p. 741-6, 2003.
- 9 XU, J.; O'MALLEY, B. W. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, v. 3, n. 3, p. 185-92, 2002.
- 10 XU, J.; LI, Q. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol. Endocrinol.*, v. 17, n. 9, p. 1681-92, 2003.
- 11 RASTINEJAD, F. et al. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, v. 375, n. 6528, p. 203-11, 1995.
- 12 LEFSTIN, J. A.; YAMAMOTO, K. R. Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature*, v. 392, n. 6679, p. 885-8, 1998.
- 13 LEE, Y. K. et al. Phosphorylation of the hinge domain of the nuclear hormone receptor LRH-1 stimulates transactivation. *J. Biol. Chem.*, v. 281, n.12, p. 7850-5, 2006.
- 14 LIN, H. Y. et al. Acetylation of nuclear hormone receptor superfamily members: thyroid hormone causes acetylation of its own receptor by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Steroids*, v. 70, n. 5-7, p. 444-9, 2005.
- 15 ROCHETTE-EGLY, C. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways

- through phosphorylation. *Cell. Signal.*, v. 15, n. 4, p. 355-66, 2003.
- 16 DARIMONT, B. D. et al. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.*, v. 12, n. 21, p. 3343-56, 1998.
- 17 NOLTE, R.T. et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, v. 395, n. 6698, p. 137-43, 1998.
- 18 MORAS, D.; GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v. 10, n. 3, p. 384-91, 1998.
- 19 SHIAU, A. K. et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, v. 95, n. 7, p. 927-37, 1998.
- 20 BURGIO, G. et al. Genetic identification of a network of factors that functionally interact with the nucleosome remodeling ATPase ISWI. *PLoS Genet.*, v. 4, n. 6, e1000089, 2008.
- 21 PERISSI, V.; ROSENFELD, M. G. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, v. 6, n. 7, p. 542-54, 2005.
- 22 HIROI, Y. et al. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 103, n. 38, p. 14104-9, 2006.
- 23 SHUPNIK, M. A.; RIDGWAY, E. C.; CHIN, W. W. Molecular biology of thyrotropin. *Endocr. Rev.*, v. 10, n. 4, p. 459-75. 1989.
- 24 KRONENBERG, H. M. et al. *William's textbook of endocrinology*. 11 ed., Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2008.
- 25 BRENTA, G.; DANZI, S.; KLEIN, I. Potential therapeutic applications of thyroid hormone analogs. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, v. 3, n. 9, p. 632-40, 2007.
- 26 SAP, J. et al. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, v. 324, n. 6098, p. 635-40, 1986.
- 27 YE, L. et al. Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor beta1. *J. Med. Chem.*, v. 46, n. 9, p. 1580-8, 2003.
- 28 LAZAR, M. A.; HODIN, R. A.; CHIN, W. W. Human carboxyl-terminal variant of alpha-type c-erbA inhibits trans-activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, n. 20, p. 7771-4, 1989.
- 29 YEN, P. M. et al. Isoform-specific thyroid hormone receptor antibodies detect multiple thyroid hormone receptors in rat and human pituitaries. *Endocrinology*, v. 130, n. 3, p. 1539-46, 1992.
- 30 BRADLEY, D. J.; TOWLE, H. C.; YOUNG, W. S. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the

- developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.*, v. 12, n. 6, p. 2288-302, 1992.
- 31 UNDERWOOD, A. H. A thyromimetic that decreases plasma cholesterol levels without increasing cardiac activity. *Nature*, v. 324, n. 6096, p. 425-9, 1986.
- 32 GROVER G. J. et al. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, n. 17, p. 10067-72, 2003.
- 33 WEBB, P. et al. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 83, n. 1-5, p. 59-73, 2003.
- 34 BUSNARDO, B. et al. Acute and chronic effects of dextro-thyroxine on pituitary thyroid axis and on reverse triiodothyronine production in euthyroid subjects. *J. Endocrinol. Invest.*, v. 10, n. 1, p. 73-7, 1987.
- 35 KUNITAKE, J. M. et al. 3,5,3'-triiodothyroacetic acid therapy for thyroid hormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 69, n. 2, p. 461-6, 1989.
- 36 YEN, P. M. et al. Studies on the repression of basal transcription (silencing) by artificial and natural human thyroid hormone receptor-beta mutants. *Endocrinology*, v. 136, n. 7, p. 2845-51, 1995.
- 37 HSU, J. H., BRENT, G. A. Thyroid hormone receptor gene knockouts. *Trends Endocrinol. Metab.*, v. 9, n. 3, p. 103-12, 1998.
- 38 WIKSTRÖM, L. et al. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J.*, v. 17, n. 2, p. 455-61, 1998.
- 39 TROST, S. U. et al. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*, v. 141, n. 9, p. 3057-64, 2000.
- 40 WEISS, R. E. et al. Thyroid function and effect of aging in combined hetero/homozygous mice deficient in thyroid hormone receptors alpha and beta genes. *J. Endocrinol.*, v. 172, n. 1, p. 177-85, 2002.
- 41 CHIPELLINI, G. et al. Synthesis and biological activity of novel thyroid hormone analogues: 5'-aryl substituted GC-1 derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 10, n. 2, p. 333-46, 2002.
- 42 BRYZGALOVA, G. et al. Anti-obesity, anti-diabetic, and lipid lowering effects of the thyroid receptor beta subtype selective agonist KB-141. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 111, n. 3-5, p. 262-7, 2008.
- 43 BAXTER, J. D. et al. Structure-based design and synthesis of a thyroid hormone receptor (TR) antagonist. *Endocrinology*, v. 143, n. 2, p. 517-524, 2002.
- 44 YOSHIHARA, H. A. et al. A designed antagonist of the thyroid hormone receptor.

- Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 11, n. 21, p. 2821-25, 2001.
- 45 RIBEIRO, R. C. et al. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 65, n. 1-6, p. 133-41, 1998.
- 46 WAGNER, R. L. et al. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.*, v. 15, n. 3, p. 398-410, 2001.
- 47 BAXTER, J. D. et al. Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 76, n. 1-5, p. 31-42, 2001.
- 48 KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 3, n. 11, p. 935-49, 2004.
- 49 LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. 3rd. The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 3, n. 10, p. 853-62, 2004.
- 50 WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. London: Academic Press, 2003.
- 51 BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
- 52 SALUM, L. B. *Estudos in silico no planejamento de candidatos a novos fármacos na terapia do câncer de mama e de reposição hormonal*. 2007. 140 p. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- 53 BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, v. 28, n. 1, p. 235-42, 2000.
- 54 BERMAN, H. M. et al. The protein data bank and the challenge of structural genomics. *Nat. Struct. Biol.*, v. 7, n. 11, p. 957-59, 2000.
- 55 WESTBROOK, J. et al. The Protein Data Bank and structural genomics. *Nucleic Acids Res.*, v. 31, n. 1, p. 489-91, 2003.
- 56 DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; KLEYWEGT, G. J. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 42, n. 24, p. 2718-36, 2003.
- 57 GUIDO, R. V. C. *Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi: biologia estrutural e química medicinal*. 2008. 302 p. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- 58 LEMKE, T. L. et al. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- 59 AVERY, M. A. et al. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin.

6. The development of predictive in vitro potency models using CoMFA and HQSAR methodologies. *J. Med. Chem.*, v. 45, n. 2, p. 292-303, 2002.
- 60 KUBINYI, H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches*. New York: VCH, 1993.
- 61 HANSCH, C.; LEO, A. *Exploring QSAR: Fundamentals and applications in chemistry and biology*. Washington: American Chemical Society, 1995.
- 62 LOWIS, D. R. *HQSAR: a new, highly predictive QSAR technique*. Tripos Technical Notes, v. 1, n. 5, p. 1-10, 1997.
- 63 SEEL, M.; TURNER, D. B.; WILLETT, P. Effect of parameter variations on the effectiveness of HQSAR analyses. *QSAR*, v. 18, n. 3, p. 245-25, 1999.
- 64 KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, v. 161, n. 2, p. 269-88, 1982.
- 65 ZOU, X.; SUN, Y.; KUNTZ, I. D. Inclusion of solvation in ligand binding free energy calculations using the generalized-Born model. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 121, n. 35, p. 8033-43, 1999.
- 66 WANG, R.; GAO, Y.; LAI, L. Calculating partition coefficient by atom-additive method. *Perspect. Drug Discovery Des.*, v. 19, n. 1, p. 47-66, 2000.
- 67 HONORIO, K. M.; GARRATT, R. C.; ANDRICOPULO, A. D. Hologram quantitative structure-activity relationships for a series of farnesoid X receptor activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 15, n. 12, p. 3119-25, 2005.
- 68 HANGELAND, J. J. et al. Thyroid receptor ligands. Part 2: Thyromimetics with improved selectivity for the thyroid hormone receptor beta. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 14, n. 13, p. 3549-53, 2004.
- 69 HEDFORS, A. et al. Thyroid receptor ligands. 3. Design and synthesis of 3,5-dihalo-4-alkoxyphenylalkanoic acids as indirect antagonists of the thyroid hormone receptor. *J. Med. Chem.*, v. 48, n. 9, p. 3114-7, 2005.
- 70 LI, Y. L., et al. Thyroid receptor ligands. Part 4: 4'-amido bioisosteric ligands selective for the thyroid hormone receptor beta. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 16, n. 4, p. 884-6, 2006.
- 71 GARCIA COLLAZO, A. M. et al. Thyroid receptor ligands. Part 5: novel bicyclic agonist ligands selective for the thyroid hormone receptor beta. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 16, n. 5, p. 1240-4, 2006.
- 72 VALADARES, N. F. et al. 2D QSAR studies on thyroid hormone receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 15, n. 13, 4609-17, 2007.
- 73 BORNGRAEBER, S. et al. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, n. 26, p. 15358-63, 2003.

-
- 74 SANDLER, B. et al. Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 53, p. 55801-8, 2004.
- 75 CHEN, D. et al. Holographic QSAR of selected esters. *Chemosphere*, v. 57, n. 11, p. 1739-45, 2004.
- 76 KOEHLER, K. et al. Thyroid receptor ligands 6. A high affinity "direct antagonist" selective for the thyroid hormone receptor. *J. Med. Chem.*, v. 49, n. 23, p. 6635-7, 2006.
- 77 KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov. Today*, v. 11, n. 13-14, p. 580-94, 2006.
- 78 LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov. Today*, v. 7, n. 20, p. 1047-55, 2002.
- 79 DALBY, A. et al. Description of several chemical structure file formats used by computer programs developed at molecular design limited. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 32, n. 3, p. 244-55, 1992.
- 80 JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.*, v. 267, n. 3, p. 727-48, 1997.
- 81 JONES, G.; WILLET, P.; GLEN, R. C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, v. 9, n. 6, p. 532-49, 1995.
- 82 VERDONK, M. L. et al. Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins*, v. 52, n. 4, p. 609-23, 2003.
- 83 MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, v. 19, n. 14, p. 1639-62, 1998.
- 84 RAREY, M. et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.*, v. 261, n. 3, p. 470-89, 1996.
- 85 KRAMER, B.; RAREY, M.; LENGAUER T. Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins*, v. 37, n. 2, p. 228-41, 1999.
- 86 IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 45, n. 1, p. 177-82, 2005.
- 87 TEAGUE, S. J. et al. The Design of leadlike combinatorial libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 38, n. 24, p. 3743-48, 1999.
- 88 WALTERS, W. P.; MURCKO, M. A. Prediction of 'drug-likeness'. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54, n. 3, p. 255-71, 2002.
- 89 LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.

- 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.
- 90 MUEGGE, I. et al. Evaluation of PMF scoring in docking weak ligands to the FK506 binding protein. *J. Med. Chem.*, v. 42, n. 14, p. 2498-503, 1999.
- 91 PEGG, S. C. H.; HARESCO, J. J.; KUNTZ, I. D. A genetic algorithm for structure-based de novo design. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, v. 15, n. 10, p. 911-33, 2001.
- 92 PAN, Y. et al. Consideration of molecular weight during compound selection in virtual target-based database screening. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 43, n. 1, p. 267-72, 2003.
- 93 GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb. Chem.*, v. 1, n. 1, p. 55-68, 1999.
- 94 HOOFT, R. W. W. et al. Errors in protein structures. *Nature*, v. 381, n. 6580, p. 272, 1996.
- 95 LASKOWSKI, R. A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR.*, v. 8, n. 4, p. 477-86, 1996.
- 96 VRIEND, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.*, v. 8, n. 1, p. 52-6, 1990.
- 97 HASSAN, A. Q.; KOH, J. T. A functionally orthogonal ligand-receptor pair created by targeting the allosteric mechanism of the thyroid hormone receptor. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 128, n. 27, p. 8868-74, 2006.
- 98 MOITESSIER, N. et al. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *Br. J. Pharmacol.*, v. 153, n. 1, p. S7-26, 2008.
- 99 GOHLKE, H.; HENDLICH, M.; KLEBE, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, v. 295, n. 2, p. 337-56, 2000.
- 100 FEHER, M. Consensus scoring for protein-ligand interactions. *Drug Discov. Today*, v. 11, n. 9-10, p. 421-8, 2006.
- 101 WANG, R.; WANG, S. How does consensus scoring work for virtual library screening? An Idealized Computer Experiment. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 41, n. 5, p. 1422-26, 2001.
- 102 CLARK, R. D. et al. Consensus scoring for ligand/protein interactions. *J. Mol. Graph. Modell.*, v. 20, n. 4, p. 281-295, 2002.
- 103 WANG, R.; LU, Y.; WANG, S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for

- molecular docking. *J. Med. Chem.*, v. 46, n. 12, p. 2287-303, 2003.
- 104 IRWIN, J. J. Community benchmarks for virtual screening. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, v. 22, n. 3-4, p. 193-9, 2008.
- 105 GOLD version 2.1 Documentation, Cambridge: CCDC, 2003.
- 106 SCHAPIRA, M. et al. Discovery of diverse thyroid hormone receptor antagonists by high-throughput docking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, n. 12, p. 7354-9, 2003.
- 107 YOKOYAMA, N. et al. Synthesis and structure-activity relationships of oxamic acid and acetic acid derivatives related to L-thyronine. *J. Med. Chem.*, v. 38, n. 4, p. 695-707, 1995.
- 108 LEESON, P. D. et al. Selective thyromimetics. Cardiac-sparing thyroid hormone analogues containing 3'-arylmethyl substituents. *J. Med. Chem.*, v. 32, n. 2, p. 320-36, 1989.
- 109 BRENT, R.; FINLEY, R. L. Jr. Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annu. Rev. Genet.*, v. 31, p. 663-704, 1997.
- 110 DRENTH, J. *Principles of X-ray crystallography*, Heidelberg: Springer, 1999.
- 111 MCREE, D. E. *Practical protein crystallography*, San Diego: Academic Press, 1999.
- 112 MOORE, M. R. J. et al. Quantitative proteomics of the thyroid hormone receptor-coregulator interactions. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 26, p. 27584-90, 2004.
- 113 ABELES, F. Surface electromagnetic waves ellipsometry. *Surf. Sci.*, v. 56, n. 1, p. 237-51, 1976.
- 114 SALAMON, Z.; MACLEOD, H. A.; TOLLIN, G. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1331, n. 2, p. 117-29, 1997.
- 115 MYSZKA, D. G. et al. Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys. J.*, v. 75, n. 2, p. 583-94, 1998.
- 116 LIPSCHULTZ, C. A.; LI, Y.; SMITH-GILL, S. Experimental design for analysis of complex kinetics using surface plasmon resonance. *Methods*, v. 20, n. 3, p. 310-8, 2000.
- 117 LIPSCHULTZ, C. A., et al. Temperature differentially affects encounter and docking thermodynamics of antibody--antigen association. *J. Mol. Recognit.*, v. 15, n. 1, p. 44-52, 2002.
- 118 CORNISH-BOWDEN, A. Detection of errors of interpretation in experiments in enzyme

- kinetics. *Methods*, v. 24, n. 2, p. 181-90, 2001.
- 119 BIAEVALUATION Software Handbook, Upsala: Biacore AB, 1999.
- 120 LIM, W. et al. A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action in vivo. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 38, p. 35664-70, 2002.
- 121 MYSZKA, D. G. Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.*, v. 12, n. 5, p. 279-84, 1999.
- 122 ARNOLD, L. A. et al. A high-throughput screening method to identify small molecule inhibitors of thyroid hormone receptor coactivator binding. *Sci. STKE*, n. 341, p13, 2006.
- 123 ARNOLD, L. A. et al. Discovery of small molecule inhibitors of the interaction of the thyroid hormone receptor with transcriptional coregulators. *J. Biol. Chem.*, v. 280, n. 52, p. 43048-55, 2005.
- 124 HUR, E. et al. Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *PLoS Biol.*, v. 2, n. 9, p. E274, 2004.
- 125 WÄRNMARK, A. et al. Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 26, p. 23397-404, 2001.
- 126 WÄRNMARK, A, et al. Interaction of transcriptional intermediary factor 2 nuclear receptor box peptides with the coactivator binding site of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 24, p. 21862-8, 2002.
- 127 WONG, C. W.; KOMM, B.; CHESKIS, B.J. Structure-function evaluation of ER alpha and beta interplay with SRC family coactivators. ER selective ligands. *Biochemistry*, v. 40, n. 23, p. 6756-65, 2001.
- 128 ZHAO, C. et al. Mouse estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand selectivity and coactivator recruitment. *Biochemistry*, v. 44, n. 22, p. 7936-44, 2005.
- 129 MYSZKA, D. G. Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. *Methods Enzymol.*, v. 323, p. 325-40, 2000.
- 130 AMBROSIO, A. L. et al. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.*, v. 282, n. 25, p. 18625-33, 2007.
- 131 ESTÉBANEZ-PERPIÑÁ, E. et al. A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 104, n. 41, p. 16074-9, 2007.
- 132 FIGUEIRA, A. C. M. et al., 2006. Human thyroid receptor forms tetramers in solution, which dissociate into dimers upon ligand binding. *Cell Biochem. Biophys.*, v. 44, n. 3,

p. 453-62 2006.

- 133 NASCIMENTO, A. S. et al. Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. *J. Mol. Biol.*, v. 360, n. 3, p. 586-98, 2006.
- 134 NGUYEN, N. H. et al., Rational design and synthesis of a novel thyroid hormone antagonist that blocks coactivator recruitment. *J. Med. Chem.*, v. 45, n. 15, p. 3310-20, 2002.
- 135 ESTÉBANEZ-PERPIÑÁ E. et al. Structural insight into the mode of action of a direct inhibitor of coregulator binding to the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.*, v. 21, n. 12, p. 2919-28, 2007.