

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Busca virtual de agonistas enviesados não peptídicos do receptor de
angiotensina II do tipo 1**

Juliana Gallottini de Magalhães

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Magalhães, Juliana Gallottini de
M188b Busca virtual de agonistas enviesados não peptídicos do
receptor de angiotensina II do tipo 1 / Juliana Gallottini de
Magalhães. -- São Paulo, 2015.
88p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Yagui, Carlota de Oliveira Rangel

1. Modelagem farmacêutica : Química farmacêutica I. T.
II. Yagui, Carlota de Oliveira Rangel, orientador.

615.19 CDD

Juliana Gallottini de Magalhães

Busca virtual de agonistas enfiados não peptídicos do receptor de angiotensina II
do tipo 1

Versão corrigida

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Carlota de Olivera Rangel Yagui
orientador/ presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

Dedico esse trabalho à minha família, pois sem ela este não seria possível, e ao meu namorado que sempre me deu forças nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carlota de Olivera Rangel Yagui e ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini pelas ótimas orientações para o trabalho e para vida.

Ao Dr. Matheus Malta de Sá e ao Dr. Vinicius Gonçalves Maltarollo pelo ensino valioso.

Aos meus colegas de laboratório pelo convívio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Núcleo para Convergência das Ciências da Vida, Física e Engenharia para Inovação em Diagnósticos e Terapias (NAP IDX&T) pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e à Universidade de São Paulo pela oportunidade.

RESUMO

MAGALHÃES, J. G. **Busca virtual de agonistas enviesados não peptídicos do receptor de angiotensina II do tipo 1**. 2014. 88f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os inibidores do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R), fármacos da classe das sartanas, são muito utilizados na terapêutica da insuficiência cardíaca. Apesar de serem eficientes por baixarem a pressão arterial, esses inibidores diminuem a contratilidade do músculo cardíaco, acentuando a patologia. Nesse sentido, os agonistas enviesados para β -arrestina do AT1R surgem como uma solução para esse problema. Estudos com o mais promissor peptídeo com ação agonista enviesada (TRV120027) mostram que ele é capaz de diminuir a pressão arterial sem causar o efeito inotrópico negativo no coração. Tendo em vista esse novo e promissor mecanismo de ação e a característica peptídica do novo agonista enviesado que restringe sua utilização, o presente trabalho visou à busca de ligantes não peptídicos com potencial ação enviesada. Foram realizados estudos de ancoramento seguidos de dinâmica molecular, no AT1R, de sete peptídeos agonistas e agonistas enviesados descritos na literatura, empregando-se os programas Surflex-Dock 2.0 e o GROMACS 4.5, além de análises de campos de interação molecular no programa GRID. Os dados das interações intermoleculares retirados da dinâmica e dos campos de interação guiaram a construção de um farmacóforo que foi utilizado posteriormente em uma busca virtual na base de dados ZINC, com o módulo UNITY 3D do pacote Sybyl-X Suite 2.0. Após ancoramento e análise visual das moléculas selecionadas na busca, foram identificadas 15 moléculas promissoras, sendo cinco delas consideradas de maior interesse. As moléculas selecionadas na busca poderão ser futuramente testadas quanto ao perfil de ação enviesada em receptores AT1R. Os resultados obtidos nesse estudo podem levar à descoberta de um novo protótipo mais eficiente e seguro para o tratamento de doenças cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca.

Palavras-chave: busca virtual, agonista enviesado, modelagem molecular, angiotensina II, AT1R.

ABSTRACT

MAGALHÃES, J. G. **Angiotensin II type 1 receptor non-peptidic biased agonists' virtual screening**. 2014. 88f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Angiotensin II type 1 receptor (AT1R) inhibitors, the sartans, are widely used in the treatment of heart failure. Although they are effective for lowering blood pressure, these inhibitors decrease the contractility of the heart muscle, accentuating the pathology. Accordingly, β -arrestin biased agonists for AT1R emerge as a solution to this problem. Studies with the most promising biased agonist peptide (TRV120027) show that it is able to lower blood pressure without causing negative inotropic effect on the heart. Given this promising new mechanism of action and the peptide feature of the new agonist that restricts its use, this work aims the search for non-peptide ligands with a potential biased action. Docking studies, followed by molecular dynamics simulations, were performed for seven full and biased agonists in the AT1R, using the Surflex-Dock 2.0 and 4.5 GROMACS programs, besides molecular interaction fields analysis with GRID software. The data of intermolecular interactions from the molecular dynamic's analysis and the molecular interaction fields guided to the construction of a pharmacophore model which was subsequently used in a virtual screening from ZINC database, employing the 3D UNITY module from Sybyl-X Suite 2.0 package. After a docking study and visual analysis of the primary selected molecules, 15 promising molecules have been identified, five of them considered of most interest. The molecules selected in the search can be further tested for biased action on AT1R. The results of this study may lead to the discovery of a more efficient and secure lead for the treatment of cardiovascular diseases, such as heart failure.

Keywords: virtual screening, biased agonist, molecular modelling, angiotensin II, AT1R.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AngII	Angiotensina II
AT1R	Receptor de angiotensina II do tipo 1
CADD	“Computer assisted drug design”, Planejamento auxiliado por computador
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 4
DAG	Diacilglicerol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GRKs	Quinases de receptores acoplados à proteína G
IC	Insuficiência cardíaca
IP3	Trifosfato de inositol
LBDD	“Ligand-based drug design”, Planejamento baseado no ligante
LBVS	“Ligand-based virtual screening”, Busca virtual baseada no ligante
MIF	Campo de interação molecular
PKC	Proteína quinase C dependente de cálcio
PLC	Fosfolipase C
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
RMSD	Desvio quadrado médio
RMSF	Média do desvio quadrado médio
SBDD	“Structure-based drug design”, Planejamento baseado na estrutura
SBVS	“Structure-based virtual screening”, Busca virtual baseada na estrutura
SUS	Sistema Único de Saúde
VS	“Virtual screening”, busca virtual

SUMÁRIO

1. Introdução e justificativa	7
2. Revisão bibliográfica.....	8
2.1. Insuficiência cardíaca	8
2.2. O receptor de angiotensina II do tipo 1	10
2.3. Agonismo enviesado	12
2.4. Planejamento racional de fármacos e modelagem molecular	14
3. Objetivo	16
4. Material e métodos	17
4.1. Ligantes peptídicos e estrutura do AT1R empregada	17
4.2. Ensaios de ancoramento da angiotensina II	18
4.3. Dinâmica molecular	19
4.4. Campos de interação molecular do AT1R	21
4.5. Construção do farmacóforo	22
4.6. Busca virtual	22
5. Resultados e discussão	23
5.1. Ensaios de ancoramento da angiotensina II	23
5.2. Dinâmica molecular	24
5.2.1. Angiotensina II.....	24
5.2.2. SVdF	31
5.2.3. TRV120027	35
5.2.4. TRV120023	38
5.2.5. SII.....	42
5.2.6. SI.....	45
5.2.7. DVG	49
5.2.8. Comparação dos perfis de interação entre os ligantes e o AT1R.....	52
5.3. Análise dos campos de interação molecular do AT1R	54
5.4. Construção do farmacóforo	57
5.5. Busca virtual	58
6. Conclusões.....	65
Referências	66
Apêndices.....	71
APÊNDICE 1 – Resultados das dinâmicas moleculares.....	71
APÊNDICE 2 – Análise dos campos de interação molecular (MIFs)	78
APÊNDICE 3 – Ancoramento das moléculas selecionadas na busca virtual.	84
Anexos	86
ANEXO A - Cópia do documento Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	86
ANEXO B – Ficha do Aluno atualizada.....	87

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Um dos grandes objetivos da química farmacêutica é a resolução de problemas de segurança e eficácia de terapias medicamentosas. No âmbito da insuficiência cardíaca, há um problema a ser solucionado em relação ao uso de antagonistas do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R). Tais antagonistas compreendem à classe de medicamento das sartanas, utilizadas para tratar a hipertensão e a hipertrofia cardíaca, sintomas presentes em pacientes com insuficiência cardíaca. Apesar da eficiência dos antagonistas de AT1R em diminuir a pressão sanguínea e a hipertrofia, sua ação no mesmo receptor causa um efeito inotrópico negativo no músculo cardíaco. Esse efeito secundário é prejudicial, principalmente a pacientes com insuficiência cardíaca, pois agrava o problema de ineficiência de bombeamento de sangue pelo coração (BAKER; BOOZ; DOSTAL, 1992; BELMONTE; BLAXALL, 2012; CRABOS et al., 1994).

Com a hipótese de um novo paradigma de sinalização dos Receptores Acoplados à Proteína G (GPCRs), surgiram novas possibilidades de desenvolvimento de fármacos mais seguros para uso na insuficiência cardíaca. Esse novo paradigma sugere que a ativação do AT1R (um GPCR) resulte em duas cascatas de sinalização independentes que geram respostas celulares diferentes: uma via proteína G, e outra via β -arrestina. Quando há ligação de um agonista pleno, como a angiotensina II, acredita-se que a via iniciada pela proteína G seja a responsável pelo aumento da pressão sanguínea e a hipertrofia do coração, enquanto que a via da β -arrestina esteja envolvida com processos de renovação celular e com o efeito inotrópico positivo. As sartanas, como antagonistas, impedem a sinalização do receptor como um todo, diminuindo a pressão sanguínea, por inibição da via da proteína G, e causando efeitos indesejados pelo bloqueio da via da β -arrestina. (APLIN; BONDE; HANSEN, 2009)

Foram descobertos recentemente os chamados agonistas enviesados que, ao se ligarem ao AT1R, são capazes de ativar apenas a via da β -arrestina, independentemente do recrutamento e sinalização da proteína G. Desse modo, esses novos agonistas seriam capazes de diminuir a pressão sanguínea sem causar o efeito indesejado de inotropismo negativo, sendo ideais para o uso por pacientes com insuficiência cardíaca. (GRANIER; KOBILKA, 2012)

Todos os agonistas enviesados do AT1R desenvolvidos até o momento são peptídeos semelhantes à angiotensina II. O mais ativo e promissor deles é o TRV1200027 (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-DAla), que se encontra em testes clínicos de fase II pela Trevena Inc., uma empresa especializada em fármacos com atividade enviesada em GPCRs. (VIOLIN et al., 2010; TREVENA INC., NCT01187836; NCT01444872, 2012)

Apesar da grande promessa que segue o novo agonista enviesado, sua característica peptídica poderá limitar sua utilização. Como todo fármaco peptídico, o TRV120027 possui um tempo de meia-vida muito baixo (2 minutos) e não pode ser administrado via oral (BOERRIGTER et al., 2013), o que limita seu uso fora de ambientes hospitalares. A descoberta de outros agonistas enviesados de natureza não protéica para o AT1R é, portanto, de extrema relevância e teria grande impacto no tratamento da insuficiência cardíaca.

A descoberta de agonistas enviesados para o AT1R pode ser mais rápida e eficiente seguindo o paradigma moderno da química medicinal no qual é utilizado o planejamento racional pela integração entre técnicas computacionais e experimentais para se chegar a um protótipo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Insuficiência cardíaca

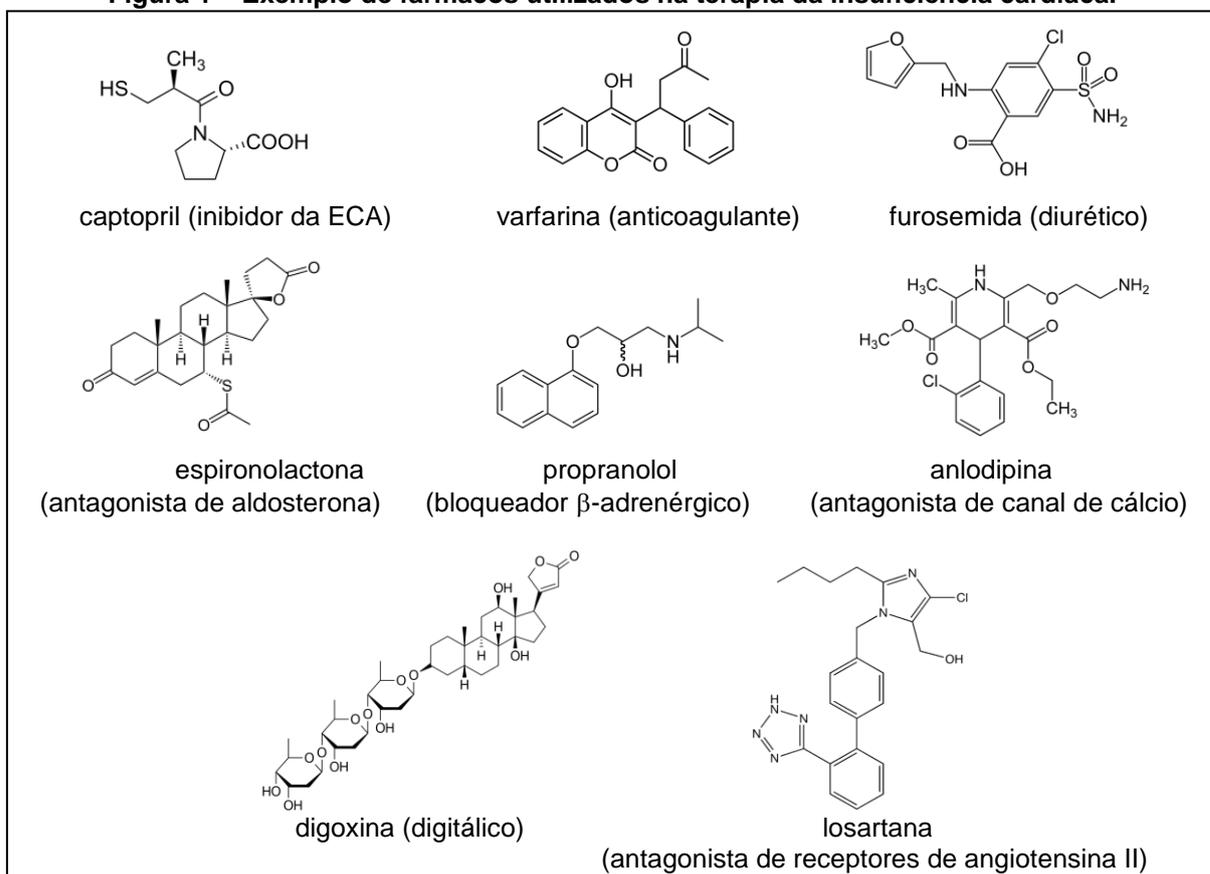
Insuficiência cardíaca é a incapacidade do coração em fornecer sangue suficiente para o organismo como um todo, não suprimindo as suas necessidades metabólicas, podendo levar à morte. Ela não é uma doença isolada, sendo consequência de várias outras comorbidades como diabetes *mellitus*, hipertensão, doença coronariana e doença de Chagas (NOGUEIRA; RASSI; CORRÊA, 2010).

A insuficiência cardíaca é um grande problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 6,6 milhões de pessoas com idade superior a 18 anos tiveram insuficiência cardíaca em 2010 e que esse número irá aumentar nos próximos anos. A taxa de mortalidade referente a esta condição também é bem significativa: cerca de 50% dos indivíduos portadores de insuficiência cardíaca vão a óbito em até 5 anos após a confirmação do diagnóstico (ROGER et al., 2012).

A incidência da insuficiência cardíaca vem aumentando mundialmente e em particular no Brasil, com o envelhecimento da população, uma vez que a incidência da doença é maior com o avanço da idade. A população idosa brasileira vem crescendo com a maior taxa mundial e estudos indicam que em 2025 teremos a sexta maior população de idosos no mundo. A insuficiência cardíaca já é a principal causa de internações pelo SUS (Sistema Único de Saúde) em pacientes acima de 60 anos, acarretando grandes custos em função de gastos hospitalares e aposentadorias precoces (SBC, 2013).

Atualmente, há diversas abordagens terapêuticas para a insuficiência cardíaca que abrangem amenização dos sintomas, diminuição da progressão da doença e prevenção de complicações decorrentes. Fármacos utilizados na terapêutica incluem inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), digitálicos, diuréticos, antagonistas de aldosterona, bloqueadores β -adrenérgicos, vasodilatadores diretos, antagonistas dos canais de cálcio, antiarrítmicos, anticoagulantes e antagonistas dos receptores de angiotensina II, como as sartanas (Figura 1). (SBC, 2013; JANUZZI; TROUGHTON, 2013).

Figura 1 – Exemplo de fármacos utilizados na terapia da insuficiência cardíaca.



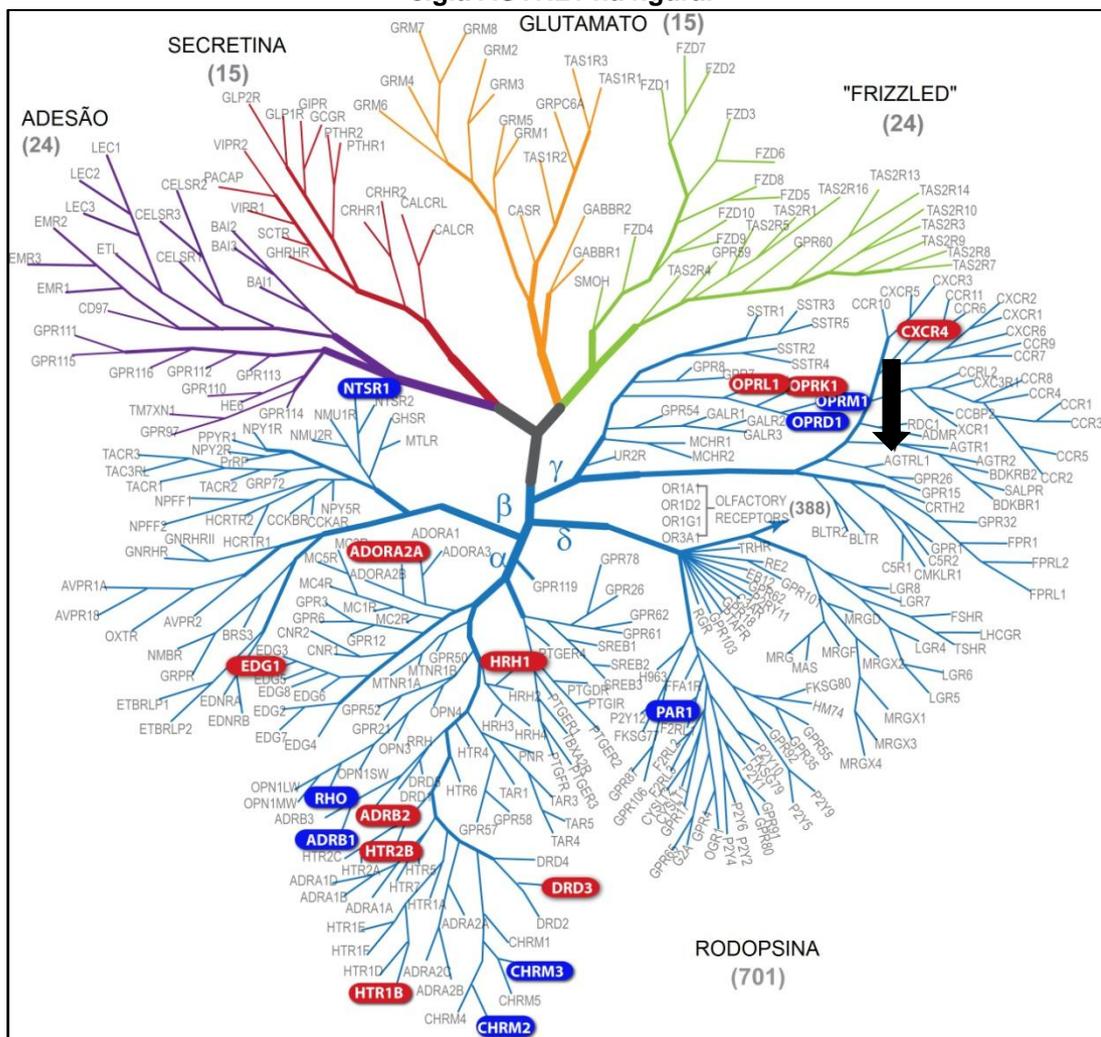
Os antagonistas dos receptores de angiotensina II, bem como os inibidores da ECA e antagonistas da aldosterona, agem no sistema hormonal renina-angiotensina-aldosterona, responsável pela regulação da homeostase eletrolítica do plasma. A angiotensina II (AngII) age em dois tipos principais de receptores: o AT1 e o AT2, sendo que o primeiro deles, o AT1R (“Angotensin Type 1 Receptor”), é considerado o maior responsável por suas ações fisiológicas. A interação do peptídeo endógeno com o receptor resulta em uma resposta inotrópica positiva no músculo cardíaco, hipertrofia cardíaca e aumento da pressão arterial. A ligação dos antagonistas convencionais ao AT1R causa efeitos contrários como a diminuição da pressão sanguínea e diminuição da hipertrofia e da contratilidade cardíaca. A diminuição da pressão sanguínea e da hipertrofia é esperada e benéfica para pacientes com problemas cardíacos, porém o efeito inotrópico negativo pode ser prejudicial para aqueles que apresentam insuficiência cardíaca, acentuando o problema (BAKER; BOOZ; DOSTAL, 1992; BELMONTE; BLAXALL, 2012; CRABOS et al., 1994).

2.2. O receptor de angiotensina II do tipo 1

O receptor AT1R pertence à família dos GPCRs, que constituem a maior superfamília de proteínas codificadas pelo genoma humano (HOELZ, et al., 2013). Além disso, são alvos de mais de 30% dos fármacos comercializados. Esses receptores podem ser divididos em cinco classes de acordo com suas semelhanças estruturais: semelhantes à rodopsina, semelhantes ao receptor de secretina, receptores de glutamato metabotrópico, receptores com sítio de adesão e receptores “frizzled”, ou lisos (Figura 2). (BJARNADÓTTIR, 2006)

A classe dos GPCRs semelhantes à rodopsina, à qual pertence o AT1R, é a mais populosa. Apesar da diferença na composição dos aminoácidos entre diferentes GPCRs, eles compartilham uma estrutura comum. Essa família de receptores possui sete domínios transmembrânicos em α -hélice (TM1-7), três alças extracelulares (LE1-3) contendo a amina terminal e três alças intracelulares (LI1-3) com o carboxi-terminal, onde é acoplada a proteína G. (VENKATAKRISHNAN, et al., 2013)

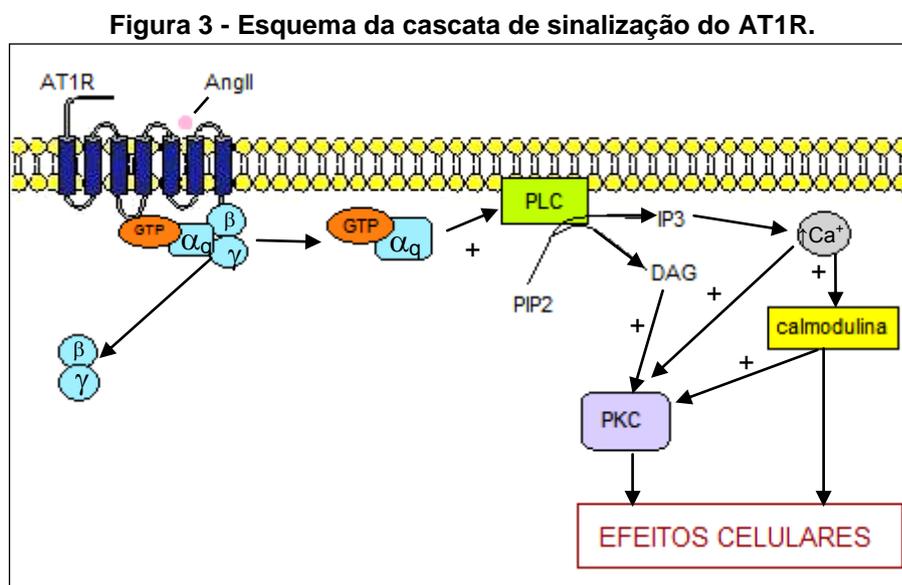
Figura 2 - Classificação hierárquica da superfamília de GPCRs. Estão destacados em vermelho e azul os receptores já cristalografados e a seta preta aponta a localização do AT1R, com a sigla AGTRL1 na figura.



Adaptado de: GPCRNWORLD, 2014.

Como receptores, os GPCRs enviam um sinal intracelular a partir do acoplamento de um ligante presente no meio extracelular, desencadeando uma cascata de sinalização. Com a ligação da AngII ao AT1R, há uma mudança de conformação do receptor que causa o acoplamento da proteína G heterotrimérica e do GTP. A proteína G então se dissocia em um dímero ($\beta\gamma$) e na subunidade α_q , a qual ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC gera trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), responsável por ativar diretamente a proteína quinase C dependente de cálcio (PKC), que ativa outras proteínas. O IP3 aumenta o influxo de cálcio do retículo endoplasmático que, além de ativar a PKC, ativa a calmodulina. A calmodulina, por sua vez, também ativa a PKC e outras proteínas quinases. A

casca de ativação dessas proteínas irá gerar as respostas celulares, como a vasoconstrição (Figura 3). (APLIN; BONDE; HANSEN, 2009)



Fonte: autor.

Uma vez ativados, GPCRs são rapidamente fosforilados por quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs) e se ligam a proteínas da classe das β -arrestinas. Este processo interfere com a interação receptor/proteína G e promove a internalização do receptor, interrompendo a sinalização. Esse processo é chamado de dessensibilização (LEFKOWITZ; SHENOY, 2005). Mais recentemente, demonstrou-se que o recrutamento da β -arrestina também gera segundos mensageiros ativando outras cascatas de sinalização independentes da ativação da proteína G (DEWIRE et al., 2007; LEFKOWITZ; SHENOY, 2005). Acredita-se que a via de sinalização da β -arrestina esteja envolvida nos processos de renovação e sobrevivência celulares (APLIN; BONDE; HANSEN, 2009). Foram observados também efeitos de contração de cardiomiócitos com a ativação isolada dessa via de sinalização (SIMARD et al., 2013).

2.3. Agonismo enviesado

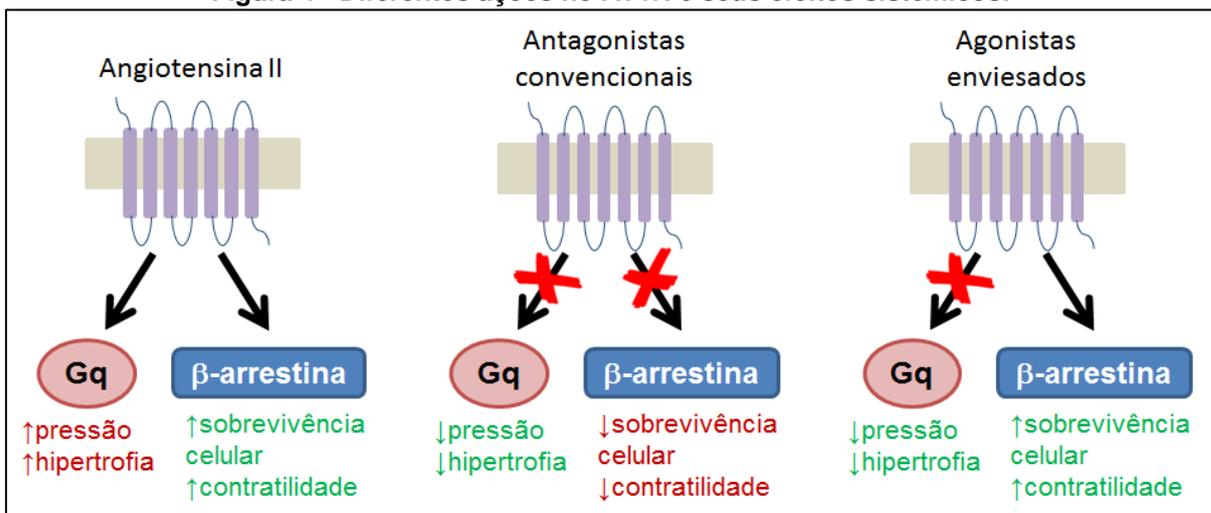
O agonismo enviesado é um conceito que surgiu no início do século XX proveniente de estudos que indicam que a ativação de GPCRs como o AT1R é mais complexa do que se pensava antes (KENAKIN, 2005). A ativação da via da β -arrestina pode ser independente da ativação da proteína G e vice-versa, dependendo do ligante, desencadeando vias de sinalização e respostas biológicas

distintas (GRANIER; KOBILKA, 2012). Estudos em receptores AT1R mutantes mostram que essa ativação seletiva poderia ocorrer tanto por uma incapacidade de recrutamento de proteína G ou por uma maior afinidade do receptor pela β -arrestina (BONDE et al., 2010). Essa característica também foi observada em outros receptores de membrana acoplados à proteína G, como os receptores β -adrenérgicos (BELMONTE; BLAXALL, 2012; VIOLIN; LEFKOWITZ, 2007).

Alguns peptídeos análogos à angiotensina II foram sintetizados e demonstraram possuir essa ação seletiva para promoção da via da β -arrestina (“eficácia colateral”) frente ao AT1R, levando a denominação de agonistas enviesados (APLIN et al., 2007; KENAKIN, 2005). A primeira caracterização de um agonista enviesado do AT1R foi feita por Wei et al. em 2003, quando foi apresentada a capacidade de um peptídeo análogo à angiotensina II anteriormente sintetizado ([Sar¹, Ile⁴, Ile⁸]AngII, ou SII) em ativar a ERK (segundo mensageiro da cascata dependente de β -arrestina) independentemente da ativação da proteína G. Entretanto, o peptídeo SII apresentava afinidade muito menor pelo receptor AT1R se comparado à AngII (HOLLOWAY et al., 2002), impossibilitando a avaliação de suas vantagens *in vivo*. Apesar disso, este estudo possibilitou a descoberta de dois novos agonistas enviesados, TRV120023 ([Sar¹, Lys⁵, Ala⁸]AngII) e TRV120027 ([Sar¹, D-Ala⁸]AngII), com maior afinidade pelo receptor (VIOLIN et al., 2010). Outros peptídeos com ação enviesada para o AT1R também foram descritos mais recentemente por Zimmerman et al. (2012).

O agonismo enviesado desses novos peptídeos poderia levar à diminuição da pressão arterial por não ativar a via da proteína G e, ao mesmo tempo, não bloquear efeitos benéficos da via da β -arrestina (VIOLIN; LEFKOWITZ, 2007) (Figura 4). Sendo assim, os agonistas enviesados teriam grande vantagem no tratamento da insuficiência cardíaca em comparação aos antagonistas convencionais atualmente utilizados os quais, apesar de diminuírem a pressão sanguínea arterial, não melhoram o desempenho cardíaco (KENAKIN; CHRISTOPOULOS, 2013). De fato, um estudo em cães com insuficiência cardíaca induzida mostrou que o TRV120027 foi capaz de diminuir a pressão sanguínea e aumentar o débito cardíaco e o fluxo sanguíneo renal. (BOERRIGTER et al., 2011)

Figura 4 - Diferentes ações no AT1R e seus efeitos sistêmicos.



Adaptado de: APLIN; BONDE; HANSEN, 2009.

O peptídeo TRV120027 é atualmente o agonista enviesado mais promissor e se encontra em testes clínicos de fase II, cujos resultados ainda não foram divulgados (TREVENA INC., NCT01187836; NCT01444872, 2012). Apesar dos bons resultados nos ensaios iniciais e perspectivas, o fato do TRV120027 ser um peptídeo diminui sua biodisponibilidade e impossibilita a administração via oral. Portanto, a administração intravenosa restringe o uso ao ambiente hospitalar.

2.4. Planejamento racional de fármacos e modelagem molecular

Com o avanço nas áreas de ciência computacional, caracterização de biomacromoléculas e biologia celular, aliado ao crescente conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos nas bases moleculares das doenças, a aplicação de metodologias de CADD (*Computer-Assisted Drug Design*), particularmente de modelagem molecular, tem se tornado cada vez mais comum na descoberta de novos compostos potencialmente ativos (EKINS et al., 2007; LOEWE, 2002).

Por meio da aplicação de metodologias de modelagem molecular é possível construir modelos que, quando submetidos a programas computacionais específicos, permitem a simulação, o cálculo de propriedades estéricas e eletrônicas, estudo de movimento molecular, visualização e interpretação de sistemas de interação entre moléculas e alvos biológicos (receptores, enzimas, ácido nucleico, canais de íons) (HENCKEL; BILLINGS, 1995). Sendo assim, o CADD pode ser aplicado a qualquer molécula cuja interação com um alvo molecular seja

descrita, ou mesmo estudo de propriedades de um conjunto de moléculas com atividade biológica conhecida (COHEN, 1996; WERMUTH, 2007).

Dois estratégias podem ser aplicadas no CADD: o planejamento direto ou dependente do receptor (*structure-based drug design*, SBDD) e o planejamento indireto ou independente do receptor (*ligand-based drug design*, LBDD), que utiliza a estrutura de ligantes disponíveis (COHEN, 1996; EKINS et al., 2007; HENKEL; BILLINGS, 1995; OOMS, 2000; WERMUTH, 2007). No planejamento baseado na estrutura, são comumente empregadas técnicas de ancoramento de moléculas no sítio de interação do alvo. Essa metodologia gera um grande número de conformações para um mesmo ligante, que são classificadas por sua capacidade de interação com o receptor, permitindo identificar aquelas de maior interesse (LEACH, 2001b). Os programas de ancoramento molecular utilizam um algoritmo inicial para ancorar o ligante no sítio ativo da proteína. Em seguida, são utilizadas as funções de ranqueamento, ou “score”, que classificam as conformações do ligante no receptor, a fim de encontrar a conformação mais provável de ser a verdadeira. As funções de ranqueamento utilizadas nesses programas podem ser de campos de força, empíricas ou “baseadas em conhecimento”. Alguns programas ainda utilizam um consenso de funções variadas (KITCHEN et al., 2004). Apesar do grande avanço nessas funções em prever a conformação mais provável do ligante, esse ainda é considerado o ponto limitante da técnica de ancoramento, uma vez que não é muito apurada (LEACH; SHOICHET; PEISHOFF, 2006).

Em função da limitação das funções de ranqueamento da técnica de ancoramento, muitos estudos complementam esses ensaios com técnicas de dinâmica molecular, a fim de se aumentar a credibilidade dos resultados de interação entre ligante e receptor (FILLION et al., 2013; MATSOUKAS et al., 2013a; MATSOUKAS et al., 2013b; TUCCINARDI et al., 2006). A dinâmica molecular é uma técnica computacional de simulação dos movimentos dos átomos de um sistema em um intervalo de tempo e é muito utilizada a fim de se obter uma conformação mais estável de uma molécula ou um complexo receptor-ligante que seria a mais provavelmente encontrada na situação real. Os métodos de dinâmica molecular utilizam campos de força empíricos para calcular a energia do sistema de acordo com a posição do núcleo dos átomos. A maioria dos campos de força atuais calcula a energia potencial de um sistema a partir de uma fórmula com componentes de

interações intra e intermoleculares e de geometria da molécula (distâncias, ângulos e torsões) (LEACH, 2001a).

Apesar do grande avanço das técnicas sintéticas e de testes biológicos, a indústria farmacêutica e os centros de pesquisa ainda enfrentam desafios em identificar novos fármacos ou líderes no meio das grandes coleções de compostos conhecidas atualmente. Essa dificuldade, unida à necessidade de identificação dessas moléculas mais rápida e economicamente, deixam cada vez mais em pauta a busca virtual, que consiste na busca de novos compostos biologicamente ativos a partir de *hits* oriundos de bases de dados de moléculas conhecidas, por meio de técnicas computacionais, como algumas das descritas anteriormente (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008).

A busca virtual (VS, do inglês *virtual screening*) também pode seguir duas vertentes: a baseada na estrutura (SBVS) e a baseada nos ligantes (LBVS). Em ambas, são selecionadas moléculas que possuem características de fármaco ou líder que são “filtradas” de acordo com as características necessárias para atividade desejada. Essas características são representadas pelo farmacóforo gerado a partir da semelhança entre as estruturas de ligantes já conhecidos, no LBVS, ou da interação com o alvo estudado, conhecida por processos de ancoramento ou campos de interação molecular, no SBVS. As técnicas de busca por farmacóforo gerado por mapeamento do receptor, no SBVS, são cada vez mais importantes, levando em conta o crescente número de proteínas descritas no *Protein Data Bank* (PDB) e as melhoras nos processos de mapeamento de sítios ativos. Além disso, o processo de ancoramento no SBVS gera maior acurácia no processo de busca virtual, sendo possível uma identificação mais eficiente de ligantes reais entre os compostos da base de dados. (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008; PARKER; BAJORATH, 2006).

3. OBJETIVO

O objetivo desse estudo consistiu em encontrar, por meio de uma busca virtual baseada na estratégia de SBDD, ligantes não peptídicos que possam apresentar atividade agonista enviesada para β -arrestina no receptor de angiotensina II tipo 1. Esses novos ligantes se apresentariam como protótipos,

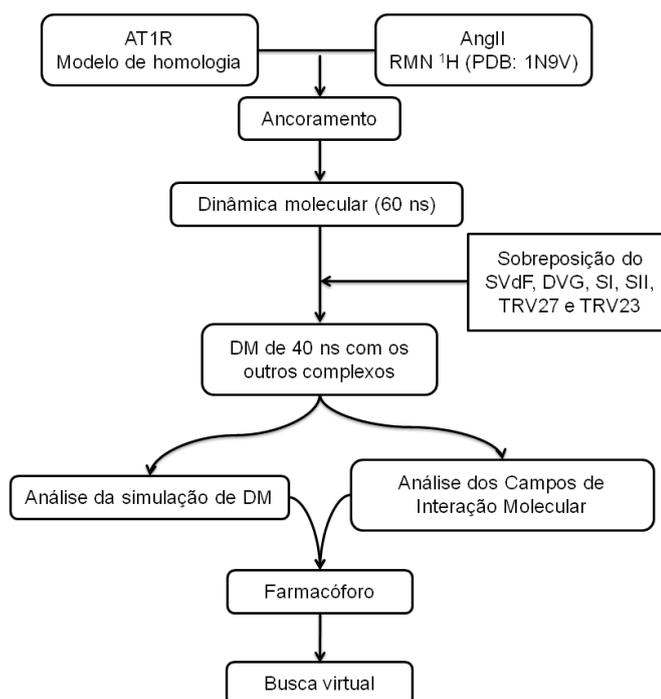
candidatos a fármacos, de uma nova classe terapêutica para um tratamento mais seguro e eficaz da insuficiência cardíaca.

Para a realização da busca virtual, um modelo farmacofórico foi construído a partir de dados de interações entre ligantes peptídicos com ação agonista enviesada e o receptor AT1R. Também foram considerados dados retirados de análises de campos de interação molecular gerados a partir da estrutura do receptor.

Técnicas de ancoramento e de dinâmica molecular foram empregadas a fim de se analisar as interações realizadas entre os ligantes e o receptor, bem como seu modo ligação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 5 – Fluxograma de atividades que foram realizadas. As etapas estão detalhadas nos tópicos seguintes.



4.1. Ligantes peptídicos e estrutura do AT1R empregada

Para que se pudesse identificar os principais pontos de interação entre agonistas e agonistas enviesados com o AT1R, ensaios de ancoramento e dinâmica molecular foram realizados. Os ligantes que foram utilizados no estudo foram retirados da literatura e estão representados na Tabela I.

Tabela I - Peptídeos com ação no AT1R que serão utilizados no estudo. Em negrito estão representadas as mutações em relação à sequência da AngII.

Nome	Sequência peptídica	Tipo de ação	Referência
AngII	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Agonista	Zimmerman et al., 2012
SVdF	Sar -Arg-Val-Tyr- Val -His-Pro- DPhe	Agonista	Zimmerman et al., 2012
TRV027	Sar -Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro- DAIa	Enviesada	Violin et al., 2010
TRV023	Sar -Arg-Val-Tyr- Lys -His-Pro- AIa	Enviesada	Violin et al., 2010
SI	Sar -Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro- Ile	Enviesada	Zimmerman et al., 2012
SII	Sar -Arg-Val- Ile -Ile-His-Pro- Ile	Enviesada	Wei et al., 2003
DVG	Asp-Arg-Val-Tyr- Val -His-Pro- Gly	Enviesada	Zimmerman et al., 2012

Devido à indisponibilidade da estrutura cristalográfica do receptor AT1R, foi utilizado para os estudos computacionais um modelo do AT1R construído por modelagem comparativa e disponível para fins acadêmicos no site <<http://cssb2.biology.gatech.edu/gpcr2011/list.html>> (ZHOU; SKOLNICK, 2012). Para a geração do modelo empregado foi utilizado um método de multi-moldes, sendo um deles o principal, no qual foram utilizadas as estruturas experimentais obtidas por difração de raios-X de outros GPCRs humanos já disponíveis. O modelo do AT1R foi desenvolvido pelo programa TASSER^{VM}-lite e, como seu molde principal, foi utilizada a estrutura do CXCR4 (receptor de quimiocina tipo 4), disponível no *Protein Data Bank* pelo código 3ODU (WU et al., 2010). Foi utilizado o CXCR4, uma vez que esse receptor apresenta estruturas de domínios flexíveis mais semelhantes às do AT1R, com mais de 35% de identidade nos domínios transmembrânicos (FILLION et al., 2013). O modelo foi devidamente validado (ZHOU; SKOLNICK, 2012).

O modelo do AT1R foi tratado na plataforma de programas Sybyl-X Suite 2.1 (SYBYL-X) com adição randômica de hidrogênios e ajuste de protonação de resíduos para pH 7,2. Esse modelo foi então utilizado nos ensaios de ancoramento e dinâmica molecular.

4.2. Ensaios de ancoramento da angiotensina II

Inicialmente, realizamos o ancoramento do ligante endógeno, AngII, no modelo de homologia do receptor (ZHOU; SKOLNICK, 2012) no pacote Sybyl-X Suite 2.1 (SYBYL-X), empregando o Surflex-Dock 2.0. O programa empregado utiliza métodos de ancoramento incremental e por similaridade morfológica. São

utilizadas sondas (CH₄, C=O e N-H) para mapear o sítio de ligação do alvo, gerando um “ligante ideal”, chamado de “protomol” que serve de molde para o encaixe do ligante em estudo. (JAIN, 2003)

Foi utilizada a média da estrutura da AngII resolvida por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de H¹ retirada do *Protein Data Bank* (código 1N9V) , com RMSD de $0,30 \pm 0,22$ Å e $1,38 \pm 0,48$ Å para as cadeias principais e átomos pesados do peptídeo, respectivamente (SPYROULIAS et al., 2003). A mesma estrutura da AngII serviu posteriormente como molde para a formação das estruturas dos outros ligantes análogos (Tabela I) que também foram feitos no programa Sybyl-X Suite 2.1 (SYBYL-X).

O AT1R foi mantido rígido, com liberdade na movimentação de hidrogênios, e mantida total liberdade de rotação das ligações químicas da AngII, com exceção das ligações torsionais dos átomos de C e N das ligações peptídicas. O protomol foi gerado automaticamente, com limiar de desvio (“Threshold”) de 0,5 Å e “Bloat” de 1,0, que permite que uma região de 1 Å ao redor do protomol também seja explorada. A função de ranqueamento, ou “score”, utilizada foi a “CScore”, que utiliza um consenso das funções ChemScore, G_score, D_Score e PMF_Score, porém seu valor não foi considerado para a escolha da conformação nessa etapa. Os melhores resultados obtidos foram agrupados de acordo com a orientação do peptídeo na cavidade do receptor e inspecionados visualmente, sendo selecionado para posterior dinâmica molecular o complexo que apresentou as interações entre o AT1R e a AngII caracterizadas e descritas pela literatura por ensaios de mutagenicidade (ARSENAUT et al., 2010; FILLION et al., 2013; GASPARO, 2000; LAPORTE et al., 1999; MATSOUKAS et al., 2013a; SPYROULIAS et al., 2003).

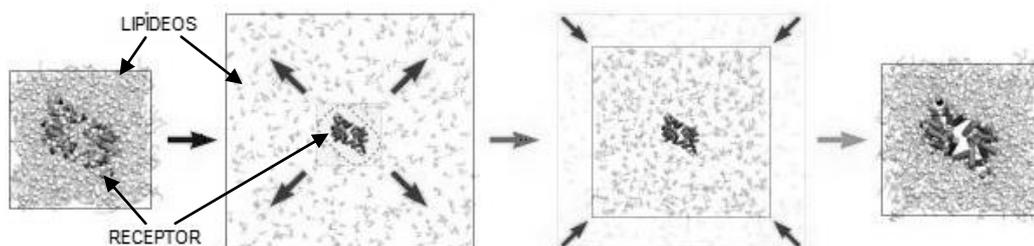
4.3. Dinâmica molecular

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para os sete complexos ligante-AT1R, utilizando protocolos utilizados anteriormente na literatura para sistemas semelhantes como modelos (KANDT; ASH; TIELEMAN, 2007, MATSOUKAS et al., 2013^a, 2013^b). Primeiramente, o complexo AngII-AT1R obtido no ancoramento foi submetido a uma dinâmica molecular em bicamada lipídica de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina), água (modelo de três pontos SPC) e íons cloreto necessários para neutralizar a carga do sistema, à temperatura

fisiológica (310 K), em caixa cúbica com condições periódicas de borda. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas no programa GROMACS, versão 4.5, utilizando o campo de força GROMOS 53a6 (OOSTENBRINK et al., 2004) , com inclusão de parâmetros para moléculas de POPC (BERGER; EDHOLM; JÄHNIG, 1997).

Para a inserção do receptor na bicamada lipídica utilizou-se o InflateGRO, um *script* do programa PERL, disponível para download no site <<http://www.csb.bit.uni-bonn.de/home.html>>. Esse *script* permite expandir a bicamada nos eixos x e y, espaçando os lipídeos, posicionar o receptor e excluir os lipídeos que ocupam o mesmo espaço, para depois contrair a membrana novamente até ser alcançado o valor de área por lipídeo próximo do experimental ($0,66 \text{ nm}^2$ para o POPC), como ilustrado na Figura 6. (KANDT; ASH; TIELEMAN, 2007).

Figura 6 - Esquema ilustrativo do método de inserção do receptor na bicamada lipídica pelo InflateGRO.



Adaptado de KANDT; ASH; TIELEMAN, 2007.

O sistema foi minimizado com algoritmo “*steepest descent*” de modo a acomodar a bicamada lipídica e, em seguida, foram feitas equilibrações isotérmica de 0,5 ns e isobárica de 2 ns com restrição de movimentação do receptor e do ligante. Em seguida, as restrições de movimentação foram retiradas e foi realizada a dinâmica de produção com duração de 60 ns, com passos de 2 fs (0,002 ps), totalizando 30.000.000 passos. Todos os passos foram realizados em temperatura constante de 310 K, com termostato de Berendsen separados para o complexo receptor-ligante, bicamada lipídica e solvente com íons. As ligações foram constritas com o algoritmo LINCS, as interações de Lennard-Jones calculadas com um limite de corte de 12 Å e as interações eletrostáticas tratadas com PME e limite de corte também de 12 Å.

As conformações que foram utilizadas posteriormente à dinâmica foram selecionadas por análise de agrupamento hierárquico de RMSD realizada no GROMACS 4.5 pelo algoritmo "gromos" (DAURA, et al. 1999), que reúne em um mesmo grupo estruturas cujos valores de RMSD não excedem um certo valor de corte. No presente estudo, o valor de corte foi estipulado como 1 Å, de modo a gerar uma boa separação dos grupos, sendo analisado um quadro a cada 4 fs (dois passos).

As interações intermoleculares dos complexos foram analisadas de duas maneiras. Primeiramente, foram analisadas as ligações de hidrogênio entre o peptídeo ligante e o receptor pelo cálculo das suas ocupações durante a trajetória das dinâmicas moleculares a partir do equilíbrio do sistema. A ocupação foi calculada utilizando arquivos de saída do programa GROMACS 4.5 e um *script* do programa PERL disponível em <http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/Scripts/plot_hbmap.txt>, utilizando distância e ângulo limites de 3,5 Å e 30° respectivamente. As interações aromáticas foram analisadas a partir da conformação selecionada na análise de agrupamentos utilizando o programa BINANA 1.0.2 (DURRANT; MCCAMMON, 2011). Para essa última análise, foram utilizados limites de distâncias e ângulos padrões: 7,5 Å e 30° para interações de empilhamento π , 6,0 Å e 30° para interações cátion – π e 5,0 Å e 30° para interações de empilhamento T.

Os resultados de simulação de dinâmica molecular do complexo da AngII nos guiaram para o alinhamento dos outros peptídeos análogos (Tabela I), que foi realizado pela sobreposição de suas cadeias principais com a da AngII no interior do receptor. Em seguida, os sistemas foram minimizados e submetidos ao mesmo protocolo descrito anteriormente de dinâmica molecular.

4.4. Campos de interação molecular do AT1R

Foram realizados estudos de modelagem molecular do AT1R por meio de cálculos dos campos de interação molecular (MIFs), de modo a avaliar características peculiares do sítio de interação com os ligantes e a seletividade química. Esse método permitiu a obtenção de informações teóricas importantes sobre características estéricas e eletrônicas do receptor utilizadas na construção do farmacóforo.

O desenvolvimento desse estudo foi realizado no programa GRID v. 2.2, utilizando o centro da cavidade do receptor como ponto central da caixa, com dimensões x, y e z de 45, 70 e 80 Å respectivamente, com espaçamento de grade de 1 Å. Para a geração dos MIFs foram utilizadas as sondas hidrofílica (H₂O), hidrofóbica (DRY), nitrogênio doador de ligação de hidrogênio (N1) e oxigênio aceptor de ligação de hidrogênio (O). Foram mapeadas sete estruturas do AT1R, com conformações retiradas das dinâmicas moleculares realizadas com os sete peptídeos distintos (Ang II, SVdF, DVG, SI, SI, TRV120023 e TRV120027). Os campos gerados foram analisados visualmente e comparados com as características dos ligantes no interior do receptor e suas interações intermoleculares previamente analisadas para posterior construção do farmacóforo.

4.5. Construção do farmacóforo

Para a construção do farmacóforo, os campos moleculares gerados foram visualizados e analisados utilizando-se o programa PyMol. Esse processo foi efetuado comparando-se os campos moleculares de importância do AT1R para interação com agonistas enviesados com os campos importantes para interação com agonistas plenos. Após a análise, o farmacóforo foi gerado no módulo UNITY 3D do pacote Sybyl-X Suite 2.1 (SYBYL-X) levando-se em consideração os centróides dos pontos comuns de interação de agonistas enviesados com o receptor que foram destacados na análise visual. Para cada ponto, foi definido um raio de tolerância de modo a englobar todos os pontos da região com a mesma característica. O modelo construído foi utilizado posteriormente na busca virtual.

4.6. Busca virtual

No módulo UNITY 3D do pacote Sybyl-X Suite 2.1 (SYBYL-X), utilizando o farmacóforo específico desenvolvido, foi realizada a pesquisa no banco de dados ZINC (IRWIN et al., 2012). Os bancos de moléculas que foram utilizados para a busca, foram o “*All Purchasable*” e o “*All Boutique*” que compreendem um total de 34.942.670 moléculas que podem ser adquiridas.

Primeiramente foi aplicado um filtro químico com as seguintes características: peso molecular acima de 350 Da, Log P entre -2,5 e 2,5, mínimo de 0 e máximo de 5 doadores de ligação de hidrogênio, mínimo de 0 e máximo de 10 aceptores de ligação de hidrogênio, carga formal entre -2 e 2 e máximo de um grupamento nitro

na molécula. Esse filtro tem por objetivo diminuir o espaço amostral por meio da seleção de moléculas que apresentem propriedades mais próximas de compostos liderem em planejamento de fármacos (“lead like”). As regras de Lipinski para biodisponibilidade oral (LIPINSKI et. al, 2001) não foram inteiramente aplicadas, uma vez que as moléculas de interesse deverão ser grandes e poderão ter uma ampla variação de hidrofobicidade. Portanto, optamos por ampliar a escala de valores de LogP. Também incluímos o critério de exclusão de moléculas com mais de um grupamento nitro, pois esse é frequentemente associado à toxicidade de moléculas. Após a aplicação do filtro, as moléculas restantes foram submetidas à triagem 3D com o farmacóforo construído no módulo UNITY.

Em seguida, foi aplicado outro filtro químico nas moléculas triadas com novos limites de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, de acordo com o farmacóforo: mínimo de 1 e máximo de 5 doadores e mínimo de 2 e máximo de 10 aceptores de ligação de hidrogênio.

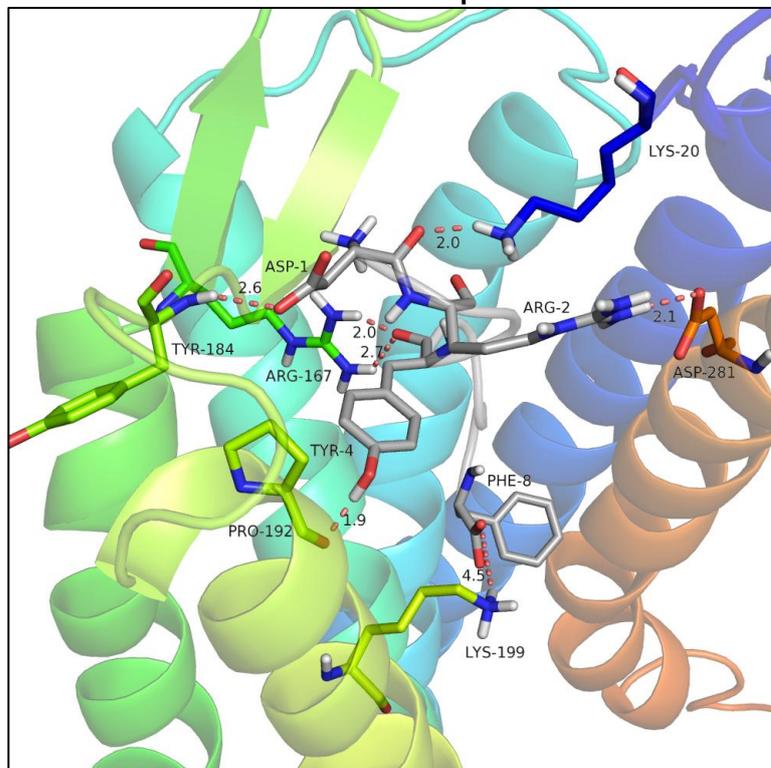
Após o novo filtro, as moléculas foram submetidas ao ancoramento na estrutura do AT1R retirada da dinâmica molecular com o agonista enviesado mais potente (TRV120027). O ancoramento foi realizado de acordo com o mesmo protocolo descrito anteriormente (item 4.2). O resultado do ancoramento foi inspecionado visualmente e foram selecionadas as moléculas que apresentaram interações com o receptor compatíveis com o perfil dos agonistas enviesados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de ancoramento da angiotensina II

Foram realizados 50 ancoramentos a fim de se obter uma amostra considerável de conformações da AngII no interior do receptor. O ancoramento da AngII no receptor foi realizado com o pacote computacional Sybyl-X Suite 2.1 (SYBYL-X), pelo Surflex-Dock 2.0. Os resultados foram analisados visualmente no programa PyMol e separados em grupos por similaridade na orientação de pose da AngII. O grupo com maior número amostral foi analisado quanto às interações observadas, sendo escolhida a conformação que melhor correspondia às interações descritas na literatura.

Figura 7 - Ancoramento da AngII no AT1R. A cavidade do receptor está representada em colorido por modelo em fitas com os aminoácidos envolvidos na interação destacados em cilindro com carbonos em verde. A AngII se encontra em formato de cilindro, com os carbonos em cinza. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. As linhas pontilhadas em vermelho representam as interações polares possivelmente envolvidas com as distâncias entre os átomos apresentadas em Å.



A conformação selecionada, representada na Figura 7, apresenta interações bem descritas entre o carboxil terminal da AngII com a cadeia lateral da LYS-199 do receptor (FILLION et al., 2013; GASPARO, 2000; LAPORTE et al., 1999; MATSOUKAS et al., 2013a; SPYROULIAS et al., 2003). A AngII também interage com os resíduos de ARG-167, como descrito anteriormente (FILLION et al., 2013; GASPARO, 2000; MATSOUKAS et al., 2013a; SPYROULIAS et al., 2003), além dos resíduos de TYR-184 (FILLION et al., 2013) e ASP-281 (FILLION et al., 2013; GASPARO, 2000; SPYROULIAS et al., 2003) do receptor.

5.2. Dinâmica molecular

5.2.1. Angiotensina II

O complexo AT1R-AngII retirado do ancoramento foi submetido a uma dinâmica molecular de 60 ns em bicamada lipídica de POPC. O sistema apresentou uma área por lipídeo de 0,73 nm², próxima à experimental (0,66 nm²) e se mostrou

estável durante todo o período, como mostra o gráfico de energia do sistema representado na Figura A1.1.

A temperatura do sistema se manteve em torno de 310 K ($309,97 \pm 0,91$ K), a pressão oscilou em torno de um bar ($-0,56 \pm 96,87$ bar) e a densidade da água do meio se manteve constante e próxima do valor real ($1015,63 \pm 1,65$ kg/m³), como mostra a Figura A1.2. A grande variação da pressão do sistema pode ser justificada com o tamanho da caixa de simulação (6,7 x 13,3 x 10,2 nm) e a grande quantidade de átomos nela contida (70.042), uma vez que ela calculada a partir da colisão das moléculas do sistema na parede da caixa de simulação. A caixa de simulação (sem o solvente) está representada na Figura 8.

O equilíbrio do sistema foi alcançado em aproximadamente 30 ns, como pode ser analisado pelo gráfico de RMSD (desvio quadrado médio) das estruturas das cadeias principais do receptor e da AngII, que passam a oscilar entre 0,7-0,6 nm e 0,1-0,2 nm respectivamente (Figura 9). O alto desvio da estrutura em equilíbrio do AT1R em relação à estrutura inicial era esperado, uma vez que houve a inserção do receptor, que estava em meio homogêneo, em uma bicamada lipídica, causando um pequeno rearranjo da estrutura protéica. Pela análise do RMSD através do tempo também é possível notar a alta estabilidade da estrutura da AngII no interior do receptor, apresentando baixos valores de desvio (menores do que 0,2 nm), o que indica que o peptídeo se mantém no interior da cavidade do receptor de maneira estável. Podem ser observados, no mesmo gráfico, dois momentos distintos de conformação da AngII (de 30-52 ns e 52-60 ns) que foram avaliados posteriormente com o cálculo do Fator-B e na análise de agrupamentos.

Figura 8 - Representação da caixa de simulação da dinâmica molecular com o AT1R (cinza), AngII (carbonos em amarelo) e bicamada de POPC (carbonos em verde). A água não foi exibida para melhor visualização.

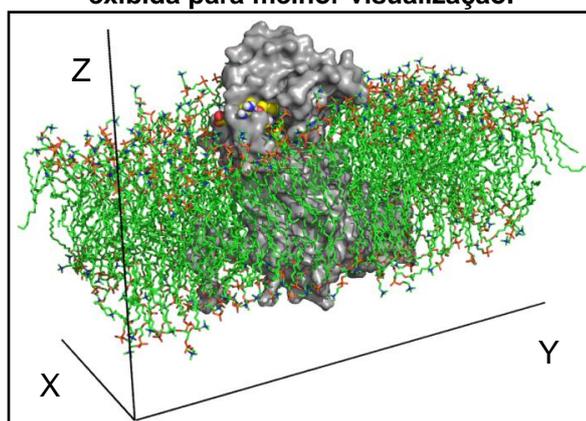
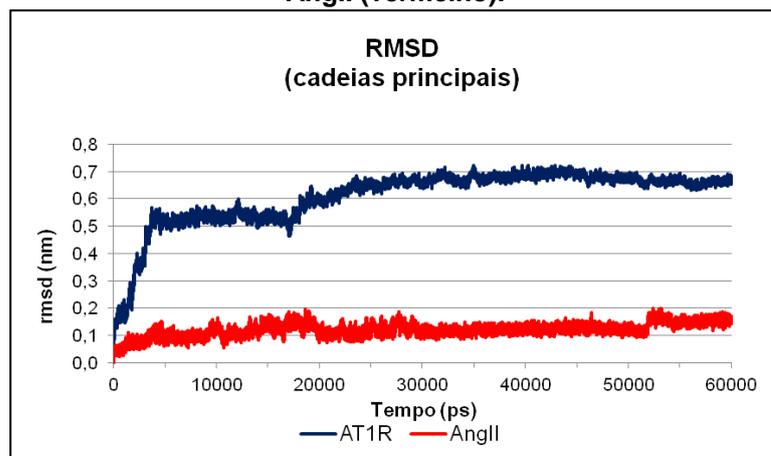


Figura 9 - Gráfico de desvio quadrado médio (RMSD) da cadeia principal do AT1R (azul) e da AngII (vermelho).



A estabilidade da proteína no decorrer da dinâmica também pode ser analisada pelo raio de giro (*radius of gyration*, Rg). Tal variável pode ser usada para representar o grau de empacotamento de polipeptídeos e é definida como a distância ponderada pela massa de cada átomo ao centro de massa da proteína (HONG; LEI, 2009; LOBANOV; BOGATYREVA; GALZITSKAYA, 2008). O gráfico de raio de giro da cadeia principal do AT1R pelo tempo está representado na Figura 10. É possível observar que o empacotamento da proteína estabiliza em aproximadamente 15 ns em torno de 2,30-2,35 nm, valor plausível para proteínas de 359 aminoácidos, como o AT1R (HONG; LEI, 2009; LOBANOV; BOGATYREVA; GALZITSKAYA, 2008). A maior variação do raio de rotação do receptor ocorreu no eixo z da caixa de simulação (Figura 11), o que era esperado, uma vez que a bicamada lipídica envolve o receptor no plano dos eixos x e y.

Figura 10 - Gráfico de variação do raio de giro total da cadeia principal do AT1R pelo tempo de simulação da dinâmica do complexo AT1R-AngII.

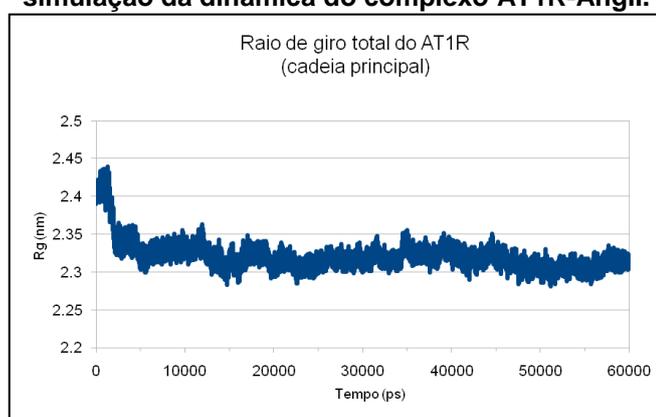
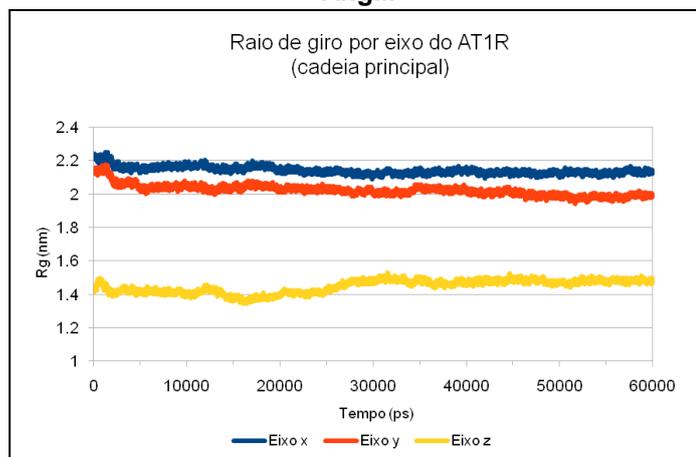
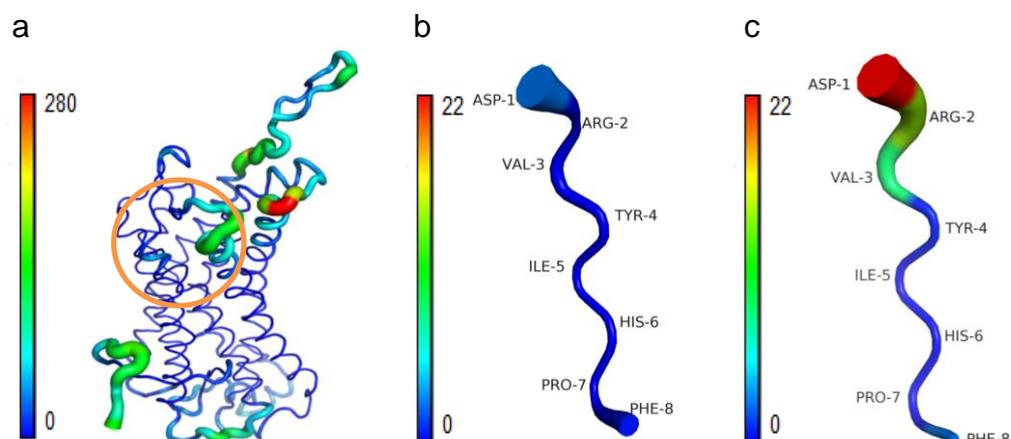


Figura 11 - Gráfico de variação de raio de giro da cadeia principal do AT1R nos eixos x (azul), y (vermelho) e z (amarelo) da caixa de simulação pelo tempo da dinâmica do complexo AT1R-AngII.



Os valores de RMSF (média do desvio quadrado médio), calculados para cada aminoácido do AT1R e da AngII após o equilíbrio do sistema e representados pelo Fator-B (Figura 12), também evidenciam uma estabilidade conformacional tanto do receptor, quanto da AngII. Para o receptor, os maiores valores do Fator-B, representando maior mobilidade, foram encontrados nas regiões de alça, enquanto que as regiões de α -hélice ou transmembrânicas permanecem bem estáveis. Para uma análise mais precisa da conformação da AngII no interior do receptor, seu RMSF e Fator-B foram calculados nos dois intervalos de tempo, entre os quais foram observadas maiores mudanças na sua posição. As maiores variações nas posições dos aminoácidos da AngII são encontradas nos dois primeiros resíduos, o que pode ser explicado pelo fato de estarem localizados mais superficialmente no receptor, interagindo com a água do meio externo. No segundo momento, entre 50 e 60 ns de simulação (Figura 12-c), há uma maior movimentação da estrutura da AngII, porém com estabilização do carboxi-terminal do peptídeo em uma posição específica, provavelmente por interagir fortemente com aminoácidos do receptor (LYS-199 e SER-105).

Figura 12 - Representação do Fator-B do AT1R no tempo de 40-60 ns (a) e da AngII nos tempos de 30-40 ns (b) e 50-60 ns (c). O círculo laranja em (a) indica a região do sítio de ligação. A escala de cores representa o grau de mobilidade dos aminoácidos durante a dinâmica, sendo o vermelho muito móvel e o azul escuro pouco móvel.

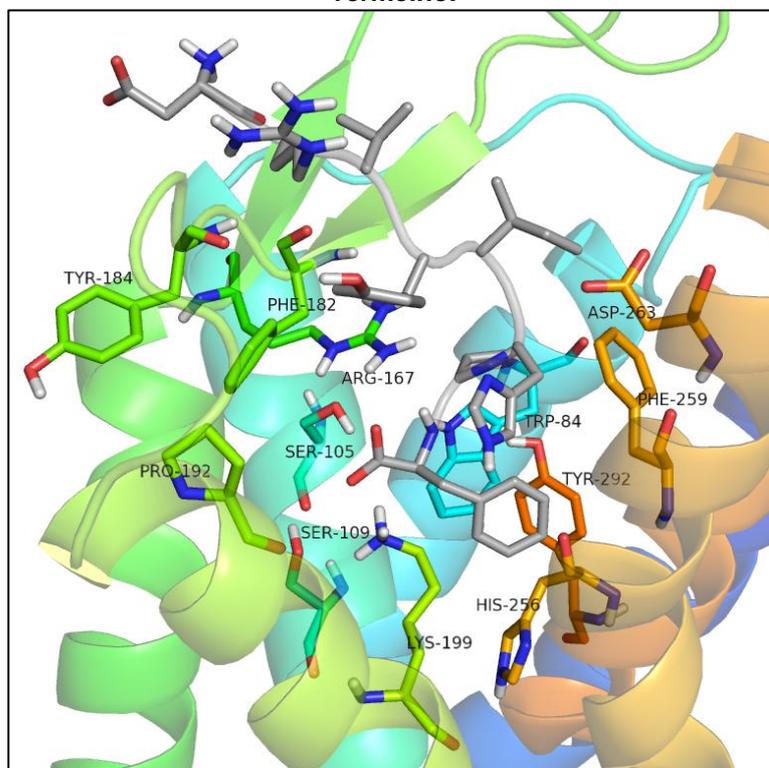


Para a seleção da conformação a partir da dinâmica molecular foi realizada uma análise de agrupamentos por RMSD, utilizando o algoritmo "gromos". Foram feitas duas análises distintas englobando o período todo de equilíbrio (30-60 ns): um agrupamento considerando apenas o RMSD da AngII, para avaliar suas diferentes conformações dentro do receptor, e outro considerando o sistema ligante-receptor como um todo. Na primeira análise, apenas da AngII, os quadros da dinâmica ficaram separados em três grupos com pouca variação interna de RMSD, sendo que o primeiro foi preponderante, com 4.928 poses, seguido de um grupo com 61 e outro com 12 poses. Essa análise de agrupamento não separou em grupos distintos os dois momentos de RMSD diferentes da AngII (Figura 8), evidenciando que a diferença da conformação entre os dois foi mínima. Na segunda análise, considerando o complexo, foram formados 43 grupos, sendo que os três mais populosos reuniram 43% da população total. Foi escolhida uma conformação de menor energia presente no primeiro grupo mais populoso da AngII isolada (primeira análise), que também estava presente no grupo mais populoso da segunda análise. A conformação da pose escolhida está representada na Figura 13.

As interações do tipo ligação de hidrogênio entre a AngII e o AT1R foram analisadas pela porcentagem de ocorrência (ocupação) e a participação dos resíduos do receptor, considerando os quadros da dinâmica após o equilíbrio (30-60 ns). Os resultados das ocupações (Figura 14) sugeriram muitas possíveis interações anteriormente reportadas entre a AngII e o receptor: ligações de hidrogênio com os resíduos de TYR-184 (FILION et al., 2013), ARG-167 (FILLION et al., 2013;

GASPARO, 2000; MATSOUKAS et al., 2013a; SPYROULIAS et al., 2003), SER-105 (GASPARO, 2000) e HIS-256. Também foi observada a interação iônica entre o grupo carboxi-terminal da AngII com a LYS-199 carregada do receptor, extensamente estudada na literatura (FILLION et al., 2013; GASPARO, 2000; LAPORTE et al., 1999; MATSOUKAS et al., 2013a; SPYROULIAS et al., 2003). Além dessas, foram notadas também possíveis interações polares da AngII com os resíduos de SER-109, ASP-263, PHE-182 e PRO-192 do AT1R.

Figura 13 - Conformação após dinâmica da AngII no AT1R. A cavidade do receptor está representada em colorido por modelo em fitas com os aminoácidos envolvidos na interação destacados em cilindro. As cadeias laterais da AngII se encontram em formato de cilindro, com os carbonos em cinza. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho.



No quadro escolhido com a análise de agrupamentos do complexo AT1R-AngII, foram identificadas interações aromáticas do tipo cátion- π entre a HIS-6 da AngII e a PHE-259 do receptor e do tipo empilhamento- π entre o anel aromático da PHE-8 da AngII e os resíduos de TRP-84 e TYR-292 do AT1R. Essas interações, bem como a distância do centróide desses grupamentos durante a dinâmica molecular (60 ns), estão representadas na Figura 15. As distâncias entre os centroides diminuíram ao decorrer da dinâmica, ficando estáveis a partir de 30 ns, mesmo tempo de estabilização do sistema.

Figura 14 – Gráfico de ocupação das ligações de hidrogênio identificadas entre o AT1R e a AngII, representada pela frequência de aparição nos quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema (30-60 ns), em relação aos resíduos do receptor envolvidos.

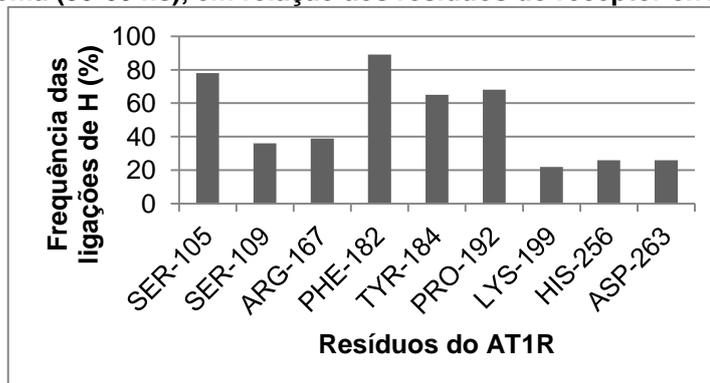
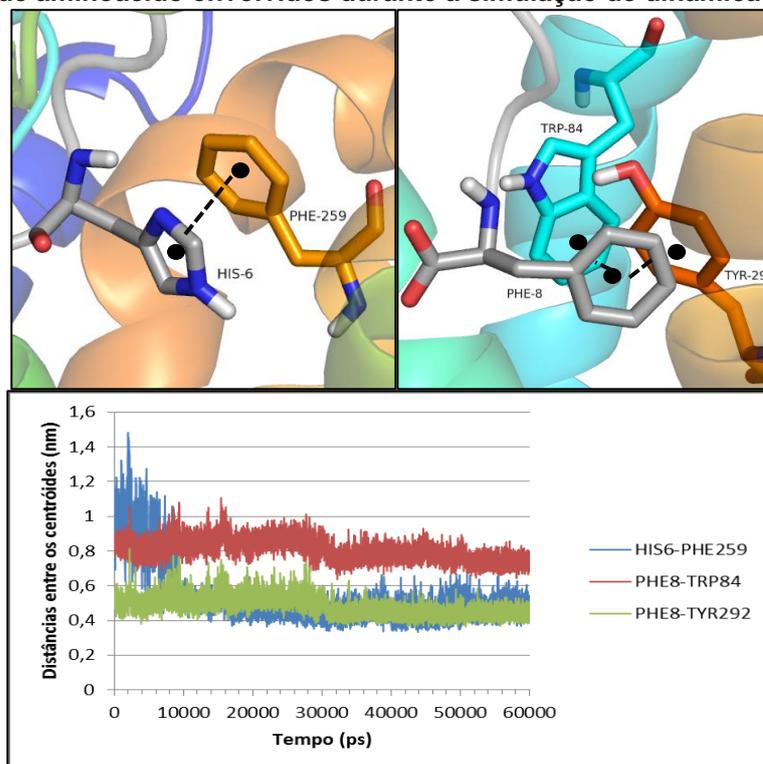


Figura 15 - Representação da interação empilhamento- π entre as HIS-6 e PHE-8 do SVdF e as PHE-259, TRP-84 e TYR-292 do AT1R, e gráfico das distâncias entre os centróides dos resíduos de aminoácido envolvidos durante a simulação de dinâmica molecular.



A forte interação iônica entre a porção carboxi-terminal da AngII e a LYS-199 do AT1R e as interações aromáticas com o resíduo PHE-8 do peptídeo também podem ser relacionadas com o baixo índice do Fator-B para o resíduo terminal do ligante, uma vez que restringem sua movimentação. A grande quantidade de interações, principalmente ligações de hidrogênio, ao longo da cadeia da AngII fornece estabilidade do ligante natural no interior do receptor, como também ilustrado pelo Fator-B, favorecendo sua interação e estabilidade.

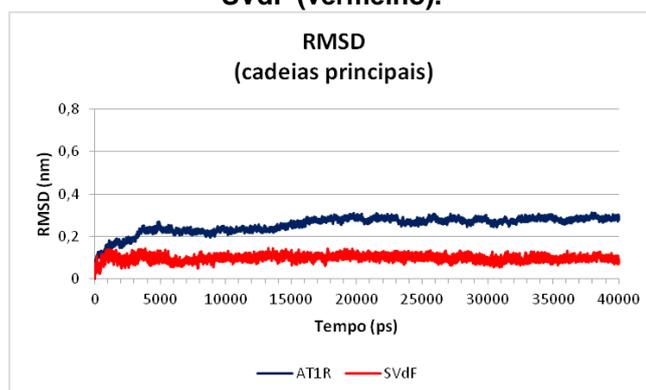
5.2.2. SVdF

O peptídeo SVdF, análogo a AngII, também é considerado um agonista pleno do AT1R uma vez que ativa as duas vias de sinalização (proteína G e β -arrestina). O SVdF foi desenhado e sobreposto, a partir das cadeias principais, à estrutura da AngII do complexo extraído da dinâmica molecular, de modo a ser inserido na cavidade do receptor de maneira semelhante ao peptídeo endógeno. O novo complexo formado foi então submetido a uma dinâmica molecular de 40 ns de acordo com o mesmo protocolo utilizado para a AngII.

A energia do sistema se manteve estável por todo o período da simulação (Figura A1.3). O sistema apresentou uma área por lipídeo de $0,75 \text{ nm}^2$, temperatura sempre próxima a 310 K ($309,98 \pm 0,90 \text{ K}$), pressão em torno de um bar ($0,01 \pm 96,23 \text{ bar}$) e densidade da água próxima ao valor real ($1014,59 \pm 1,65 \text{ kg/m}^3$) (Figura A1.4). Como discutido anteriormente, a grande variação da pressão do sistema pode ser justificada pelo tamanho da caixa de simulação ($6,9 \times 13,7 \times 11,0 \text{ nm}$) e a grande quantidade de átomos nela contida.

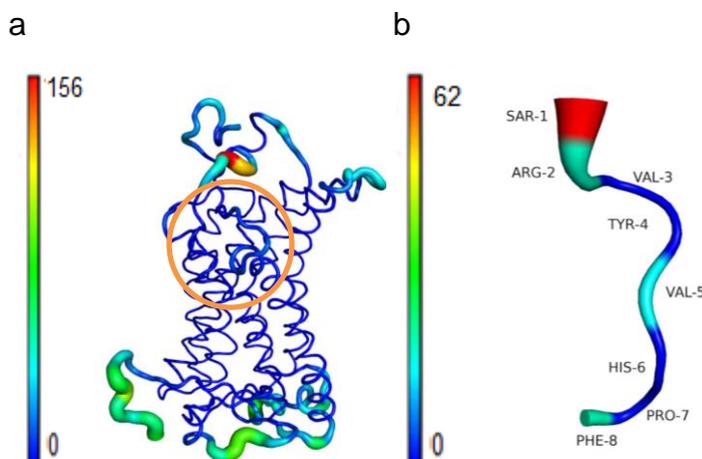
O gráfico de RMSD (Figura 16) mostra que o valor de RMSD da estrutura da cadeia principal do receptor variou abaixo do valor de 0,3 nm e ficou estável em torno de 33 ns. O raio de giro foi analisado em função do tempo e apresentou o mesmo perfil do complexo com a AngII, além de demonstrar a estabilidade da estrutura do receptor durante a dinâmica, uma vez que seu valor não teve grandes variações, evidenciando não haver mudança na compactação da proteína já inserida na bicamada lipídica (Figura A1.5). O peptídeo ligante também permaneceu estável no interior do receptor, com RMSD médio constante a partir do tempo aproximado de 10 ns da dinâmica molecular, variando em torno de 0,1 (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico de desvio quadrado médio (RMSD) da cadeia principal do AT1R (azul) e do SVdF (vermelho).



Foram calculadas também as médias dos desvios (RMSF) de cada aminoácido do AT1R e do SVdF nos últimos 5 ns de simulação (após estabilização do receptor), representado pelo Fator-B na Figura 17. A representação do receptor mostra que a sua estrutura foi muito pouco alterada nas regiões transmembrânicas e do sítio de ligação, sendo que os maiores desvios das posições ocorrem em regiões naturalmente flexíveis de alças. A representação do ligante SVdF indica uma maior movimentação durante a dinâmica molecular do início da cadeia (SAR-1), como também observado no caso da AngII. Isso era esperado, uma vez que esse aminoácido está voltado para a parte externa do receptor, envolvido pelo solvente polar do meio (água). Assim como ocorreu com a AngII, a porção final do peptídeo (HIS-6, PRO-7, PHE-8) se mostrou altamente estável por todo período de equilíbrio, por também apresentar diversas interações com o receptor, como será discutido posteriormente.

Figura 17- Representação do Fator-B do AT1R (a) e do SVdF (b), no tempo de 30-40 ns. O círculo laranja em (a) indica a região do sítio de ligação. A escala de cores representa o grau de mobilidade dos aminoácidos durante a dinâmica, sendo o vermelho muito móvel e o azul escuro pouco móvel.



O quadro da dinâmica selecionado para as análises de campos de interação molecular está representado na Figura 18. Essa seleção foi realizada pela análise de agrupamentos por RMSD das conformações apenas do peptídeo, no interior do receptor, após a estabilização do sistema (35-40 ns). Nessa análise, os quadros dos últimos 5 ns foram separados em 8 grupos, sendo que o primeiro deles continha 91% das estruturas totais. Foi selecionado o quadro que representava a média de RMSD do primeiro grupo. Paralelamente, foi realizada outra análise de agrupamentos, pelo mesmo protocolo, do complexo AT1R-SVdF, a fim de verificar

se o quadro escolhido também era representativo do receptor. Nessa etapa, foram gerados 7 grupos, com o primeiro contendo 85% do total de quadros. Verificou-se que a conformação escolhida na primeira análise estava presente no grupo mais populoso da segunda análise, sendo, portanto, representativa.

A análise das interações de ligação de hidrogênio entre o SVdF e o receptor foi realizada levando-se em consideração o período de equilíbrio da dinâmica (35-40 ns) e a porcentagem de ocorrência com participação dos resíduos do AT1R. O resultado das interações observadas com ocorrência de 20% ou mais do total de quadros está representado na Figura 19. Foram analisadas também as interações aromáticas no único quadro selecionado pelo agrupamento, bem como a distância entre os resíduos envolvidos durante a dinâmica molecular (Figura 20).

Figura 18 - Conformação após dinâmica do SVdF no AT1R. A cavidade do receptor está representada em colorido por modelo em fitas com os aminoácidos envolvidos na interação destacados em cilindro. As cadeias laterais do SVdF se encontram em formato de cilindro, com os carbonos em cinza. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho.

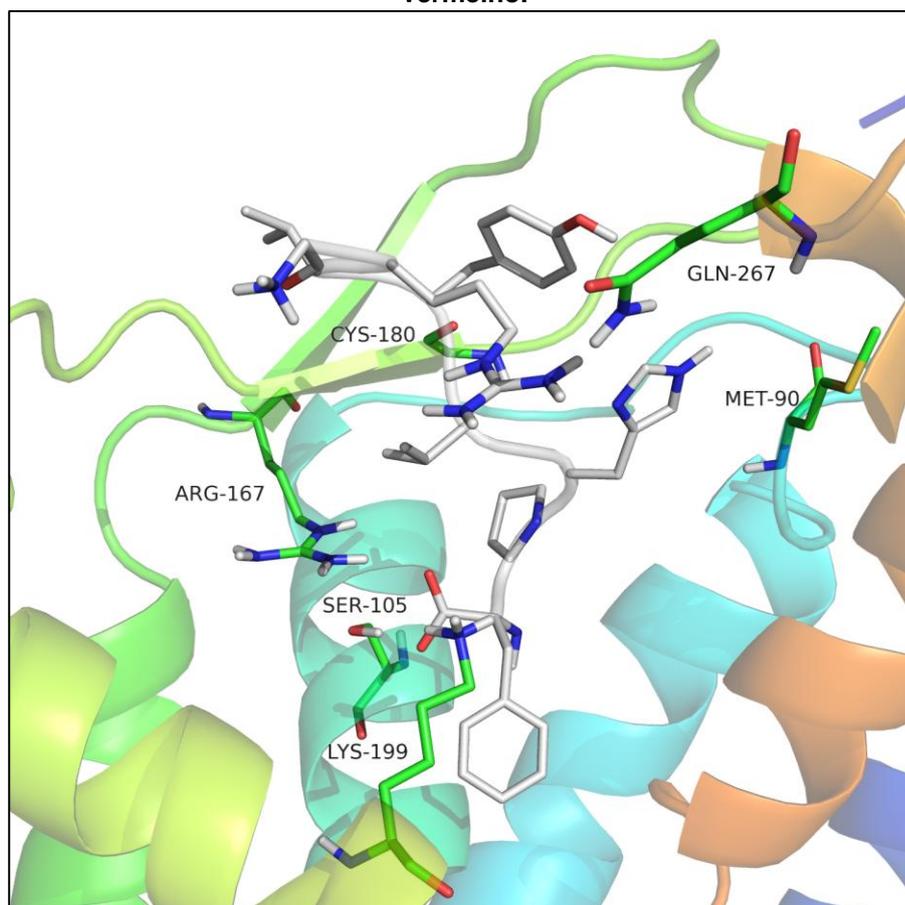
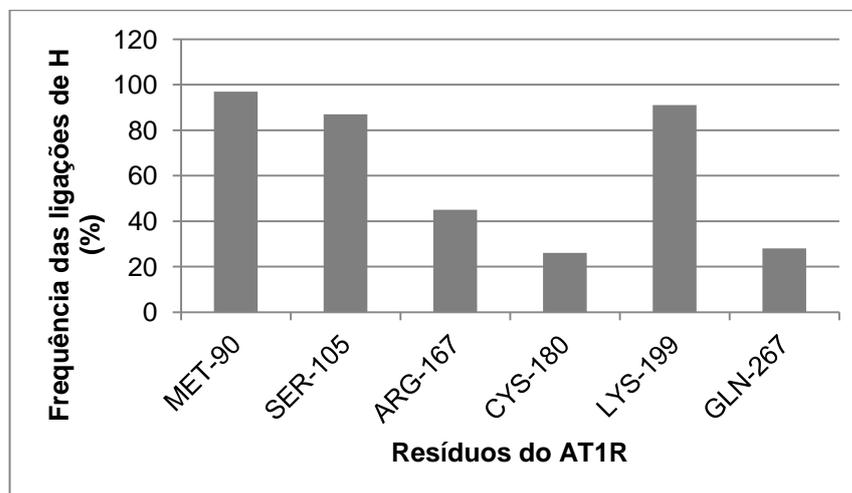
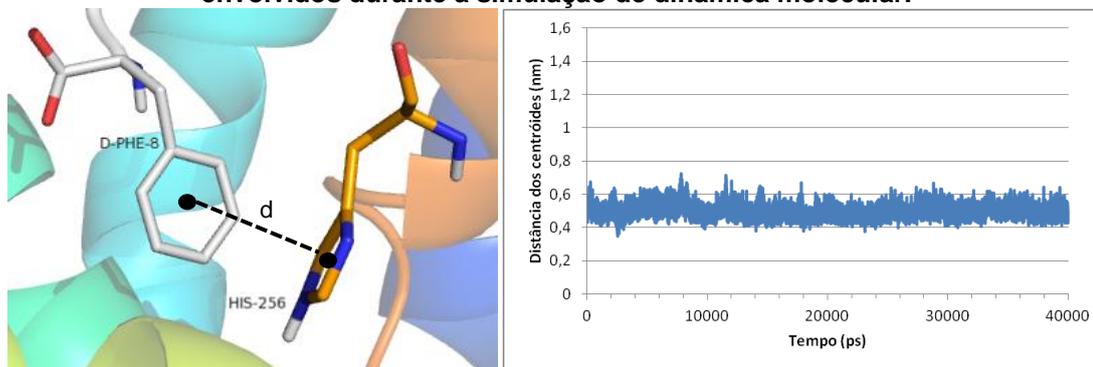


Figura 19 – Gráfico de ocupação das ligações de hidrogênio identificadas entre o AT1R e o SVdF, representada pela frequência de aparição nos quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema (35-40 ns), em relação aos resíduos do receptor envolvidos.



Foi possível observar nove prováveis resíduos do AT1R envolvidos em ligações de hidrogênio com o ligante (Figura 19), dos quais quatro também foram observados no complexo com a AngII (SER-105, ARG-167, e LYS-199), além da interação iônica entre o carboxi-terminal do SVdF com a LYS-199. Foi evidenciada também a presença de uma interação do tipo empilhamento-T entre a PHE-8 do ligante com a HIS-256 do receptor, resíduo citado como ponto importante de interação de peptídeos agonistas do AT1R (Figura 20) (LAPORTE et al., 1999). Apesar dessa interação não ter sido observada no caso da AngII, a HIS-256 também possui sua movimentação restrita no primeiro caso, uma vez que realiza ligação de hidrogênio com a HIS-6 do peptídeo endógeno. Na visualização dos resultados da dinâmica e das interações, ficou evidenciado, também, o importante papel do último resíduo do ligante (D-PHE-8). Assim como foi observado no complexo AT1R-AngII, a grande estabilidade da porção final do SVdF é devida, provavelmente, às várias ligações de hidrogênio realizadas entre o carboxil-terminal e os resíduos de LYS-199, SER-105 e ARG-167, bem como à interação aromática do resíduo D-PHE-8.

Figura 20 – Representação da interação empilhamento-T entre a D-PHE-8 do SVdF e a HIS-256 do AT1R e gráfico da distância entre os centros dos dois resíduos de aminoácido envolvidos durante a simulação de dinâmica molecular.



5.2.3. TRV120027

O peptídeo com ação enviesada TRV120027, depois de desenhado, foi sobreposto à estrutura da AngII do complexo extraído da dinâmica molecular de modo semelhante a do peptídeo anterior. O complexo AT1R–TRV120027 foi então submetido a uma dinâmica molecular de 40 ns seguindo o mesmo protocolo utilizado anteriormente. O sistema se manteve estável por todo o período da simulação (Figura A1.6), com parâmetros com valores próximos aos de referência.

O sistema apresentou uma área por lipídeo de $0,75 \text{ nm}^2$, a temperatura se manteve em torno de 310 K ($309,98 \pm 0,90 \text{ K}$), a pressão oscilou em torno de um bar ($0,01 \pm 96,23 \text{ bar}$) e a densidade da água do meio ficou próxima ao valor real ($1014,59 \pm 1,65 \text{ kg/m}^3$) (Figura A1.7). Como discutido anteriormente, a grande variação da pressão do sistema pode ser justificada pelo tamanho da caixa de simulação ($6,9 \times 13,7 \times 11,0 \text{ nm}$) e a grande quantidade de átomos nela contida (71155).

Os gráficos de RMSD (Figura 21) e de raio de giro (Figura A1.8) mostram que a estrutura do receptor não sofreu grandes alterações e se manteve estável durante o tempo de simulação. O RMSD da estrutura do receptor variou em torno de 0,3 nm, ficando estável a partir de 27 ns. É possível observar um pequeno aumento de desvio ao final da dinâmica que, ao ser analisado, não se mostrou de grande importância, pois foi causado por mudanças de posição de resíduos de aminoácidos presentes em regiões de alça altamente flexíveis. O raio de giro foi analisado em função do tempo e apresentou o mesmo perfil do complexo com a AngII, além de demonstrar a estabilidade da estrutura do receptor durante a dinâmica, uma vez que seu valor não

teve grandes variações, evidenciando não haver mudança na compactação da proteína já inserida na bicamada lipídica.

Foram calculadas também as médias dos desvios (RMSF) de cada aminoácido do AT1R e do TRV120027 nos últimos 10ns de simulação (após estabilização), representado pelo Fator-B na Figura 22. A representação do receptor mostra que a sua estrutura não foi alterada nas regiões transmembrânicas, sendo que os maiores desvios das posições ocorrem em regiões naturalmente flexíveis. Já o peptídeo TRV120027, apesar de não ter sofrido grandes alterações, com Fator-B máximo no valor de 30, apresenta um perfil de estabilidade conformacional muito diferente da AngII no interior do receptor. A principal diferença observada foi o aumento do Fator-B na região do aminoácido terminal que, no TRV120027, corresponde à D-ALA-8. O resíduo terminal no TRV120027 sofre maior movimentação, provavelmente em função das interações aromáticas com o resíduo terminal do ligante não serem possíveis nesse caso.

Figura 21 - Gráfico de desvio quadrado médio (RMSD) da cadeia principal do AT1R (azul) e do TRV120027 (vermelho).

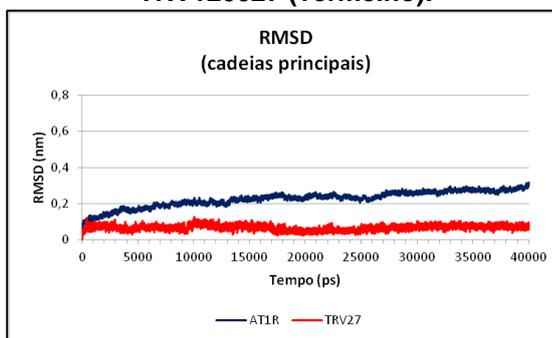
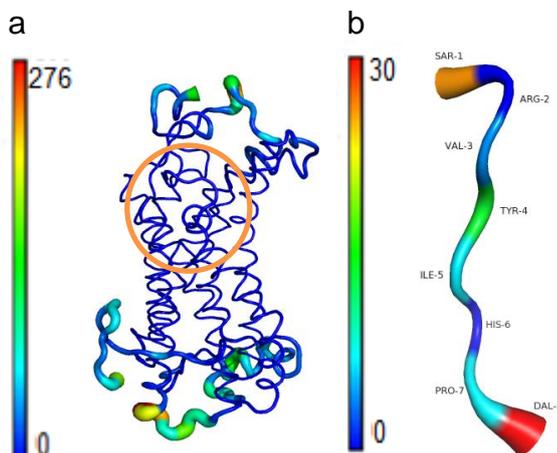


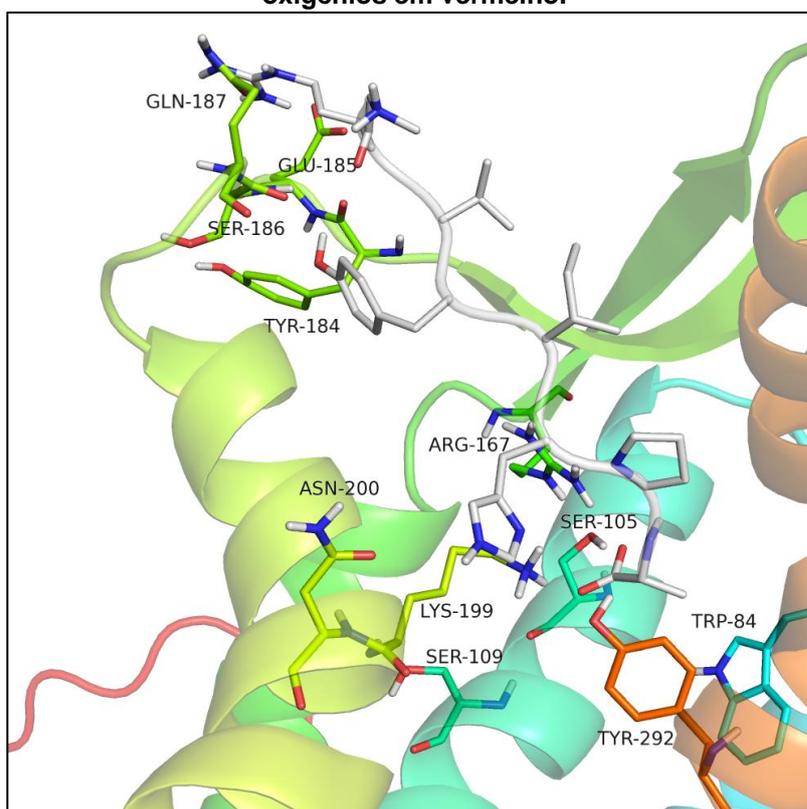
Figura 22 - Representação do Fator-B do AT1R (a) e do TRV120027 (b), no tempo de 20-40 ns. O círculo em laranja em (a) indica a região do sítio de ligação. A escala de cores representa o grau de mobilidade dos aminoácidos durante a dinâmica, sendo o vermelho muito móvel e o azul escuro pouco móvel.



A seleção da conformação para estudo posterior foi realizada a partir de uma análise de agrupamentos por RMSD, utilizando o algoritmo "gromos", dos quadros gerados a partir da estabilização das estruturas (10ns). Primeiramente foi realizada uma separação levando em consideração apenas a estrutura do TRV120027 e utilizando um valor de corte de 0,8 Å do RMSD, diferente do realizado para os outros peptídeos, de modo a gerar melhor separação de grupos. Nessa análise, foram gerados três grupos, sendo que o primeiro deles englobou 99% das conformações. Em seguida foi feita uma segunda separação com o complexo AT1R-TRV120027 como um todo. Na segunda análise foram encontrados 12 grupos, dos quais o primeiro era composto por 58% do total de quadros.

Foi extraído da trajetória um quadro central, com RMSD médio, presente no primeiro grupo da primeira análise, presente também no primeiro grupo da separação em que foi considerado todo complexo. A conformação escolhida está representada na Figura 23 e foi utilizada posteriormente para o estudo dos campos de interação moleculares.

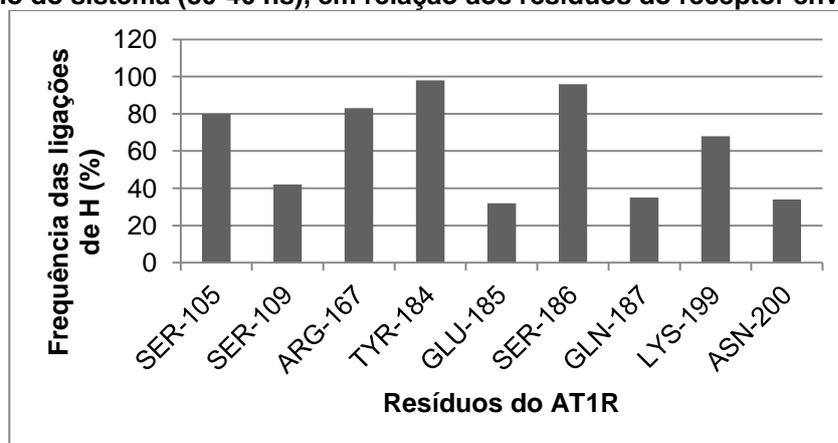
Figura 23 - Conformação após dinâmica do TRV120027 no AT1R. A cavidade do receptor está representada em colorido por modelo em fitas com os aminoácidos envolvidos na interação destacados em cilindro. As cadeias laterais do TRV120027 se encontram em formato de cilindro, com os carbonos em cinza. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho.



As ligações de hidrogênio observadas durante a dinâmica molecular e suas ocupações estão representadas na Figura 24. Algumas interações entre o peptídeo e o receptor foram mantidas em relação às interações da AngII e do SVdF, como as ligações de hidrogênio com os resíduos de ARG-167 e SER-105 e a interação iônica entre a LYS-199 e o carboxi-terminal do TRV120027. Também puderam ser observadas ligações de hidrogênio entre o ligante e os resíduos de aminoácidos SER-109, TYR-184, GLU-185, SER-186 e GLN-187 do AT1R.

Nenhuma interação aromática foi observada para o complexo do TRV12027 com o receptor. Inclusive, as interações aromáticas antes presentes entre a PHE-8 da AngII e a D-PHE-8 do SVdF e resíduos do receptor, que não ocorrem com o TRV120027 por ele possuir uma D-Alanina no lugar da fenilalanina, podem ser as responsáveis por deixar a porção terminal do ligante mais livre no interior do receptor, como evidenciado na representação do Fator-B (Figura 22).

Figura 24 – Gráfico de ocupação das ligações de hidrogênio identificadas entre o AT1R e o TRV120027, representada pela frequência de aparição nos quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema (30-40 ns), em relação aos resíduos do receptor envolvidos.



Essas pequenas diferenças nas interações causadas pela composição do peptídeo ligante podem ser responsáveis pelo tipo de ação enviesada do TRV120027, uma vez que são capazes de levar o receptor a uma conformação distinta. As diferenças entre o perfil de interação dos agonistas plenos e enviesados foram analisadas posteriormente, após a dinâmica molecular de todos os complexos.

5.2.4. TRV120023

Foi realizada uma simulação de dinâmica molecular de 40 ns do complexo AT1R-TRV120023 após a sobreposição do peptídeo análogo à estrutura da AngII no

interior do receptor. O sistema submetido à simulação apresentou energia estável durante todo o período (Figura A1.9), área por lípideo de 0,75 nm² e valores de temperatura, pressão e densidade próximos aos de referência: 309,98 ± 0,91 K, 1,04 ± 96,67 bar e 1015,30 ± 1,68 kg/m³ respectivamente (Figura A1.10).

Como pode ser constatado pelos gráficos de RMSD (Figura 25) e de raio de giro (Figura A1.11) do complexo AT1R-TRV120023, o receptor permaneceu estável, sem grandes alterações de estrutura, durante a simulação. O RMSD da estrutura do AT1R estabilizou a partir de aproximadamente 30 ns em torno de 0,3 nm. O raio de giro manteve o mesmo perfil das outras simulações, evidenciando não haver mudança na compactação da proteína já inserida na bicamada lipídica. O ligante TRV120023 apresentou uma variação de RMSD abaixo de 0,2 nm, ficando constante a partir de 10 ns.

Figura 25 - Gráfico de desvio quadrado médio (RMSD) da cadeia principal do AT1R (azul) e do TRV120023 (vermelho).

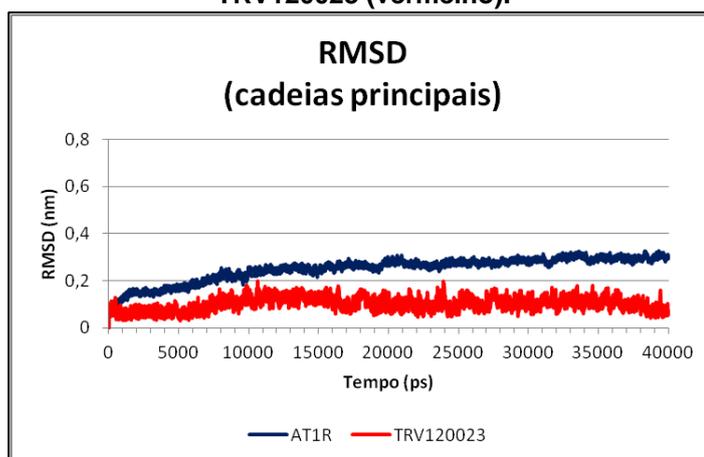
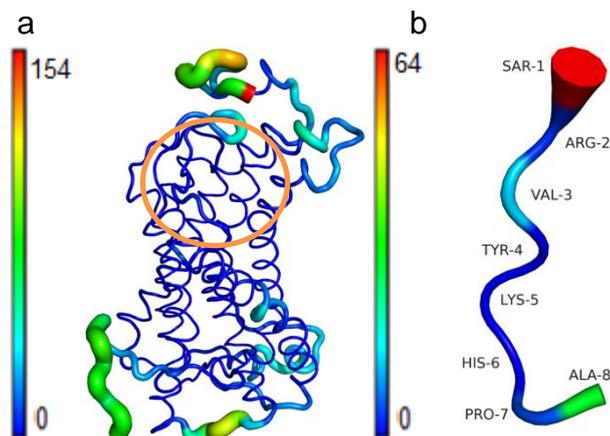


Figura 26 - Representação do Fator-B do AT1R (a) e do TRV120023 (b), no tempo de 30-40 ns. O círculo laranja em (a) indica a região do sítio de ligação. A escala de cores representa o grau de mobilidade dos aminoácidos durante a dinâmica, sendo o vermelho muito móvel e o azul escuro pouco móvel.



As médias dos desvios (RMSF) das estruturas do AT1R e do TRV120023 foram calculadas para o tempo em que o sistema se encontrava em equilíbrio (30-40 ns) e estão representadas pelo Fator-B na Figura 26 é possível notar pela representação que a estrutura do receptor se manteve estável nas regiões transmembrânicas e do sítio de ligação, com baixos valores de Fator-B. O ligante TRV120023 obteve Fator-B máximo de 64, evidenciando poucas variações em sua posição no interior do receptor. A maior movimentação foi observada no primeiro resíduo (SAR-1), como ocorreu para os outros peptídeos, por ele estar direcionado ao meio externo. O último resíduo do ligante (ALA-8) também apresentou uma variação de posição, como foi visto para o TRV120027 em complexo com o AT1R. Como ocorre no TRV120027, o peptídeo TRV120023 também não possui resíduo aromático na porção terminal, não realizando, portanto, interações aromáticas com o receptor, o que pode deixar essa porção mais livre no espaço, resultando em um maior Fator-B.

Após a simulação de dinâmica molecular, foi selecionada uma conformação do complexo para posteriores estudos a partir de análises de agrupamentos hierárquicos por RMSD dos quadros da dinâmica a partir de sua estabilização (30-40 ns). Foi realizada uma primeira análise de separação levando em consideração apenas a conformação do TRV120023. Desse passo, resultaram seis grupos, dos quais o primeiro mais populoso continha 95% do total de quadros. Em uma segunda análise, considerando o RMSD do complexo AT1R-TRV120023, foram separados 11 grupos, com o primeiro contendo mais da metade dos quadros. Foi selecionado o quadro com RMSD central do primeiro grupo da primeira análise, e que também estava contido no primeiro grupo da segunda análise. A estrutura escolhida está ilustrada na Figura 27.

As ligações de hidrogênio realizadas entre o ligante e o receptor foram analisadas pelo cálculo de suas ocupações, em porcentagem de quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema, e os resíduos de aminoácido do AT1R envolvidos. Tais resultados podem ser observados na Figura 28. É possível notar interações que apareceram também na análise dos outros três complexos anteriores, como as ligações de hidrogênio com os resíduos de PHE-182, ARG-167 e SER-105 e a interação iônica entre a LYS-199 e o carboxi-terminal do peptídeo ligante. Também puderam ser observadas ligações de hidrogênio entre o

TRV120023 e os resíduos de aminoácidos SER-109, ALA-163, GLU-185, TYR-184, ASP-263 e ASN-174 do AT1R.

Figura 27 - Conformação após dinâmica do TRV120023 no AT1R. A cavidade do receptor está representada em colorido por modelo em fitas com os aminoácidos envolvidos na interação destacados em cilindro. As cadeias laterais do TRV120023 se encontram em formato de cilindro, com os carbonos em cinza. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho.

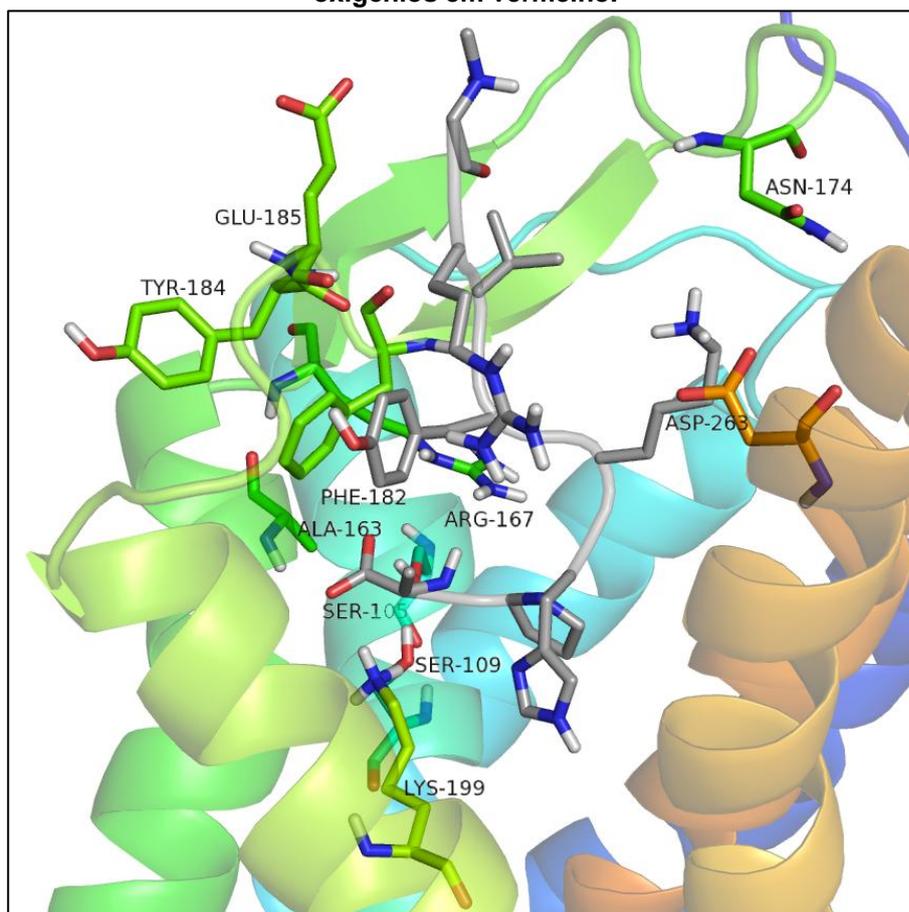
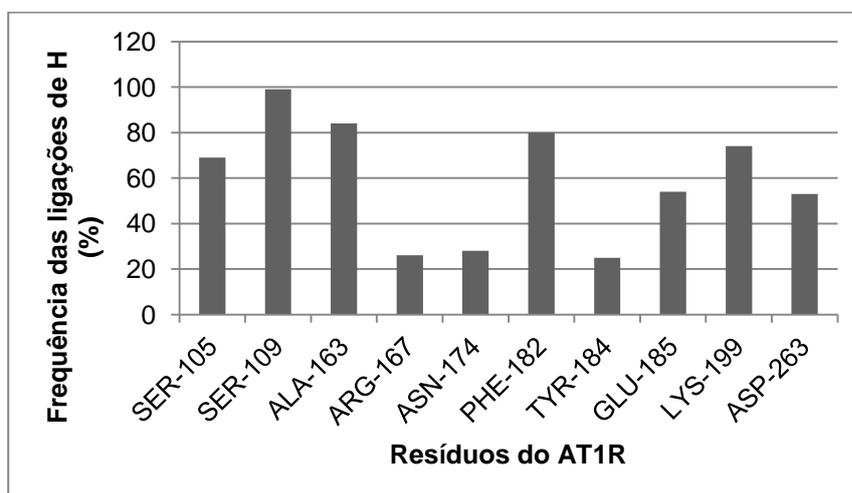


Figura 28 – Gráfico de ocupação das ligações de hidrogênio identificadas entre o AT1R e o TRV120023, representada pela frequência de aparição nos quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema (30-40 ns), em relação aos resíduos do receptor envolvidos.



Assim como observado no caso do outro agonista enviesado (TRV120027), não foram encontradas interações com porções aromáticas do resíduo de aminoácido terminal com o receptor, uma vez que o TRV120023 também não possui porções aromáticas nessa região da molécula. No entanto, foi possível notar uma interação aromática do tipo empilhamento- π entre a TYR-4 do ligante com a PHE-182 do AT1R. A distância dessa interação não foi monitorada ao decorrer da dinâmica, pois ela não foi observada nos outros agonistas enviesados, nem com agonistas plenos, não se mostrando de grande importância.

5.2.5. SII

O peptídeo SII também apresenta atividade enviesada para β -arrestina frente ao AT1R, porém com menor afinidade ao receptor. O peptídeo SII desenhado foi sobreposto à estrutura da AngII extraída da dinâmica molecular e o complexo AT1R–SII submetido à dinâmica molecular de 40 ns de acordo com o protocolo descrito anteriormente. A energia do sistema se manteve estável por todo o período da simulação (Figura A1.12), apresentando uma área por lipídeo de $0,74 \text{ nm}^2$.

A temperatura durante a simulação ficou em torno de 310 K ($309,98 \pm 0,91 \text{ K}$), a pressão oscilou em torno de um bar ($2,25 \pm 96,70 \text{ bar}$) e a densidade da água ficou próxima ao valor real ($1015,38 \pm 1,66 \text{ kg/m}^3$) (Figura A1.13). As dimensões da caixa de simulação foram iguais às anteriores: $6,9 \times 13,7 \times 11,0 \text{ nm}$.

O RMSD da estrutura do receptor estabilizou a partir de aproximadamente 25 ns de simulação, passando a variar em torno de 0,3 nm de forma constante, o que indica a estabilidade da estrutura do mesmo (Figura 29). Já o desvio da estrutura do peptídeo SII se manteve constante abaixo de 0,1 nm, evidenciando sua grande estabilidade no interior do receptor (Figura 29). O raio de giro do AT1R em função do tempo também apresentou o mesmo perfil dos complexos anteriores (Figura A1.14). Assim como o raio de giro do receptor em complexo com os peptídeos análogos à AngII, seu valor não apresentou grandes variações, evidenciando estabilidade no empacotamento de sua estrutura

As médias dos desvios (RMSF) de cada aminoácido do AT1R e do SII foram calculadas após a estabilização do sistema (considerada após 25 ns) e estão representadas pelo Fator-B na Figura 30. Pela figura é possível observar a estabilidade do receptor nas regiões transmembrânicas e do sítio de ligação e a

maior movimentação das regiões de alças, o que era esperado. O peptídeo SII também não sofre grandes desvios na posição de seus aminoácidos, tendo um valor máximo de Fator-B de 15. O maior desvio observado no SII ocorreu em sua porção terminal (ILE-8), resultando em um perfil de movimentação contrário ao da AngII, bem como nos casos dos outros agonistas enviesados. A ILE-8 terminal do SII também não apresenta porção aromática, não realizando interações aromáticas com resíduos do receptor, o que leva a sua menor estabilização.

Figura 29 - Gráfico de desvio quadrado médio (RMSD) da cadeia principal do AT1R (azul) e do SII (vermelho).

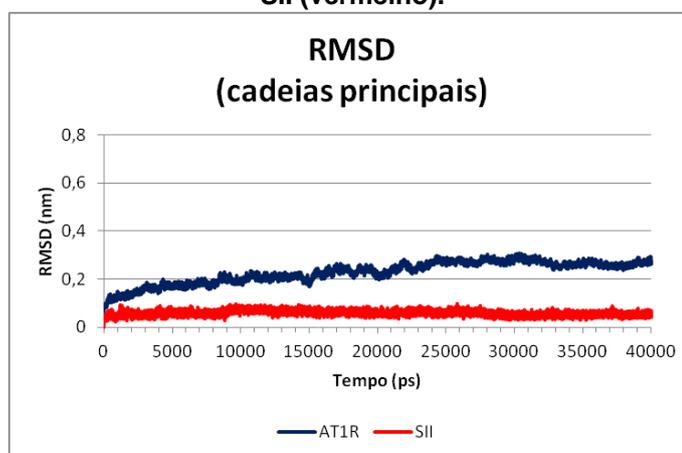
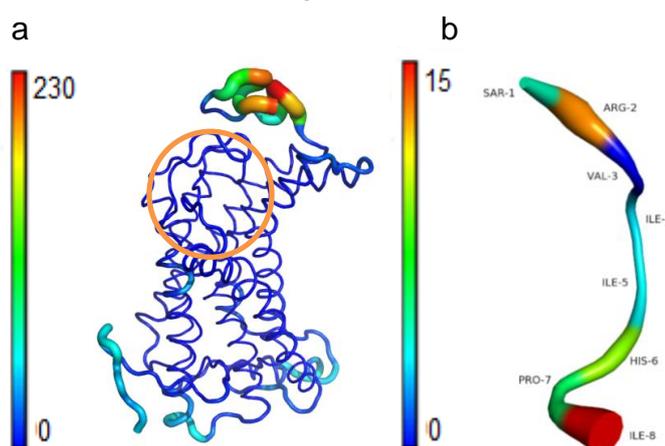


Figura 30 - Representação do Fator-B do AT1R (a) e do SII (b), no tempo de 25-40 ns. O círculo laranja em (a) indica a região do sítio de ligação. A escala de cores representa o grau de mobilidade dos aminoácidos durante a dinâmica, sendo o vermelho muito móvel e o azul escuro pouco móvel.

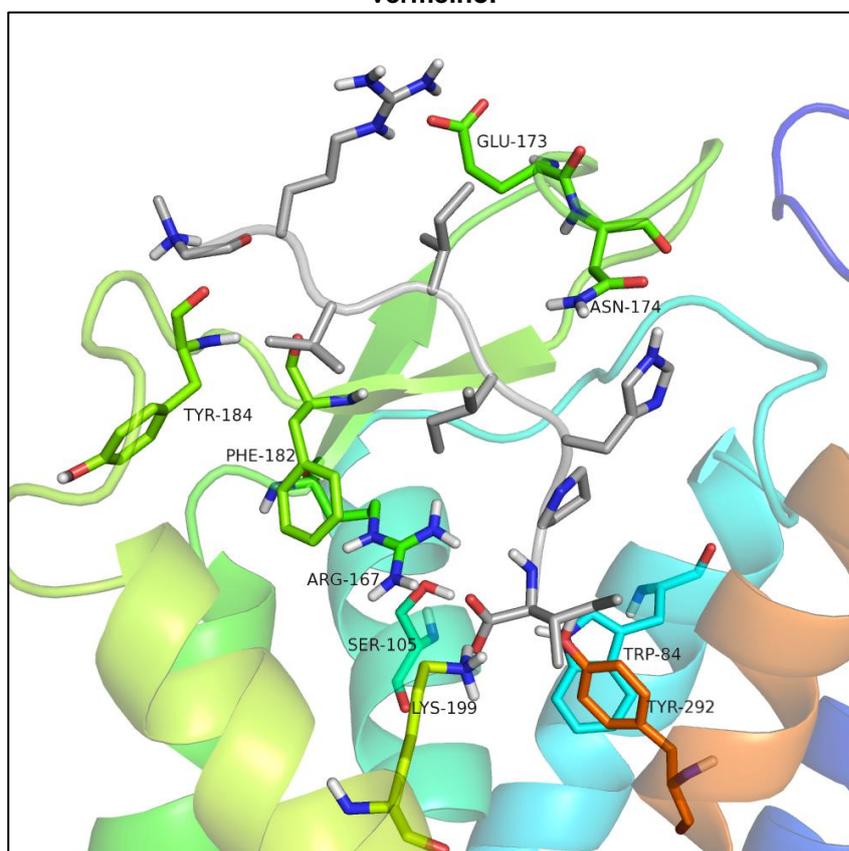


A conformação do SII e do receptor para estudo posterior foram selecionadas a partir de análises de agrupamentos por RMSD dos quadros gerados na dinâmica molecular a partir de 25 ns (estabilização do sistema). A primeira análise foi realizada sendo considerada apenas a estrutura do SII. Nessa primeira etapa, os quadros foram separados em 5 grupos, com o primeiro deles contendo 99% do total.

Em seguida foi feita a segunda separação considerando o complexo AT1R-SII inteiro, na qual foram encontrados 27 grupos, dos quais os dois primeiros compreenderam mais da metade dos quadros.

Foi extraído da trajetória um quadro central, com RMSD médio, presente no primeiro grupo da primeira análise, presente também no primeiro grupo da separação em que foi considerado todo complexo. A conformação escolhida, representada na Figura 31, foi utilizada posteriormente para a análise dos campos de interação moleculares e geração do farmacóforo.

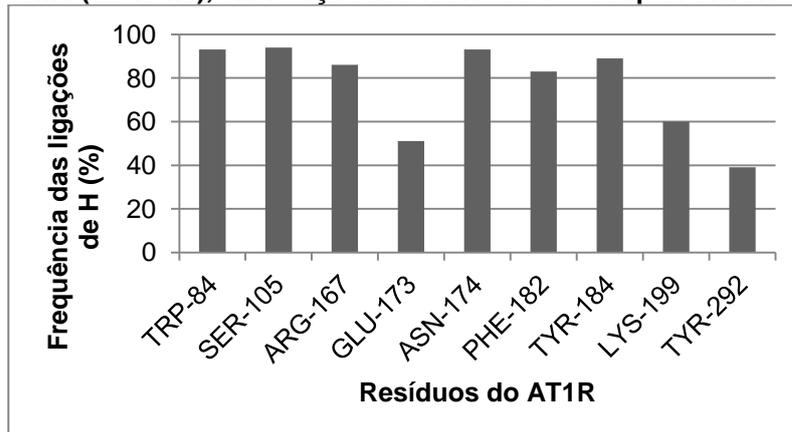
Figura 31 - Conformação após dinâmica do SII no AT1R. A cavidade do receptor está representada em colorido por modelo em fitas com os aminoácidos envolvidos na interação destacados em cilindro. As cadeias laterais do SII se encontram em formato de cilindro, com os carbonos em cinza. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho.



Foram analisadas as ligações de hidrogênio realizadas entre o SII e o receptor pelo cálculo de suas ocupações a partir do equilíbrio do sistema. As frequências dessas interações e os resíduos de aminoácido do AT1R envolvidos estão representados na Figura 32. Podem ser observadas interações polares entre o SII e os aminoácidos PHE-182, ARG-167, SER-105 e LYS-199 do receptor, que também estão presentes na interação do mesmo com os outros quatro ligantes

anteriores. As interações observadas entre o SII e os resíduos TRP-84, ASN-174 e TYR-292 do receptor também surgiram para os outros dois agonistas enviados. No entanto, o SII também realizou ligação de hidrogênio com o GLU-173, que não foi observada em nenhum dos outros quatro complexos.

Figura 32 – Gráfico de ocupação das ligações de hidrogênio identificadas entre o AT1R e o SII, representada pela frequência de aparição nos quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema (30-40 ns), em relação aos resíduos do receptor envolvidos.



Assim como no caso dos outros agonistas enviados, não ocorre interação do tipo empilhamento- π entre o aminoácido terminal da cadeia do SII com o receptor. É possível que, em função disso, a porção terminal do ligante tenha maior liberdade de movimentação comparado à AngII, o que pode ser constatado na representação do desvio médio (Figura 30).

O perfil de interação do SII com o receptor apresentou semelhanças em relação aos outros ligantes enviados, com uma menor estabilização da porção terminal do peptídeo pela falta da interação aromática. Além disso, foram observadas muitas interações do SII com o AT1R que também estiveram presentes nos outros complexos analisados, o que pode explicar a ligação desse peptídeo.

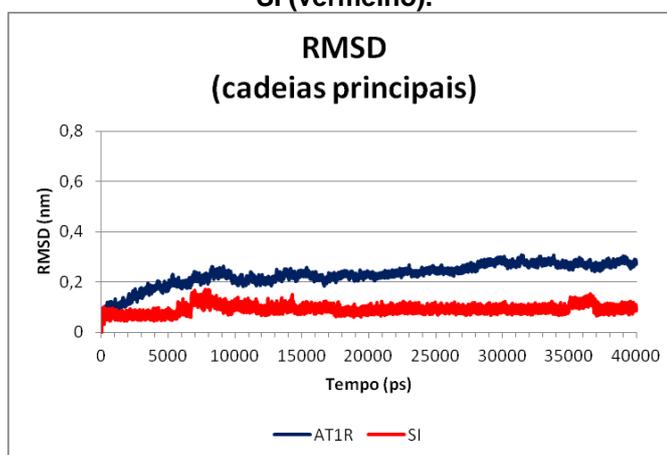
5.2.6. SI

O peptídeo SI, como o TRV120027, TRV120023 e o SII, também possui atividade agonista enviada ao se ligar no AT1R. Como os demais, o SI foi desenhado e sobreposto, a partir do alinhamento das cadeias principais, à estrutura da AngII no interior do receptor. Em seguida, o novo complexo foi submetido à simulação de dinâmica molecular de 40 ns seguindo o mesmo protocolo.

A energia do sistema se manteve constante durante todo o processo (Figura A1.15), a área por lipídeo da bicamada de POPC foi de $0,75 \text{ nm}^2$, e os outros parâmetros ficaram estáveis e próximos ao valor de referência. A temperatura se manteve próxima a temperatura fisiológica de 310 K ($309,98 \pm 0,91$), a pressão variou com média próxima a 1 bar ($0,02 \pm 96,7$) e a densidade teve valor próxima a da água ($1014,94 \pm 1,7$) (Figura A1.16). A caixa de simulação tinha as dimensões de $6,9 \times 13,7 \times 11,0 \text{ nm}$, o que, como explicado anteriormente, explica a alta variação do valor da pressão do sistema.

O gráfico de RMSD das estruturas do AT1R e do SI mostra o equilíbrio do sistema a partir do tempo de 30 ns . Após a estabilização, o RMSD do receptor passou a variar entre $0,2$ e $0,3 \text{ nm}$, enquanto que a estrutura do ligante se manteve estável no interior do receptor, com RMSD variando em torno de $0,1 \text{ nm}$ (Figura 33). O raio de giro do AT1R em função do tempo também apresentou o mesmo perfil dos complexos anteriores, evidenciando estabilidade do empacotamento da proteína (Figura A1.17).

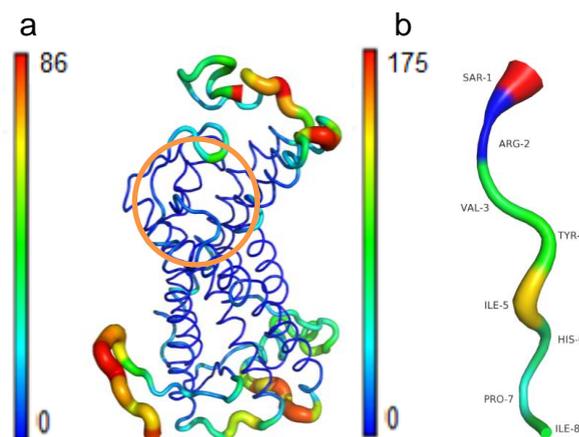
Figura 33 - Gráfico de desvio quadrado médio (RMSD) da cadeia principal do AT1R (azul) e do SI (vermelho).



Também foram analisadas as médias do desvio (RMSF) de cada resíduo do receptor e do SI após a estabilização do sistema ($30\text{-}40 \text{ ns}$). A representação do RMSF pelo Fator-B (Figura 34) evidencia a estabilidade da estrutura do receptor nas porções transmembrânicas e do sítio de ligação. Além disso, a representação do peptídeo SI mostra uma alta movimentação do mesmo durante os últimos 10 ns de simulação, com altos valores de Fator-B. Apesar disso, notou-se um perfil de estabilidade do ligante semelhante aos casos anteriores, com maior liberdade do primeiro resíduo (SAR-1), que se encontra exposto ao solvente. Comparativamente

ao resto da molécula, o resíduo terminal do SI (ILE-8) se manteve mais estável, porém apresentou mobilidade semelhante aos outros peptídeos enviesados em números absolutos, não sendo estabilizado por nenhuma interação aromática.

Figura 34 - Representação do Fator-B do AT1R (a) e do SII (b), no tempo de 30-40 ns. O círculo laranja em (a) indica a região do sítio de ligação. A escala de cores representa o grau de mobilidade dos aminoácidos durante a dinâmica, sendo o vermelho muito móvel e o azul escuro pouco móvel.



Para a seleção do quadro da dinâmica contendo o complexo AT1R-SI que guiou os estudos posteriores, foi utilizada a mesma análise descrita anteriormente de agrupamentos hierárquicos por RMSD. Em uma primeira análise, as estruturas do SI presentes nos quadros da dinâmica após a estabilização (30-40 ns) foram comparadas e separadas em 4 grupos, dos quais o mais populoso representava 90% do total. Foi selecionado o quadro que continha a estrutura do SI com RMSD médio desse grupo. Em uma segunda análise, na qual foi considerado o complexo do ligante com o receptor, foram gerados 12 grupos, dos quais o mais populoso continha 48% dos quadros. A estrutura selecionada, representada na Figura 35, além de representar a média do primeiro grupo da primeira análise, também estava presente no grupo mais populoso da segunda, evidenciando sua alta representatividade.

O estudo das ocupações das ligações de hidrogênio calculadas para os últimos 10 ns de simulação (equilíbrio), ilustrado na Figura 36, mostrou interações entre o receptor e o SI semelhantes aos outros complexos, com a participação da SER-109, ARG-167, TYR-184, GLU-185 e da LYS-199 do AT1R. Foram observadas também interações presentes nos outros complexos com agonistas enviesados anteriores, com o envolvimento dos resíduos de GLU-173, ASN-174 e TYR-292. O

SI apresentou uma baixa porcentagem de interação com a TYR-87 do AT1R, não observada em nenhum outro caso anterior.

Figura 35 - Conformação após dinâmica do SI no AT1R. A cavidade do receptor está representada em colorido por modelo em fitas com os aminoácidos envolvidos na interação destacados em cilindro. As cadeias laterais do SI se encontram em formato de cilindro, com os carbonos em cinza. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho.

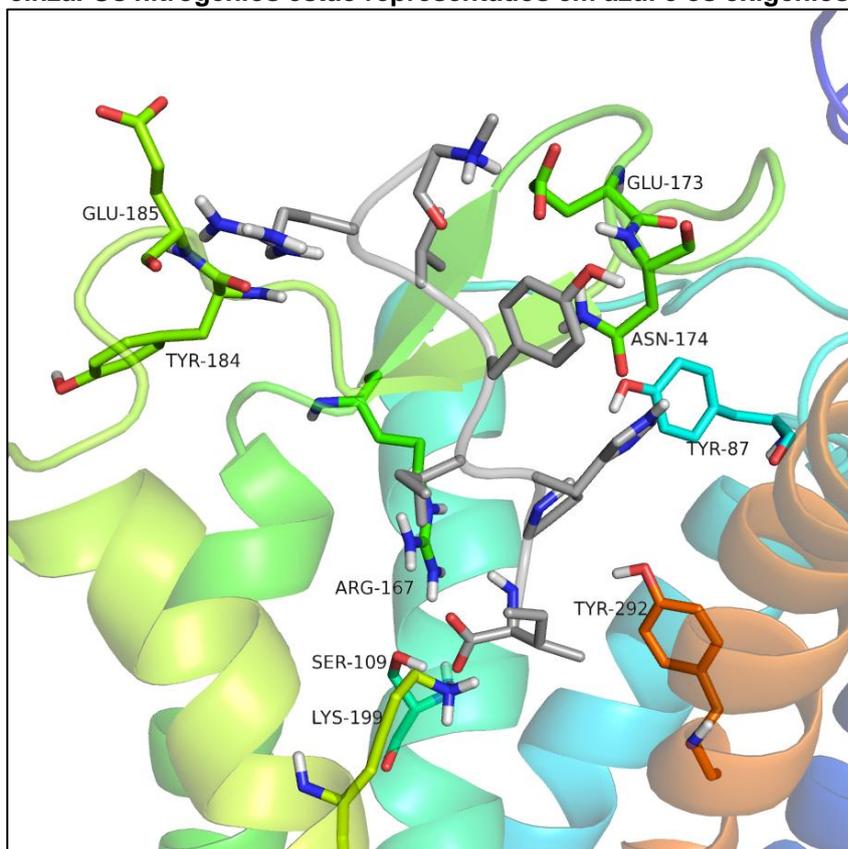
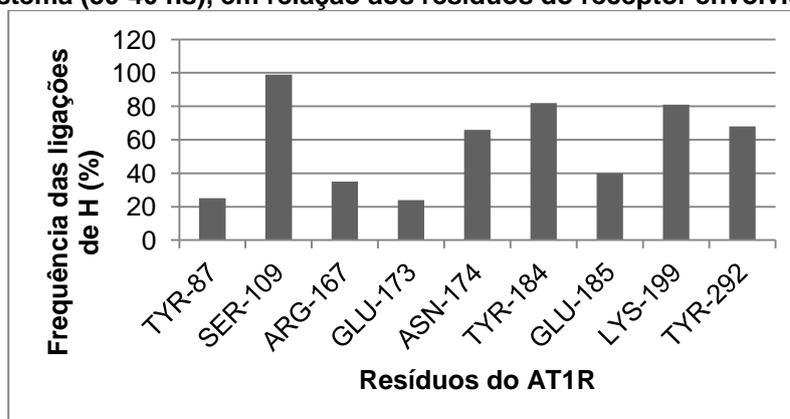


Figura 36 – Gráfico de ocupação das ligações de hidrogênio identificadas entre o AT1R e o SI, representada pela frequência de aparição nos quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema (30-40 ns), em relação aos resíduos do receptor envolvidos.



Para o complexo entre o AT1R e o SI, não foram evidenciadas possíveis interações aromáticas. A ausência desse tipo de interação, principalmente

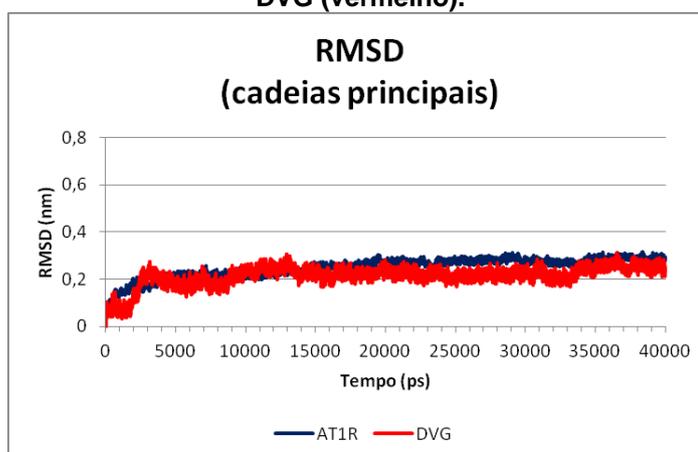
envolvendo o resíduo terminal do ligante, indica uma semelhança no perfil de interação entre os peptídeos enviesados apresentados anteriormente.

5.2.7. DVG

O peptídeo DVG, também agonista enviesado do AT1R, foi desenhado e sobreposto à cadeia principal da AngII no interior do receptor e submetido a uma dinâmica molecular de 40 ns, como os demais análogos. A energia do sistema permaneceu estável durante toda a simulação (Figura A1.18), a área por lipídeo da bicamada ficou próxima ao valor experimental do POPC ($0,75 \text{ nm}^2$). Além disso, o sistema também apresentou valores de temperatura ($309,98 \pm 0,91 \text{ K}$), pressão ($2,23 \pm 96,64 \text{ bar}$) e densidade ($1015,29 \pm 1,65$) com médias constantes e próximas às de referência (Figura A1.19).

A estrutura do receptor em complexo com o DVG variou pouco durante a simulação, apresentando RMSD estável entre 0,2 e 0,3 nm a partir do tempo de 20 ns (Figura 37). O gráfico de raio de giro de sua cadeia principal também mostrou alta estabilidade em seu empacotamento, com pequenas variações ao longo da trajetória (Figura A1.20). A estrutura do peptídeo ligante apresentou uma variação mais elevada se comparada à estrutura do ligante das outras simulações. No entanto, o DVG se manteve no interior do receptor, ficando em equilíbrio a partir do tempo aproximado de 15 ns, com o RMSD variando em torno de 0,2 nm (Figura 37).

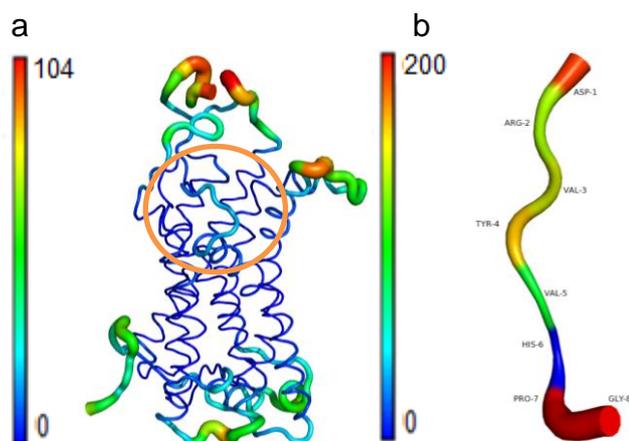
Figura 37 - Gráfico de desvio quadrado médio (RMSD) da cadeia principal do AT1R (azul) e do DVG (vermelho).



A média do desvio (RMSF) da estrutura do AT1R, calculada a partir do equilíbrio do sistema (20 ns), evidenciou estabilidade de suas porções transmembrânicas e da região do sítio de ligação, com baixos valores do Fato-B

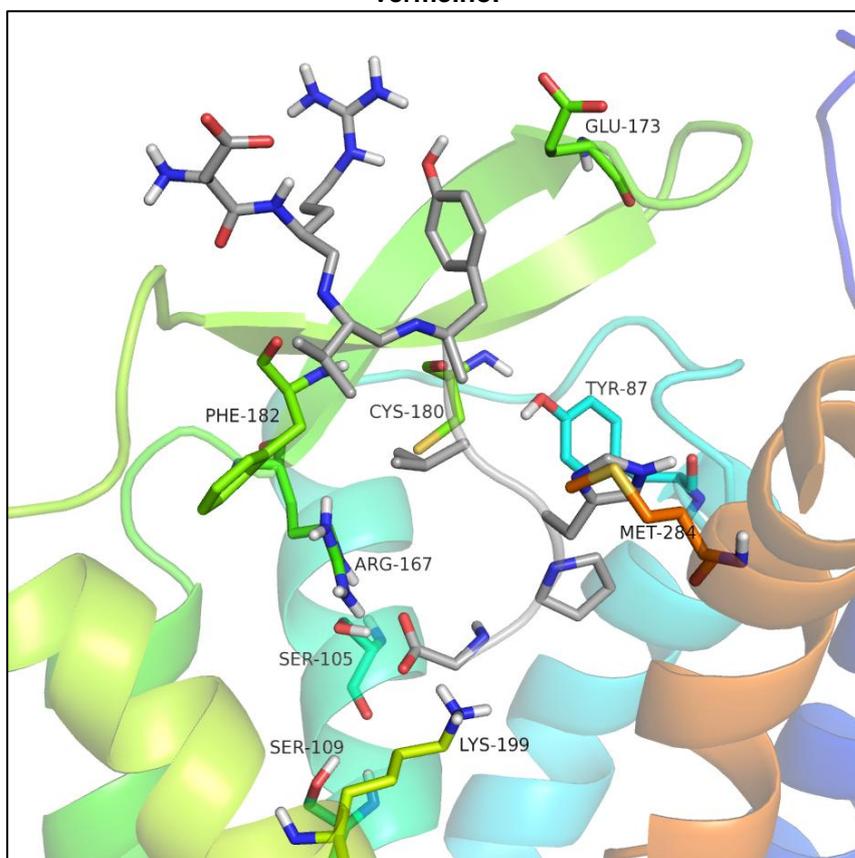
(Figura 38-a). Já a representação do ligante DVG mostrou alta movimentação do mesmo no interior do receptor, com valor de Fator-B máximo de 200. Apesar disso, o RMSF do peptídeo DVG apresentou um perfil semelhante aos dos outros peptídeos enviados, com maior movimentação do primeiro (ASP-1) e do último (GLY-8) resíduos de aminoácido (Figura 38-b).

Figura 38 - Representação do Fator-B do AT1R (a) e do DVG (b), no tempo de 30-40 ns. O círculo laranja em (a) indica a região do sítio de ligação. A escala de cores representa o grau de mobilidade dos aminoácidos durante a dinâmica, sendo o vermelho muito móvel e o azul escuro pouco móvel.



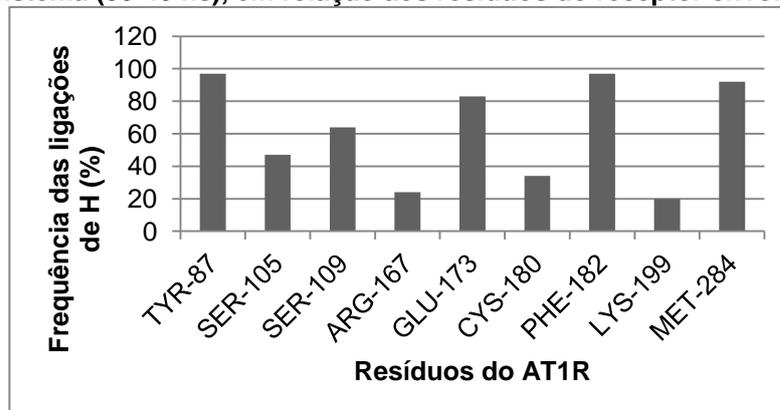
A análise de agrupamentos hierárquicos por RMSD dos quadros da dinâmica foi realizada igualmente às dinâmicas anteriores, abrangendo o sistema em equilíbrio, a partir de 20 ns nesse último caso. A primeira análise, envolvendo somente a estrutura do ligante, gerou 59 grupos, com o mais populoso deles contendo metade do número total de quadros. A segunda análise, com o complexo todo (AT1R-DVG), gerou 6 grupos, sendo que o primeiro mais populoso continha 94% das estruturas. Foi selecionado para análises posteriores o quadro com RMSD médio do primeiro grupo da primeira análise. Esse quadro selecionado também estava presente no grupo mais populoso da segunda análise, sendo, portanto, representativo tanto da estrutura do DVG quanto do receptor. O complexo extraído da dinâmica está representado na Figura 39.

Figura 39 - Conformação após dinâmica do DVG no AT1R. A cavidade do receptor está representada em colorido por modelo em fitas com os aminoácidos envolvidos na interação destacados em cilindro. As cadeias laterais do DVG se encontram em formato de cilindro, com os carbonos em cinza. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho.



As ocupações das ligações de hidrogênio foram calculadas para os últimos 20 ns de simulação (equilíbrio), com os resultados mostrados no gráfico da Figura 40. Essa análise revelou resíduos do AT1R envolvidos em interações com o ligante DVG que também estavam presentes nas interações dos outros peptídeos, como a SER-105, SER-109, ARG-167, PHE-182 e LYS-199. As ligações de hidrogênio entre o DVG e os resíduos TYR-87 e GLU-173 do receptor também estavam presentes com outros agonistas enviados, podendo ser importantes para esse tipo de atividade. A interação com a MET-284 do AT1R não ocorreu em nenhum outro complexo do AT1R com os peptídeos.

Figura 40 – Gráfico de ocupação das ligações de hidrogênio identificadas entre o AT1R e o DVG, representada pela frequência de aparição nos quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema (30-40 ns), em relação aos resíduos do receptor envolvidos.

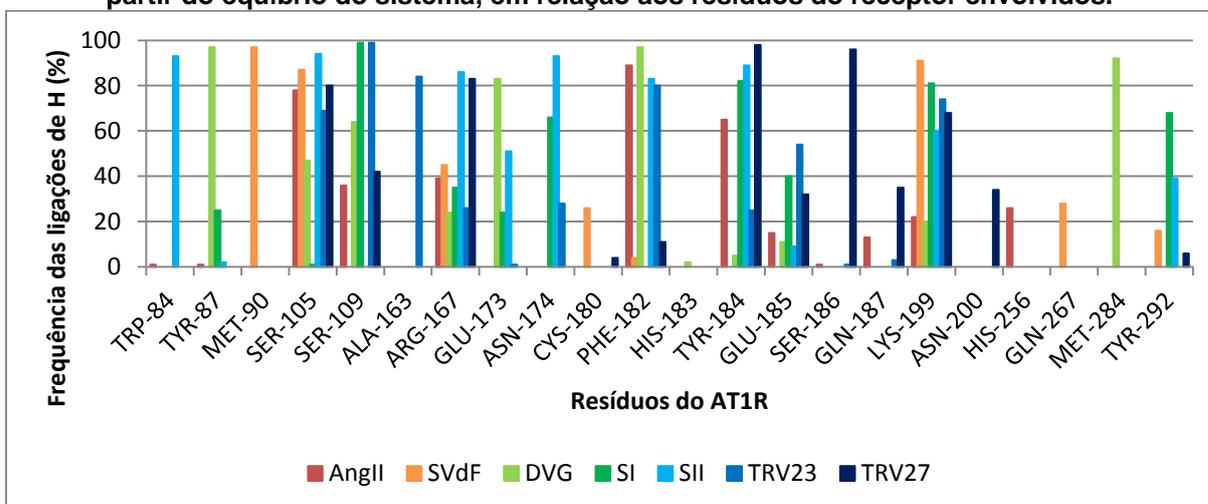


Como ocorreu com os outros peptídeos enviados, não foram observadas interações aromáticas entre o DVG e resíduos do receptor, indicando uma semelhança no perfil desse tipo de interação entre os agonistas enviados.

5.2.8. Comparação dos perfis de interação entre os ligantes e o AT1R

A Figura 41 ilustra a frequência de ocupação das ligações de hidrogênio durante a fase de equilíbrio da dinâmica molecular para os sete peptídeos em estudo e os resíduos de aminoácido do AT1R envolvidos. Com a comparação desse tipo de interação, com os peptídeos de ação agonista plena e os enviados, foi possível notar algumas diferenças quanto aos resíduos do receptor que estão envolvidos.

Figura 41 - Gráfico de ocupação das ligações de hidrogênio identificadas entre o AT1R e os ligantes peptídicos, representada pela frequência de aparição nos quadros da dinâmica a partir do equilíbrio do sistema, em relação aos resíduos do receptor envolvidos.



Alguns resíduos do receptor, como a SER-105, SER-109, ARG-167, PHE-182 e LYS-199, estiveram envolvidos nas interações com todos os peptídeos, agonistas

plenos e enviesados. Esses, portanto, podem ser responsáveis pelo reconhecimento do ligante e sua afinidade pelo receptor, não tendo função essencial no tipo de ação que o mesmo exerce. No entanto, é possível observar que as ligações de hidrogênio entre os resíduos SER-109 e ARG-167 os peptídeos enviesados (DVG, SI, SII, TRV120023 e TRV120027) possuem uma ocupação maior durante a simulação se comparada com suas interações com os agonistas plenos (AngII e SVdF). Esse fato sugere uma possível interação mais forte entre esses resíduos e os agonistas enviesados que pode, portanto, ter relação com o tipo de ação enviesada para β -arrestina.

Também foram notados resíduos do AT1R envolvidos em ligações de hidrogênio em poucos casos e com baixa frequência, como foi o caso da ALA-163, HIS-183, SER-186, GLN-187, HIS-256, ASN-200, GLN-267 e MET-284. Essas interações não foram consideradas na análise do perfil, uma vez que não foram representativas.

A partir dessa comparação, algumas ligações de hidrogênio mais frequentes e aparentes apenas nas simulações com peptídeos agonistas enviesados foram consideradas sobressalentes. Nesse sentido, os resíduos TYR-87, GLU-173, ASN-174 e TYR-292 do receptor podem ser destacados. Essas interações do tipo ligação de hidrogênio parecem ser importantes para ação enviesada no receptor e, portanto, foram consideradas nos estudos de campos de interação molecular e na construção do farmacóforo.

Além das ligações de hidrogênio, foram também analisadas interações aromáticas do tipo empilhamento- π , empilhamento-T e cátion- π para os sete complexos após a dinâmica molecular. Encontrou-se esse tipo de ligação em apenas três sistemas: AngII, SVdF e TRV120023 (Tabela II). Os peptídeos com ação agonista plena (AngII e SVdF), como já discutido anteriormente, possuem uma fenilalanina como aminoácido terminal, permitindo a realização de interações aromáticas com resíduos nas porções transmembrânicas do receptor (TM2, TM6 e TM7), na parte mais interna do sítio de ligação. Já os outros peptídeos em estudo, agonistas enviesados, não possuem aminoácido aromático na porção terminal e, portanto, não realizam essas interações.

A única interação aromática observada para um agonista enviesado foi um empilhamento- π entre a TYR-4 do TRV120023 e a PHE-182 presente na segunda alça transmembrânica do receptor (LE2).

Tabela II – Interações aromáticas observadas entre os complexos do AT1R com os peptídeos agonistas plenos (AngII e SVdF) e o TRV120023 após as simulações de dinâmica molecular.

Domínio do AT1R	Resíduo do AT1R	AngII			SVdF		TRV120023
		HIS-6	PHE-8	PHE-8	PHE-8	PHE-8	TYR-4
TM2	TRP-84	-	emp.- π	-	-	-	-
LE2	PHE-182	-	-	-	-	-	emp.- π
TM6	HIS-256	-	-	-	cátion- π	emp.-T	-
TM6	PHE-259	cátion- π	-	-	-	-	-
TM7	TYR-292	-	-	emp.- π	-	-	-

A partir dessa apreciação, as interações aromáticas com resíduos de porções transmembrânicas do receptor foram consideradas como fatos excludentes nas análises posteriores de seleção de moléculas na triagem virtual.

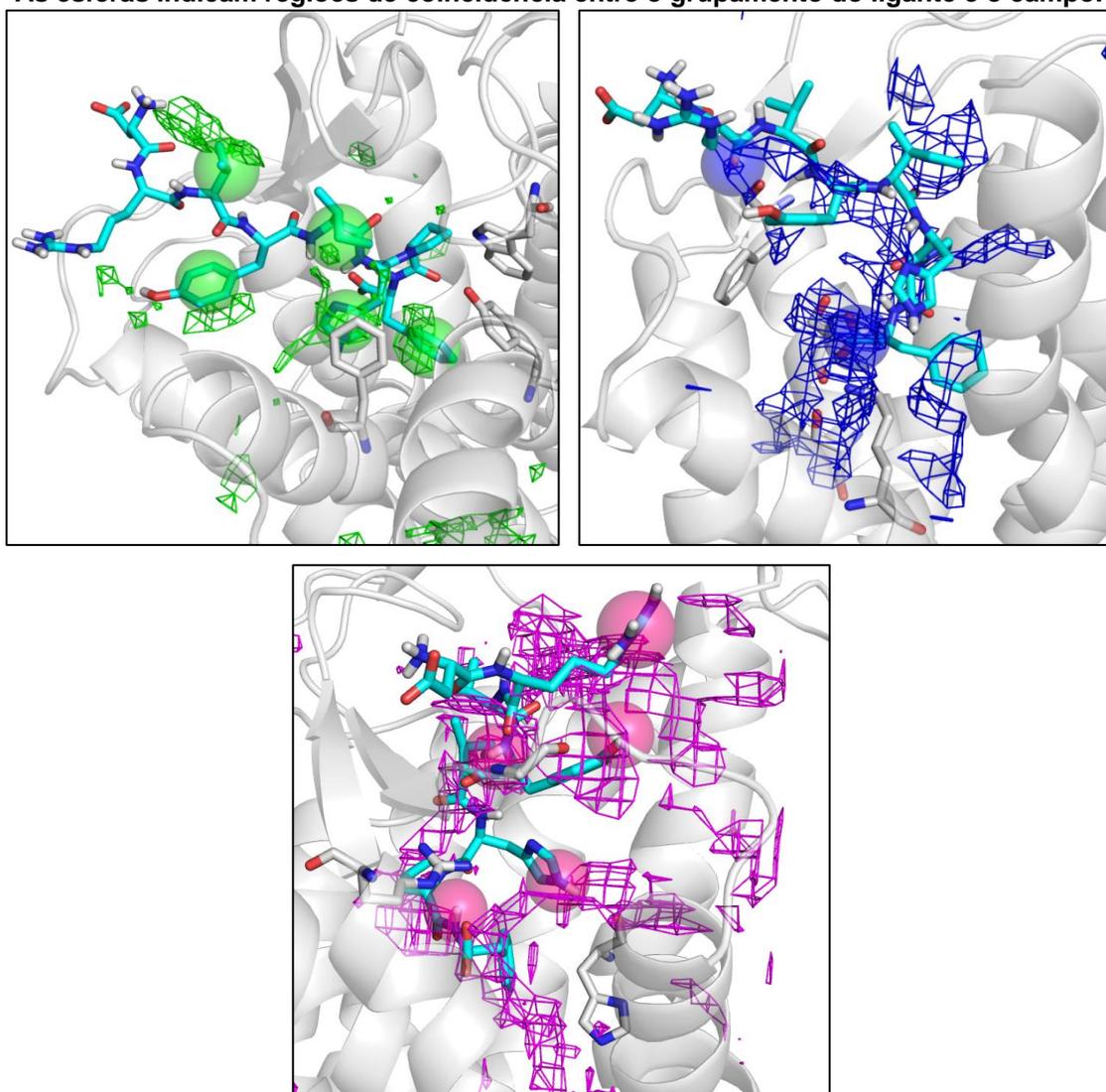
5.3. Análise dos campos de interação molecular do AT1R

Os campos de interação molecular indicam regiões nas quais certas características de um possível ligante seriam favoráveis para a interação com o receptor. Nos presente trabalho, as características estudadas foram hidrofiliicidade, hidrofobicidade, aceitação e doação de ligação de hidrogênio. Os resultados dos campos gerados com a sonda para hidrofiliicidade (H₂O) não foram aqui representados nem analisados mais profundamente, uma vez que eles cobriram toda a cavidade do receptor, não sendo conclusivos.

Os outros campos foram analisados juntamente com a estrutura do respectivo ligante no interior do AT1R. Foram observadas diferenças entre os campos de interação gerados com os receptores retirados das diferentes dinâmicas moleculares, o que evidencia uma mudança significativa em sua estrutura dependente do ligante e de sua característica. Os campos de interação molecular gerados para a estrutura do AT1R com a AngII estão representados na Figura 42. Foram representados em esferas os pontos coincidentes entre o campo e a característica do átomo do ligante, de modo a destacar as regiões de interesse para cada um dos possíveis tipos de ação. Em seguida, as regiões de interesse para o agonismo enviesado foram agrupadas e alinhadas, bem como as regiões

destacadas para os agonistas plenos, a fim de se identificar os pontos em comum para os tipos de agonistas.

Figura 42 – Representações da análise de campos de interação molecular do AT1R (fitas cinza) após a simulação de dinâmica molecular com a AngII (modelo em cilindro ciano). Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. Em verde estão os campos hidrofóbicos (DRY), em azul as regiões favoráveis para aceptores de ligação de hidrogênio (O) e em magenta as regiões favoráveis para doadores de ligação de hidrogênio. As esferas indicam regiões de coincidência entre o grupamento do ligante e o campo.



Foi possível observar semelhanças entre as regiões de coincidência entre os agonistas plenos (Figuras 41 e A2.1), principalmente para os campos hidrofóbicos. Foram destacadas as regiões correspondentes às PHE-8 da AngII e D-PHE-8 do SVdF e à TYR-4 da AngII e VAL-5 do SVdF. No caso dos agonistas enviesados (Figuras A2.2-6), os campos hidrofóbicos destacados em quase todos os casos corresponderam à cadeia lateral dos resíduos de números 3 (em todos os casos uma valina) e 5 (resíduos hidrofóbicos) dos peptídeos. Nenhum agonista enviesado

apresentou, nessa análise, campos hidrofóbicos de interesse próximos aos resíduos terminais do peptídeo, ao contrário do que foi observado nos agonistas plenos. Esse fato corrobora com os resultados da dinâmica que mostraram interações do tipo aromáticas entre os agonistas plenos e o receptor e não evidenciou o mesmo para agonistas enviesados.

A análise dos campos de interação com a sonda de acceptor de ligação de hidrogênio mostrou um campo favorável na região dos carboxi-terminais de todos os ligantes estudados. Tal informação reforça a importância da presença de um grupo acceptor de ligação de hidrogênio no ligante capaz de realizar interações com os resíduos de LYS-199 e SER-105 do receptor as quais, de acordo com os resultados da dinâmica, devem ser importantes para a ligação do peptídeo no receptor, independentemente do seu tipo de ação. Além disso, a análise desse tipo de campo de interação para os agonistas plenos evidenciou, em ambos os casos, a importância da presença de um grupo acceptor de ligação de hidrogênio na região correspondente a carbonila da segunda ligação peptídica do ligante, o que não foi evidenciado para a maioria dos agonistas enviesados. Outra diferença observada foi a presença de um campo importante de acceptor de ligação de hidrogênio próximo ao outro campo do carboxi-terminal apenas nos casos dos agonistas enviesados. Essa diferença também está relacionada com os resultados da dinâmica que mostraram uma maior interação dos agonistas enviesados com os resíduos de TRP-84 e TYR-292 do receptor.

Na comparação entre os campos de interação dados com a sonda de doador de ligação de hidrogênio, foi observado apenas um ponto em regiões semelhantes para os agonistas plenos. As cadeias laterais dos resíduos de HIS-6 da AngII e TYR-4 do SVdF ficaram em uma mesma região do receptor sinalizada como favorável para doadores de ligação de hidrogênio, sendo, portanto, destacada. Para os agonistas enviesados, foi evidenciada uma região de forte favorecimento para grupos doadores de ligação de hidrogênio próxima aos resíduos de GLU-173 e ASN-174 do receptor, o que também favorece o resultado da dinâmica molecular da possível participação de tais resíduos na ação enviesada.

5.4. Construção do farmacóforo

Os pontos coincidentes dos campos de interação entre os dois agonistas plenos estão representados na Figura 43-a. Foram identificadas duas regiões nas quais aceptores de ligação de hidrogênio seriam favoráveis, sendo que uma delas corresponde ao carboxi-terminal dos peptídeos, que realiza interação com a LYS-199 e a SER-105 do AT1R. Também ficaram evidentes três regiões com favorecimento para porções hidrofóbicas: duas próximas a uma região de aminoácidos hidrofóbicos do receptor e outra próxima ao resíduo de TYR-292, correspondendo ao anel aromático dos aminoácidos terminais dos agonistas plenos estudados. Além disso, um ponto de doador de ligação de hidrogênio que corresponde à HIS-6 de ambos os ligantes apareceu em comum entre os dois agonistas plenos.

A partir da análise dos pontos coincidentes dos cinco agonistas enviados, chegou-se em cinco pontos em comum (Figura 43-b). Os dois pontos hidrofóbicos e um aceitador de ligação de hidrogênio próximo à LYS-199 foram semelhantes a alguns pontos dos agonistas plenos, porém ainda foram considerados, por serem provavelmente importantes para o reconhecimento do receptor. O ponto correspondente a um átomo doador de ligação de hidrogênio próximo aos resíduos GLU-173 e ASN-174 foi encontrado como comum para a maioria dos agonistas enviados. Além disso, foi encontrado outro ponto comum de aceitador de ligação de hidrogênio próximo aos resíduos TRP-84 e TYR-292 do receptor. Esses resultados corroboram com os dados de ocupação de ligações de hidrogênio e da comparação do perfil de interação dos agonistas enviados com o AT1R observado durante a dinâmica (item 5.2.8).

Os pontos em comum entre os agonistas enviados foram utilizados para a geração de centróides que deram origem aos pontos do farmacóforo. A tolerância de cada ponto do modelo foi definida de modo a abranger os pontos de cada ligante, na região em comum, com a mesma característica. O farmacóforo gerado que foi utilizado na busca virtual está representado na Figura 44.

Figura 43 – Modelos de prováveis pontos importantes para a atividade de agonistas plenos (a) e enviesados (b). As esferas azuis representam átomos aceptores de ligação de hidrogênio; as esferas em magenta os átomos doadores de ligação de hidrogênio, e as esferas verdes as regiões hidrofóbicas. O AT1R está representado em modelo de fitas de cor amarela, com esferas em verde claro para regiões hidrofóbicas.

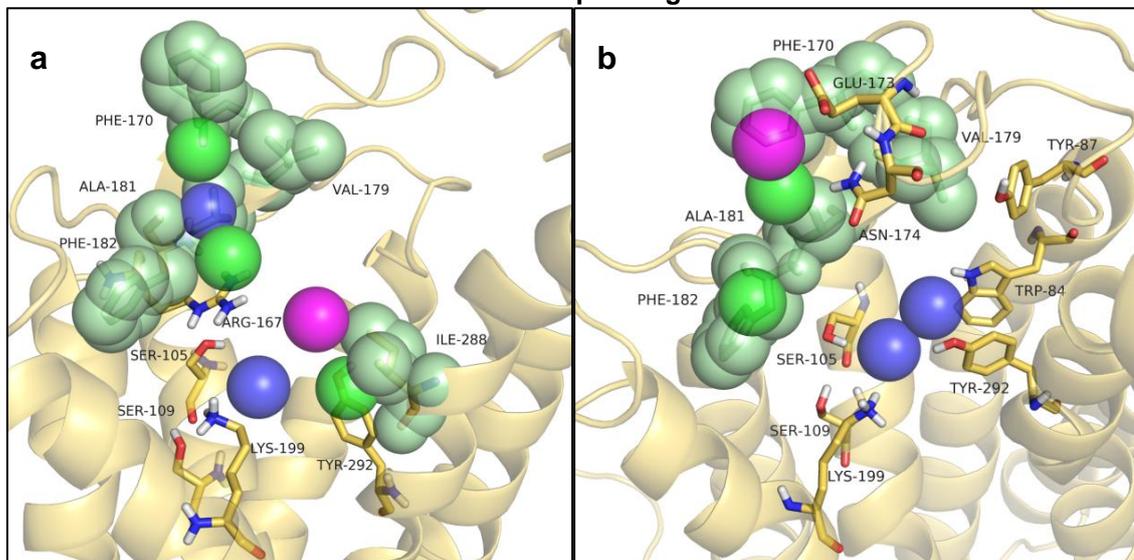
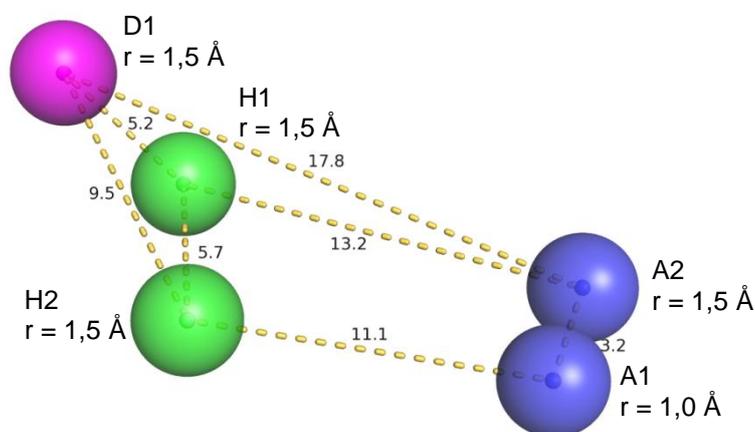


Figura 44 – Modelo de farmacóforo para agonistas enviesados do AT1R. As esferas azuis representam átomos aceptores de ligação de hidrogênio (A1 e A2); as esferas em magenta os átomos doadores de ligação de hidrogênio (D1), e as esferas verdes as regiões hidrofóbicas (H1e H2). As distâncias entre os pontos estão representadas pela linha amarela pontilhada, com os valores em Å. Os raios das esferas representam as tolerâncias.



5.5. Busca virtual

Para a busca virtual, partiu-se de dois grupos da base de dados ZINC, contendo moléculas comercialmente disponíveis: “All Purchasable” e “All Boutique”. Ao todo, foram somadas 34.942.670 moléculas a serem triadas na busca. Primeiramente foi aplicado um filtro amplo de características físico-químicas. Foram selecionadas, então, moléculas que apresentavam massa molecular maior ou igual a 350 Da, Log

P entre -2,5 e 5,5, menos de cinco doadores e menos de 10 aceptores de ligação de hidrogênio, carga formal entre -2 e 2, e com, no máximo, um grupamento nitro em sua estrutura. Após essa etapa, restaram, ao todo, 11.102.042 moléculas. Essas foram então submetidas à comparação com o farmacóforo contruído, sendo selecionadas 4.947 moléculas. Posteriormente, foi aplicado um segundo filtro, de modo a se excluir moléculas com nenhum átomo doador de ligação de hidrogênio e com menos de dois aceptores de ligação de hidrogênio, uma vez que esses são requisitos do farmacóforo de ligantes enviesados (Figura 44). Após essa etapa, as 2.766 moléculas restantes foram submetidas a um ensaio de ancoramento no AT1R.

Esse processo gerou dez conformações de cada molécula, totalizando 27.660 complexos. Esses complexos foram ordenados de acordo com seu valor de “*Total-Score*” calculado no processo de ancoramento. A distribuição do total de conformações pelo valor de “*Total-Score*” está representada no histograma da Figura 45. Para uma análise visual mais precisa e seleção final das moléculas de interesse, foram selecionadas as conformações com um valor de “*Total-Score*” maior do que nove, representando as 35% melhores das 27.660 (Tabela III).

As 35% melhores conformações ranqueadas no ancoramento compreendiam 9.697 poses, que foram analisadas visualmente no interior do receptor. A análise visual consistiu em verificar o encaixe da molécula no receptor, juntamente com a conformidade com o farmacóforo no interior do mesmo e as interações com os resíduos considerados importantes para a interação dos agonistas enviesados estudados. As moléculas que não realizavam possíveis interações com os resíduos LYS-199 ou SER-105 do receptor foram descartadas, uma vez que eles foram considerados essenciais para o reconhecimento do ligante. Também foram desconsideradas as moléculas que apresentavam um grupo aromático próximo aos resíduos TRP-84 e TYR-292, que foi uma característica considerada importante para o agonismo pleno, e não enviesado.

Enfim, foram selecionadas as moléculas que, além de apresentarem os critérios anteriores, também realizavam possíveis ligações de hidrogênio com a maioria dos resíduos considerados nesse estudo importantes para a ação enviesada: TRP-84, TYR-87, GLU-173, ASN-174 e TYR-292. Ao final dessa análise, foram selecionadas 15 moléculas, que estão representadas na Tabela IV.

Figura 45 – Histograma com a distribuição das poses geradas no ancoramento pelos valores de “Total-Score”.

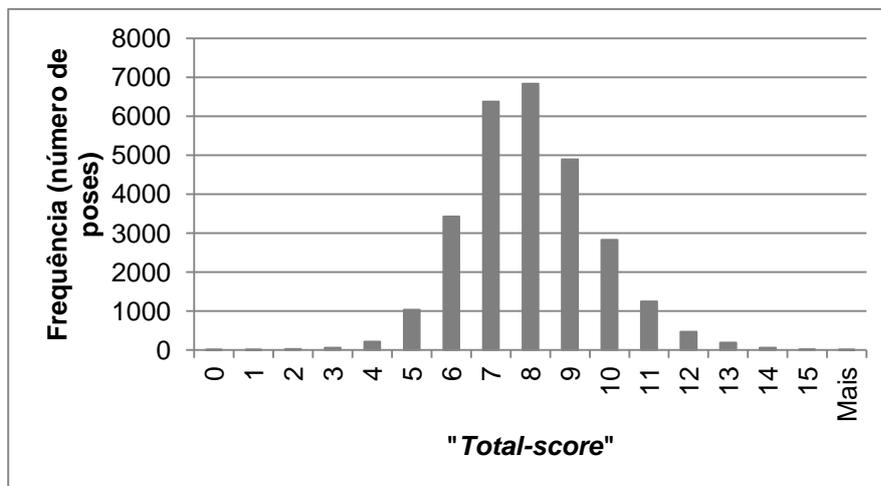


Tabela III – Frequência do número de poses geradas no ancoramento em cada faixa de valor de “Total-Score”, com suas porcentagens do total absolutas e acumuladas. Em negrito está a faixa utilizada como corte para o início da análise visual.

“Total-score”	Frequência	Porcentagem	Porcentagem acumulada
Maior que 16	5	0,018077	0,018077
15-16	16	0,057845	0,075922
14-15	55	0,198843	0,274765
13-14	186	0,672451	0,947216
12-13	470	1,699205	2,646421
11-12	1244	4,497469	7,143890
10-11	2830	10,23138	17,37527
9-10	4891	17,68257	35,05785
8-9	6833	24,70354	59,76139
7-8	6371	23,03326	82,79465
6-7	3424	12,37889	95,17354
5-6	1031	3,727404	98,90094
4-5	211	0,762834	99,66377
3-4	59	0,213304	99,87708
2-3	29	0,104845	99,98192
1-2	4	0,014461	99,99638
Menor que 1	1	0,003615	100
Total	27660		

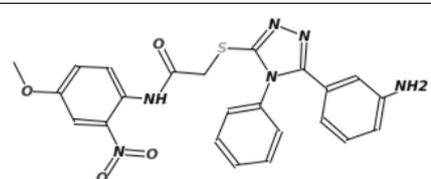
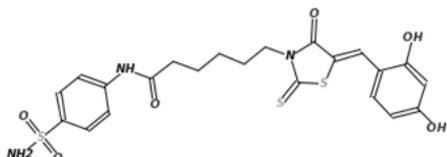
Ao analisarmos as 15 moléculas selecionadas, foi possível perceber a presença de alguns grupos semelhantes a produtos biológicos, como os núcleos esteroidais das moléculas 3 e 8, a semelhança a uma base nitrogenada da molécula 11 e porções peptídeo miméticas da molécula 15. Além disso, foram eleitas duas moléculas muito semelhantes entre si (4 e 7), diferenciadas apenas pela posição da hidroxila e do carboxil no anel aromático, o que salienta a importância de sua seleção. Outras moléculas semelhantes selecionadas foram a 10 e a 11 que

apresentam dois carboxilatos próximos a uma amida e separados de um complexo heterociclo por um anel.

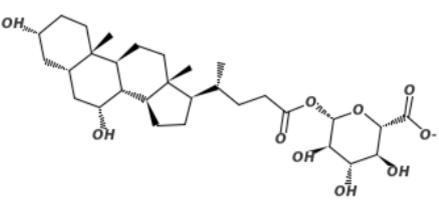
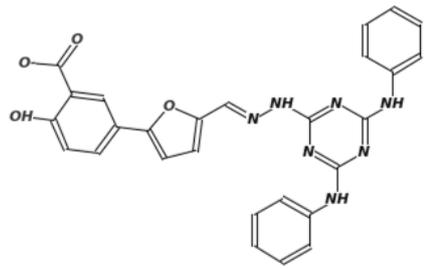
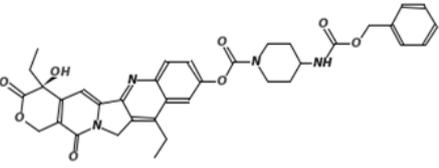
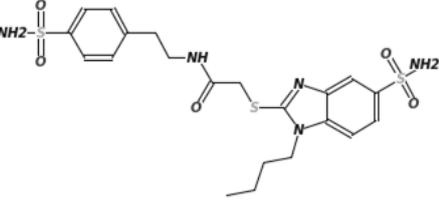
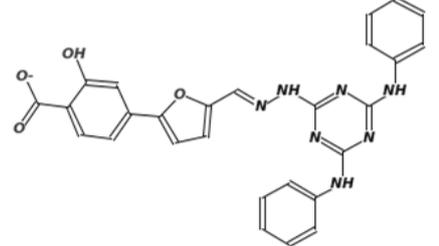
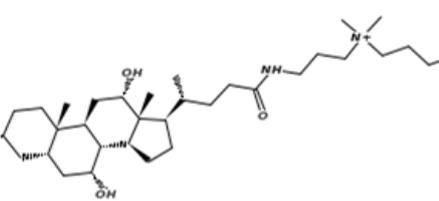
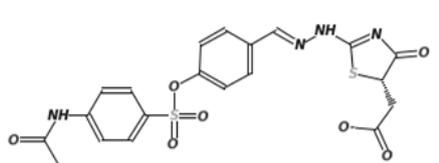
Dessas 15 moléculas, ainda foram separadas cinco de maior interesse, que poderiam ser primeiramente adquiridas para um teste biológico: as moléculas de número 4, 9, 11, 13 e 14. Elas foram sugeridas, uma vez que não apresentam grupamentos altamente reativos, sendo aparentemente estáveis. Também não foram indicadas moléculas com estruturas muito flexíveis, uma vez que não seriam protótipos a fármacos muito interessantes em função da promiscuidade. A molécula 7 não foi selecionada devido à sua semelhança com a molécula 4. Apesar de muito parecidas, a mudança da posição do carboxilato para a posição meta do anel aromático, como na molécula 4, pode favorecer a interação com a LYS-199 do receptor, justificando a escolha dessa. Coincidentemente, a molécula de número 11 já foi submetida a um estudo clínico de fase I para uso no tratamento de tumores sólidos, sob o nome de Pelitrexol (CAS 446022-33-9), resultando em uma dose segura de 540 mg/m²/semana com efeitos adversos moderados (ROBERT et al., 2004). Não foram encontrados estudos clínicos posteriores.

Os complexos das cinco moléculas de maior interesse, com o receptor e o farmacóforo, estão representados na Figura 46. Elas apresentam grupos com características semelhantes ao farmacóforo em regiões próximas, além de realizarem interações com os resíduos importantes citados anteriormente para o reconhecimento e a atividade enzimática. Os complexos do AT1R com as outras 10 moléculas estão ilustrados na Figura A3.1.

Tabela IV – Moléculas selecionadas a partir da triagem virtual e posterior análise visual.

Número	Estrutura	“Total-score”
1		12.6338
2		12.3329

Continuação da Tabela IV

3		11.2053
4		11.1834
5		10.9445
6		10.6489
7		10.3974
8		10.2656
9		10.1896

Conclusão da Tabela IV

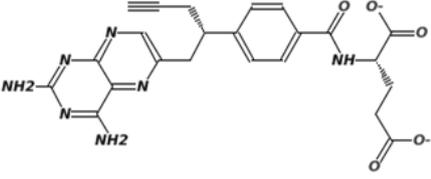
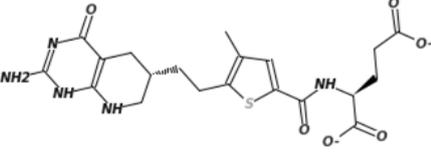
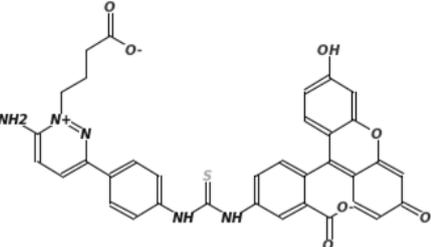
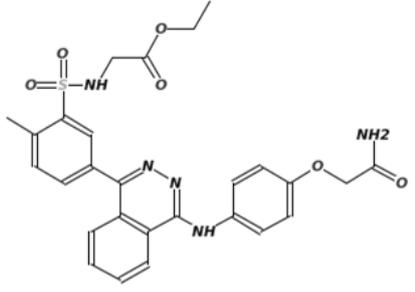
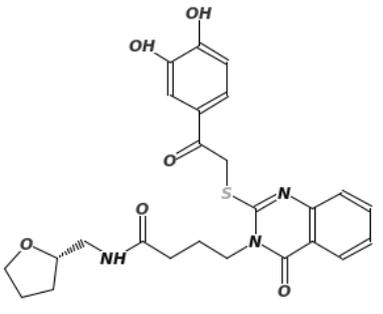
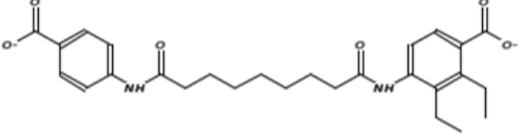
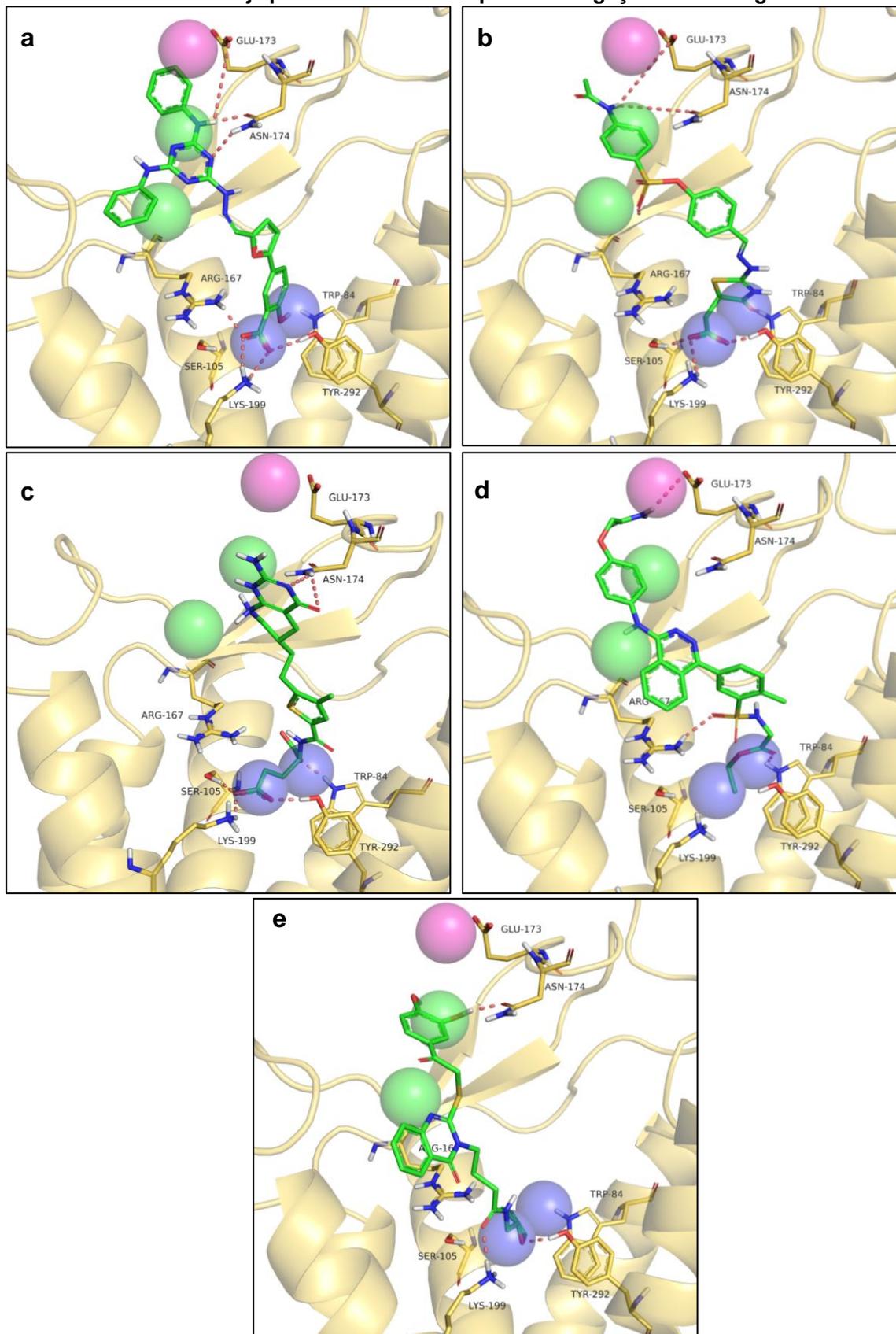
10		10.121
11		9.9477
12		9.8546
13		9.824
14		9.698
15		9.0017

Figura 46 – Complexos retirados do ancoramento do AT1R com o farmacóforo e as moléculas de número 4 (a), 9 (b), 11 (c), 13 (d) e 14 (e). As esferas representam o farmacóforo. O AT1R está representado em modelo de fitas de cor amarela e os ligantes em cilindro com carbonos em verde. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. As linhas laranja pontilhadas indicam possíveis ligações de hidrogênio.



6. CONCLUSÕES

O estudo de ancoramento, com a utilização de algoritmo incremental para a geração de poses, seguido de dinâmica molecular em meio de bicamada lipídica se mostrou um método de estudo adequado, uma vez que foi capaz de reproduzir interações entre a AngII e o AT1R observadas em outros estudos experimentais e computacionais. Assim sendo, foi um método capaz de produzir resultados sobre os outros peptídeos análogos no interior do receptor, permitindo a formação de um farmacóforo que poderá ser validado após os resultados de ensaios biológicos.

Com o resultado das dinâmicas moleculares dos peptídeos análogos à AngII, foi possível perceber alterações na interação entre os ligantes com diferentes tipos de ação frente ao AT1R. Essas diferenças podem ser as responsáveis pelo tipo de resposta resultante da ligação de agonistas enviados ao receptor. As análises dos campos de interação molecular corroboraram com os resultados das interações intermoleculares, auxiliando na construção do farmacóforo.

A busca virtual, com a utilização de filtros e do farmacóforo, seguida de ancoramento e análise visual, resultou em cinco moléculas possíveis para atividade enviesada para β -arrestina no AT1R. Essas moléculas selecionadas na busca poderão ser utilizadas em futuros estudos *in vitro* de atividade enviesada, podendo se apresentar como protótipos para um fármaco mais seguro e eficaz para o tratamento de doenças cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca.

REFERÊNCIAS

- APLIN, M. et al. The Angiotensin Type 1 Receptor Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 by G Protein-Dependent and -Independent Pathways in Cardiac Myocytes and Langendorff-Perfused Hearts. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 100, p. 289-295, 2007.
- APLIN, M.; CHRISTENSEN, G. L.; HANSEN, J. L. Pharmacologic Perspectives of Functional Selectivity by the Angiotensin II Type 1 Receptor. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 18, n. 8, p. 305–312, 2008.
- APLIN, M.; BONDE, M. M.; HANSEN, J. L. Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, p. 15-24, 2009.
- ARSENAUT, J. et al. Temperature dependent photolabeling of the human angiotensin II type 1 receptor reveals insights into its conformational landscape and its activation mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 990-999, 2010.
- BAKER, K. M.; BOOZ, G. W.; DOSTAL, D. E. Cardiac Actions of Angiotensin II: Role of an Intracardiac Renin-angiotensin System. **Annual Review of Physiology**, v. 54, p. 227-241, 1992.
- BALEANU-GOGONEA, C.; KARNIK, S. Model of the whole rat AT1 receptor and the ligand-binding site. **Journal of Molecular Modeling**, v. 12, p. 325-337, 2006.
- BELMONTE, S. L.; BLAXALL, B. C. Conducting the G-protein coupled receptor (GPCR) signaling symphony in cardiovascular diseases: New therapeutic approaches. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 9, n. 3, p. e85-e90, 2012.
- BERGER, O; EDHOLM, O; JÄHNIG, F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. **Biophysical Journal**, v. 72, n.5, p. 2002-2013, 1997.
- BJARNADÓTTIR, T. K. et al. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. **Genomics**, v. 88, p. 263-273, 2006.
- BOERRIGTER, G. et al. Cardiorenal Actions of TRV120027, a Novel β -Arrestin-Biased Ligand at the Angiotensin II Type I Receptor, in Healthy and Heart Failure Canines: A Novel Therapeutic Strategy for Acute Heart Failure. **Circulation Heart Failure**, 2011. Disponível em: <<http://circheartfailure.ahajournals.org/content/4/6/770.full>>. Acesso em: 16 de maio de 2013.
- BONDE M. M. et al. Biased Signaling of the Angiotensin II Type 1 Receptor Can Be Mediated through Distinct Mechanisms. **PLoS One**, v. 5, n. 11, 2010. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0014135>>. Acesso em: 17 de maio de 2013.
- COHEN, N. C. **Guidebook on molecular modeling in drug design**. San Diego: Academic Press, 1996. 361p.
- CRABOS, M. et al. Characterization of Angiotensin II Receptors in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, p. 2372-2378, 1994.
- DAURA, X. et al. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 1-2, p. 236–240, 1999.

- DEWIRE, S. M. et al. β -Arrestins and Cell Signaling. **Annual Review of Physiology**, v. 69, p. 483-510, 2007.
- DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. BINANA: A Novel Algorithm for Ligand-Binding Characterization. **J Mol Graph Model**, v. 29, n. 6, p. 888–893, 2011.
- EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. **Br J Pharmacol**, v.152, n.1, p.21-37, 2007.
- FILLION, D. et al. Structure of the Human Angiotensin II Type 1 (AT 1) Receptor Bound to Angiotensin II from Multiple Chemoselective Photoprobe Contacts Reveals a Unique Peptide Binding Mode. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 12, p. 8187–8197, 22 março, 2013.
- GASPARO, M. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 415-472, 2000.
- GPCRNETWORK. Outreach. Disponível em: <<http://gpcr.scripps.edu/outreach.htm>>. Acesso em 4 de junho de 2014.
- GRANIER, S.; KOBILKA, B. A new era of GPCR structural and chemical biology. **Nature Chemical Biology**, v. 8, p. 670-673, 2012.
- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 37-46, 2008.
- HENCKEL, J. G.; BILLINGS, E. M. Molecular modeling. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMNS, D.A. eds. **Principles of medicinal chemistry**. 4.ed., Media: Williams & Wilkins.
- HOELZ, L. V. B. et al. Receptores Acoplados à Proteína G. **Revista Virtual de Química**, 2013. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/498/380>>. Acesso em 4 de junho de 2014.
- HOLLOWAY, A. C. et al. Side-Chain Substitutions within Angiotensin II Reveal Different Requirements for Signaling, Internalization, and Phosphorylation of Type 1A Angiotensin Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 768-777, 2002.
- HONG, L.; LEI, J. Scaling Law for the Radius of Gyration of Proteins and Its Dependence on Hydrophobicity. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 47, p. 207–214, 2009.
- HYPERCHEM versão: 7.5. Gainesville, FL; Hypercube, Inc., 2002, Conjunto de programas, 1 CD-ROM.
- IRWIN, J. J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.
- JAIN, A. N. Surflex: Fully Automated Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 499-511, 2003.
- JANUZZI, J. L.; TROUGHTON, R. Are Serial BNP Measurements Useful in Heart Failure Management? : Serial Natriuretic Peptide Measurements Are Useful in Heart Failure Management. **Circulation**, v.127, p. 500-508, 2013.

- KANDT, C; ASH, W. L.; TIELEMAN, D. P. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. **Methods**, v. 41, n. 4, p. 475-488, 2007.
- KENAKIN, T. New Concepts in Drug Discovery: Collateral Efficacy and Permissive Antagonism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 919-927, 2005.
- KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2013. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrd/journal/v12/n3/full/nrd3954.html> >. Acesso em 16 de maio de 2013.
- KITCHEN, D. B., et al. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949, 2004.
- LAPORTE, S. A. et al. Determination of Peptide Contact Points in the Human Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1) with Photosensitive Analogs of Angiotensin II. **Mol. Endo.**, v. 13, p. 578-586, 1999.
- LEACH, A. R. Empirical Force Field Models: Molecular Mechanics. In:_____ **Molecular Modelling. Principles and Applications**. 2.ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2001^a. cap. 4, p. 165-247
- LEACH, A. R. The Use of Molecular Modelling and Chemoinformatics to Discover and Design New Molecules. In:_____ **Molecular Modelling. Principles and Applications**. 2.ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2001^b. cap. 12, p. 640-720.
- LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of Protein-Ligand Interactions. Docking and Scoring: Successes and Gaps. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006.
- LEFKOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K. Transduction of Receptor Signals by β -Arrestins. **Science**, v. 308, p.512-517, 2005.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.
- LOBANOV, M. Y.; BOGATYREVA, N. S.; GALZITSKAYA, O. V. Radius of Gyration as an Indicator of Protein Structure Compactness. **Molecular Biology**, v. 42, n. 4, p. 623-628, 2008.
- LOEWE, L. Global computing for bioinformatics. **Brief Bioinform**, v.3, n.4, p.377-388, 2002.
- MATSOUKAS, M. T. et al. Insights into AT1 Receptor Activation through AngII Binding Studies. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, p. 2798-2811, 2013^a.
- MATSOUKAS, M. T. et al. Ligand Binding Determinants for Angiotensin II Type 1 Receptor from Computer Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 11, p. 2874-2883, 2013^b.
- NOGUEIRA, P. R.; RASSI, S.; CORRÊA, K. S.. Epidemiological, Clinical e Therapeutic Profile of Heart Failure in a Tertiary Hospital. **Arq Bras Cardiol**, Goiânia, v.95, n.3, p.392-398, 2010.
- OOMS, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. **Curr Med Chem**, v.7, n.2, p.141-158, 2000.

- OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656-1676, 2004.
- PARKER, C. N.; BAJORATH, J. Towards Unified Compound Screening Strategies: A Critical Evaluation of Error Sources in Experimental and Virtual High-Throughput Screening. **QSAR and Combinatorial Science**, v. 25, n. 12, p. 1153-1161, 2006.
- PyMOL Molecular Graphics System, versão 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.
- ROBERT, F. et al. Results of 2 phase I studies of intravenous (iv) pelitrexol (AG2037), a glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT) inhibitor, in patients (pts) with solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 14S, p. 3075, 2004.
- ROGER, L. V. et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2012 Update : A Report From the American Heart Association. **Circulation**, 2012. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/125/1/e2>>. Acesso em: 16 de maio de 2013.
- SBC-SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. II Diretrizes para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. **Arq Bras Cardiol**, v. 79, supl. IV), 2002. Disponível em: <<http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2002/7905/IIIDiretrizes.pdf>>. Acesso em: 16 de maio de 2013.
- SIMARD, E. et al. β -Arrestin Regulation of Myosin Light Chain Phosphorylation Promotes AT1aR-mediated Cell Contraction and Migration. **PlosOne**, v. 8, n. 11, p. e80532, 2013
- SPYROULIAS, G. A. et al. Comparison of the solution structures of angiotensin I and II: Implication for structure-function relationship. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 2163-2173, 2003.
- SYBYL-X/ SURFLEX-DOCK versão 2.0.; Tripos, 2012.
- TREVENA INC. Study to Evaluate the Effects of TRV120027 in Patients With Heart Failure. **ClinicalTrials.gov**, 2012, NCT01187836. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01187836?term=heart+failure+trv&rank=1>>. Acesso em: 16 de maio de 2013.
- TREVENA INC. Study to Evaluate TRV120027 on Renal Pharmacodynamics in Patients With Heart Failure and Renal Dysfunction. **ClinicalTrials.gov**, 2012, NCT01444872. Disponível em: < <http://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=heart+failure+trv&rank=2>>. Acesso em: 16 de maio de 2013.
- TUCCINARDI, T. et al. Proposal of a New Binding Orientation for Non-Peptide AT1 Antagonists: Homology Modeling, Docking and Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 4305-4316, 2006.
- VENKATAKRISHNAN, A. J. et al. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 494, p. 185-194, 2013.
- VIOLIN, J. D.; LEFKOWITZ, R. J. β -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 416-422, 2007.
- VIOLIN, J. D. et al. Selectively Engaging β -Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 3, p. 572-279, 2010.

- WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In: _____ **The Practice of Medicinal Chemistry**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2007. cap. 6, p. 125-142.
- WEI, H. et al. Independent β -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. **PNAS**, v. 100, n. 19, p. 10782-10787, 2003.
- WU, B. et al. Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. **Science**, v.330, n.6007, p. 1066-1071, 2010.
- ZHOU, H.; SKOLNICK, J. FINDSITE^X: A Structure-Based, Small Molecule Virtual Screening Approach with Application to All Identified Human GPCRs. **Molecular Pharmaceutics**, v.9, p. 1775-1784, 2012.
- ZIMMERMAN, B. et al. Differential β -Arrestin-Dependent Conformational Signaling and Cellular Responses Revealed by Angiotensin Analogs. **Science Signaling**, v. 5, n. 221, ra33, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Resultados das dinâmicas moleculares

Figura A1.1 - Gráfico da variação de energias de Lennard-Jones (azul), de Coulomb (vermelho), potencial (amarelo) e total (preto) do sistema pelo tempo de simulação da dinâmica do complexo AT1R-AngII.

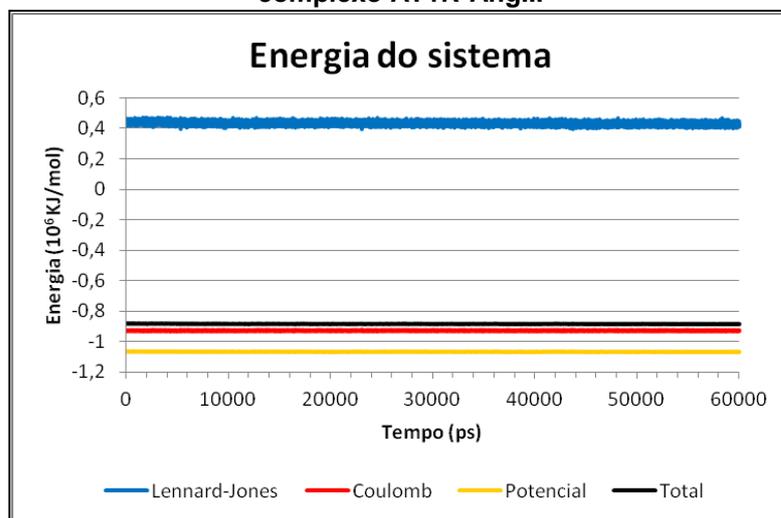


Figura A1.2 - Variação da temperatura (a), da pressão (b) e da densidade da água (c) do sistema em função do tempo da simulação de dinâmica molecular do complexo AT1R - AngII. A linha preta indica a tendência da média dos valores.

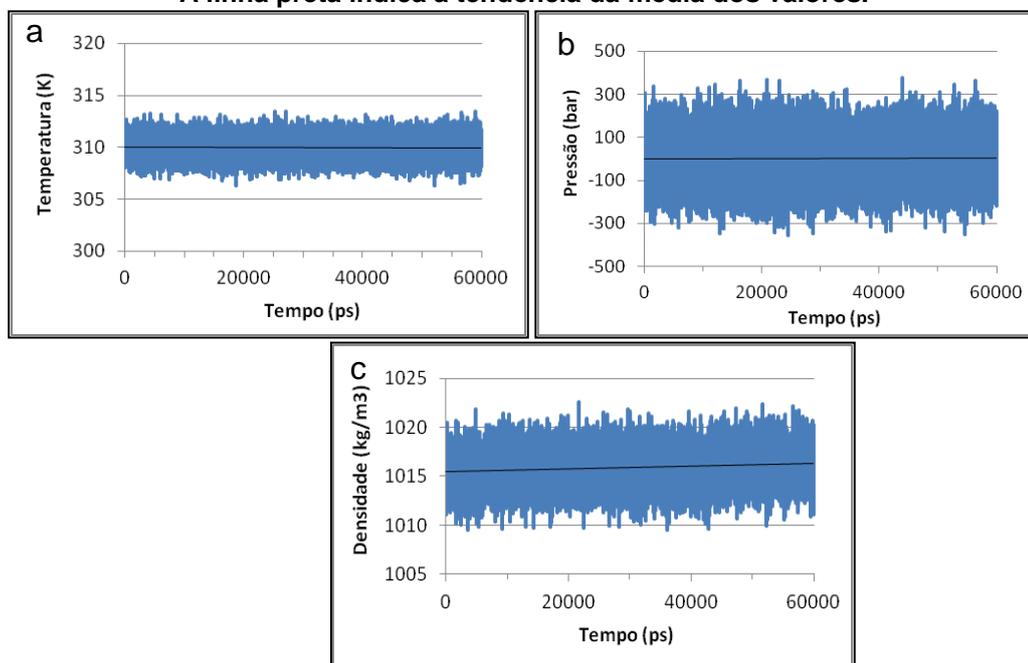


Figura A1.3 - Gráfico da variação de energias de Lennard-Jones (azul), de Coulomb (vermelho), potencial (amarelo) e total (preto) do sistema pelo tempo de simulação da dinâmica do complexo AT1R-SVdF.

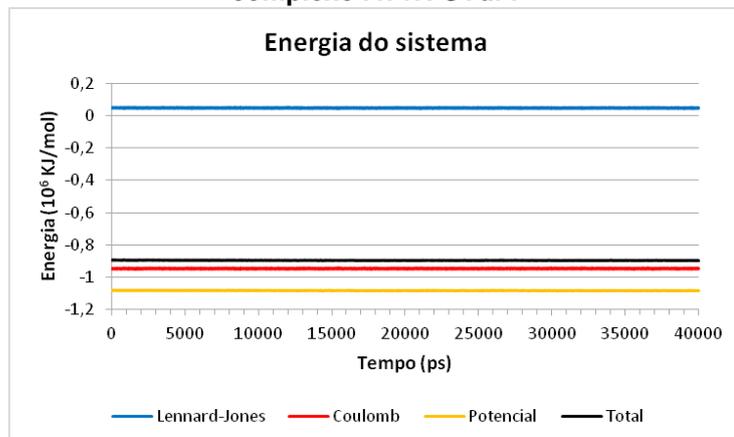


Figura A1.4 - Variação da temperatura (a), da pressão (b) e da densidade da água (c) do sistema em função do tempo da simulação de dinâmica molecular do complexo AT1R - SVdF. A linha preta indica a tendência da média dos valores.

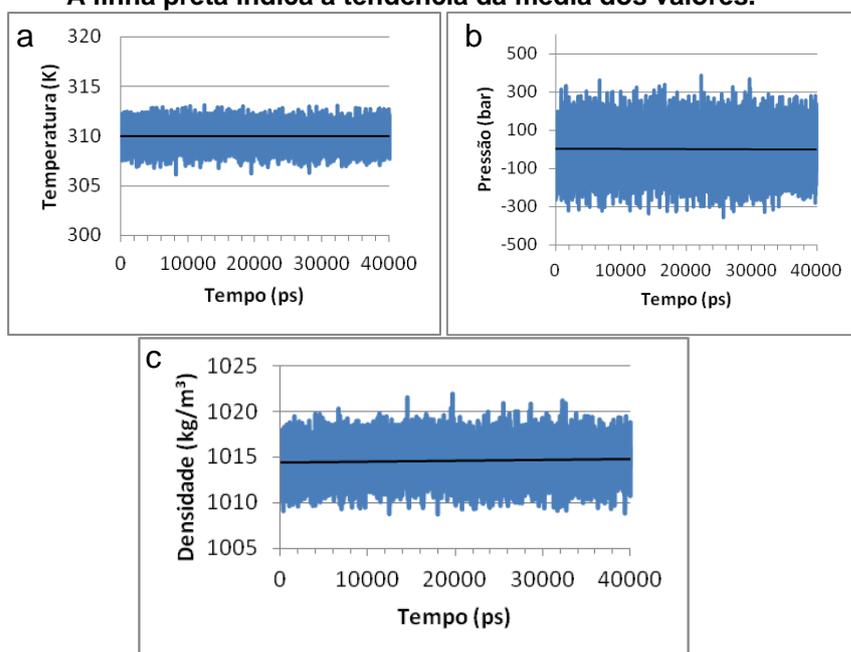


Figura A1.5 - Gráfico de variação de raio de giro da cadeia principal do AT1R nos eixos x (azul), y (vermelho) e z (amarelo) da caixa de simulação pelo tempo da dinâmica do complexo AT1R-SVdF.

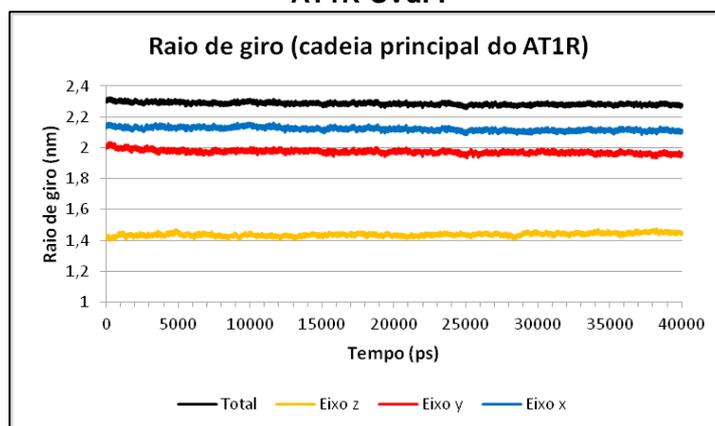


Figura A1.6 - Gráfico da variação de energias de Lennard-Jones (azul), de Coulomb (vermelho), potencial (amarelo) e total (preto) do sistema pelo tempo de simulação da dinâmica do complexo AT1R-TRV120027.

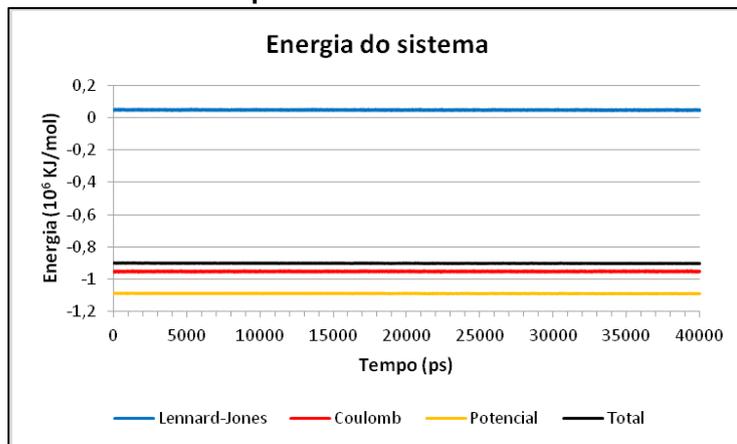


Figura A1.7 - Variação da temperatura (a), da pressão (b) e da densidade da água (c) do sistema em função do tempo da simulação de dinâmica molecular do complexo AT1R – TRV120027. A linha preta indica a tendência da média dos valores.

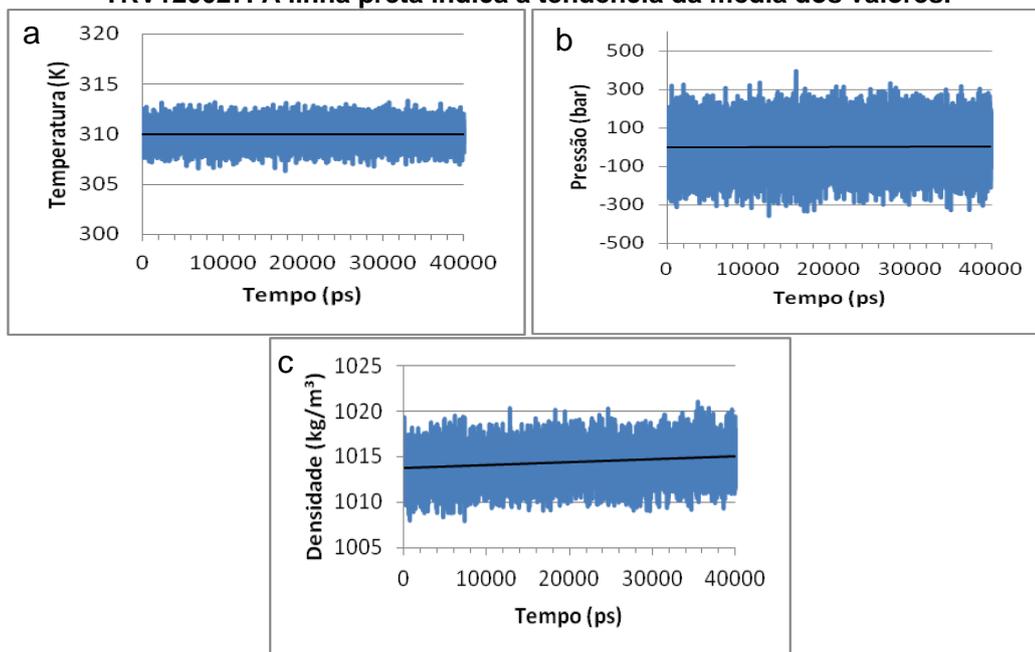


Figura A1.8 - Gráfico de variação de raio de giro da cadeia principal do AT1R nos eixos x (azul), y (vermelho) e z (amarelo) da caixa de simulação pelo tempo da dinâmica do complexo AT1R-TRV120027.

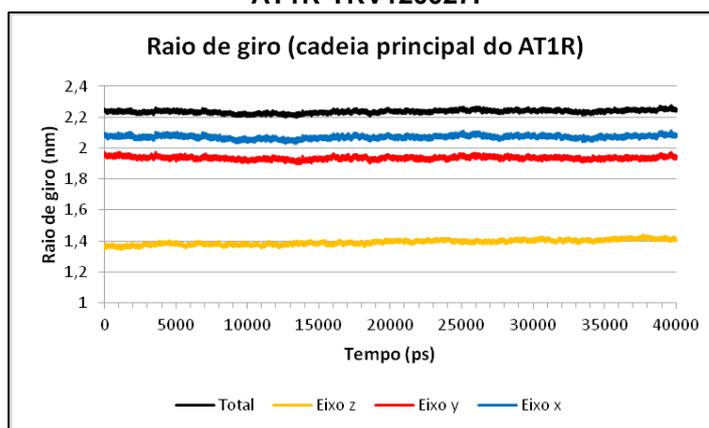


Figura A1.9 - Gráfico da variação de energias de Lennard-Jones (azul), de Coulomb (vermelho), potencial (amarelo) e total (preto) do sistema pelo tempo de simulação da dinâmica do complexo AT1R-TRV120023.

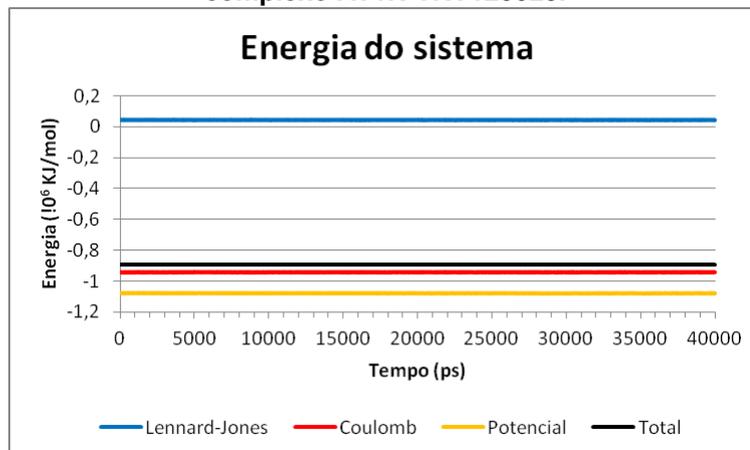


Figura A1.10 - Variação da temperatura (a), da pressão (b) e da densidade da água (c) do sistema em função do tempo da simulação de dinâmica molecular do complexo AT1R-TRV120023. A linha preta indica a tendência da média dos valores.

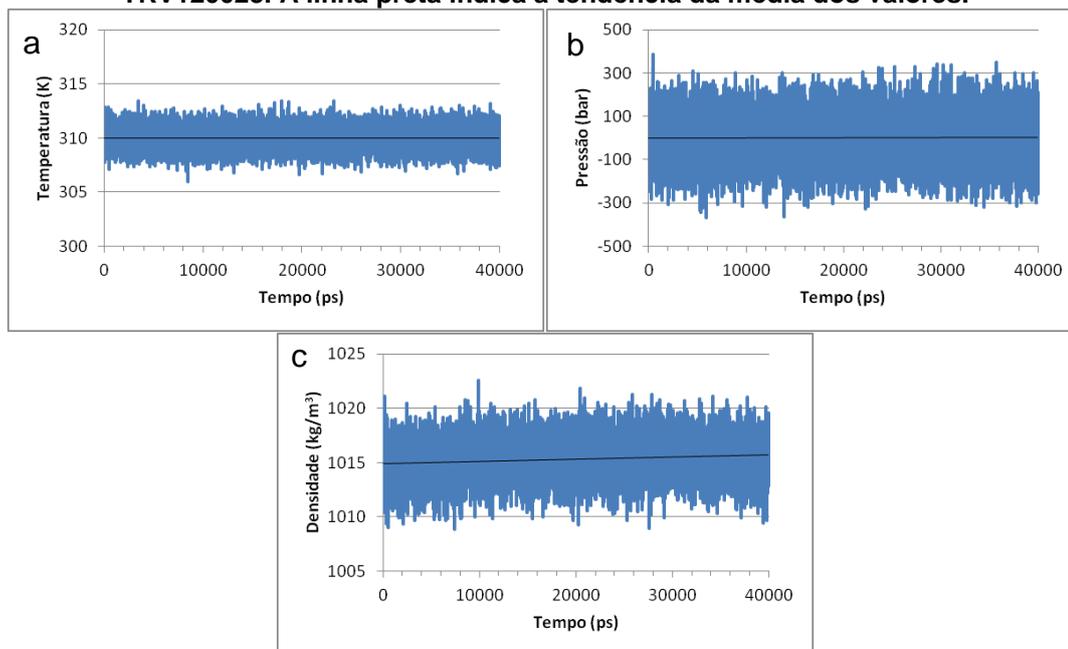


Figura A1.11 - Gráfico de variação de raio de giro da cadeia principal do AT1R nos eixos x (azul), y (vermelho) e z (amarelo) da caixa de simulação pelo tempo da dinâmica do complexo AT1R-TRV120023.

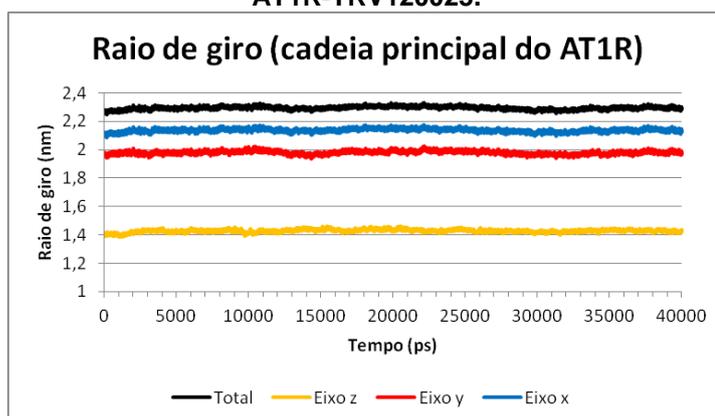


Figura A1.12 - Gráfico da variação de energias de Lennard-Jones (azul), de Coulomb (vermelho), potencial (amarelo) e total (preto) do sistema pelo tempo de simulação da dinâmica do complexo AT1R-SII.

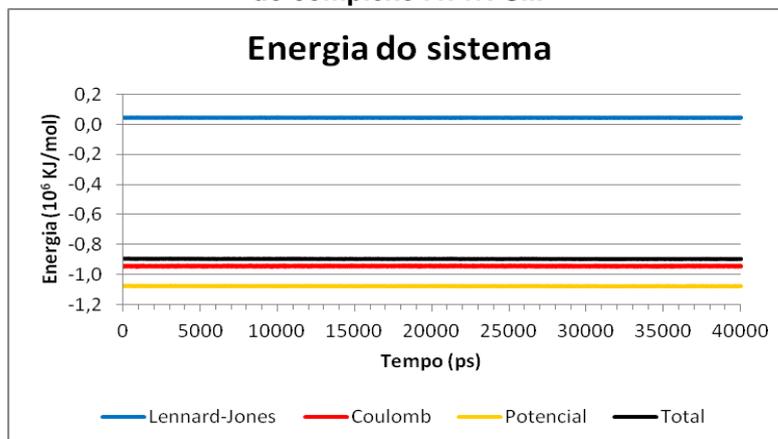


Figura A1.13 - Variação da temperatura (a), da pressão (b) e da densidade da água (c) do sistema em função do tempo da simulação de dinâmica molecular do complexo AT1R -SII. A linha preta indica a tendência da média dos valores.

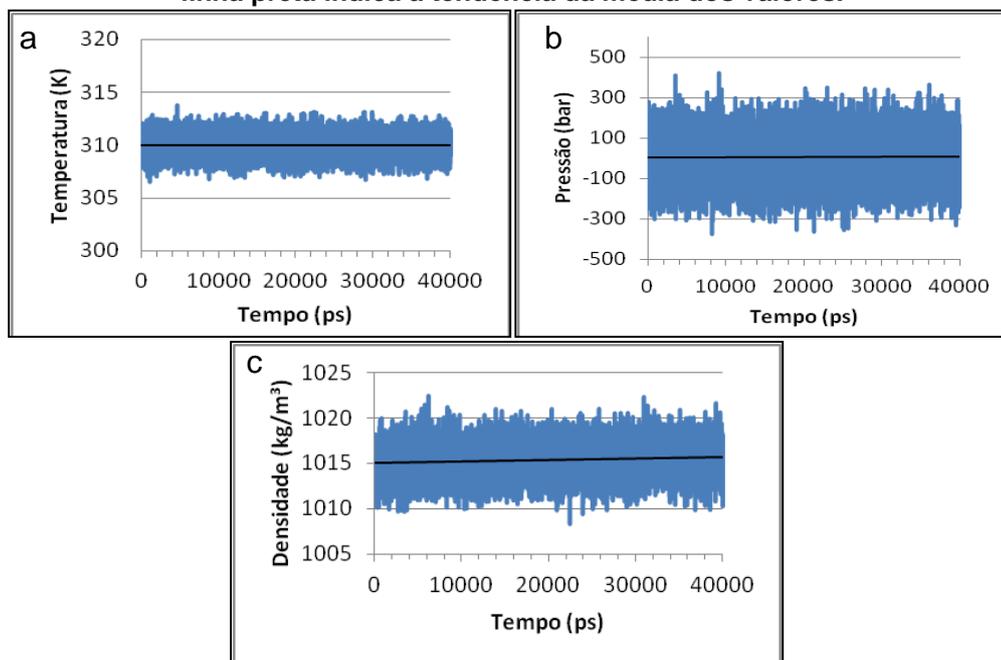


Figura A1.14 - Gráfico de variação de raio de giro da cadeia principal do AT1R nos eixos x (azul), y (vermelho) e z (amarelo) da caixa de simulação pelo tempo da dinâmica do complexo AT1R-SII.

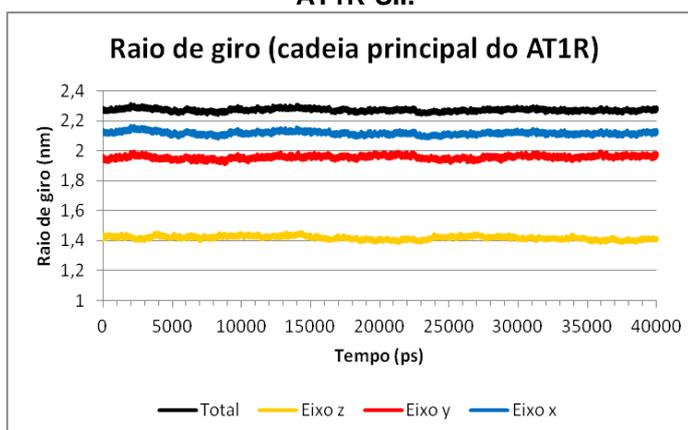


Figura A1.15 - Gráfico da variação de energias de Lennard-Jones (azul), de Coulomb (vermelho), potencial (amarelo) e total (preto) do sistema pelo tempo de simulação da dinâmica do complexo AT1R-SI.

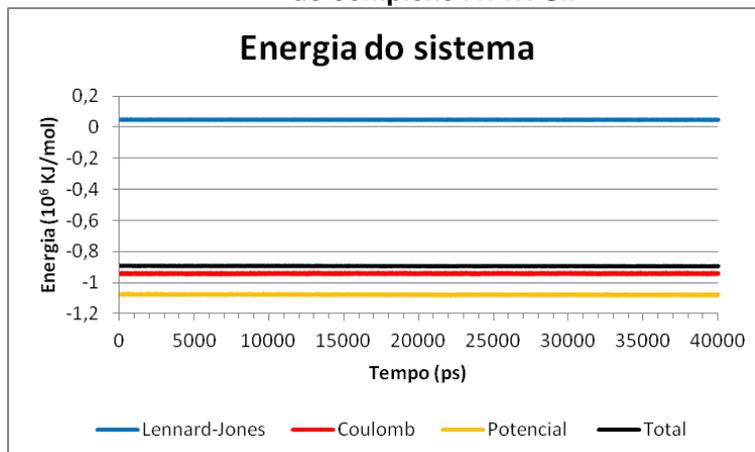


Figura A1.16 - Variação da temperatura (a), da pressão (b) e da densidade da água (c) do sistema em função do tempo da simulação de dinâmica molecular do complexo AT1R -SI. A linha preta indica a tendência da média dos valores.

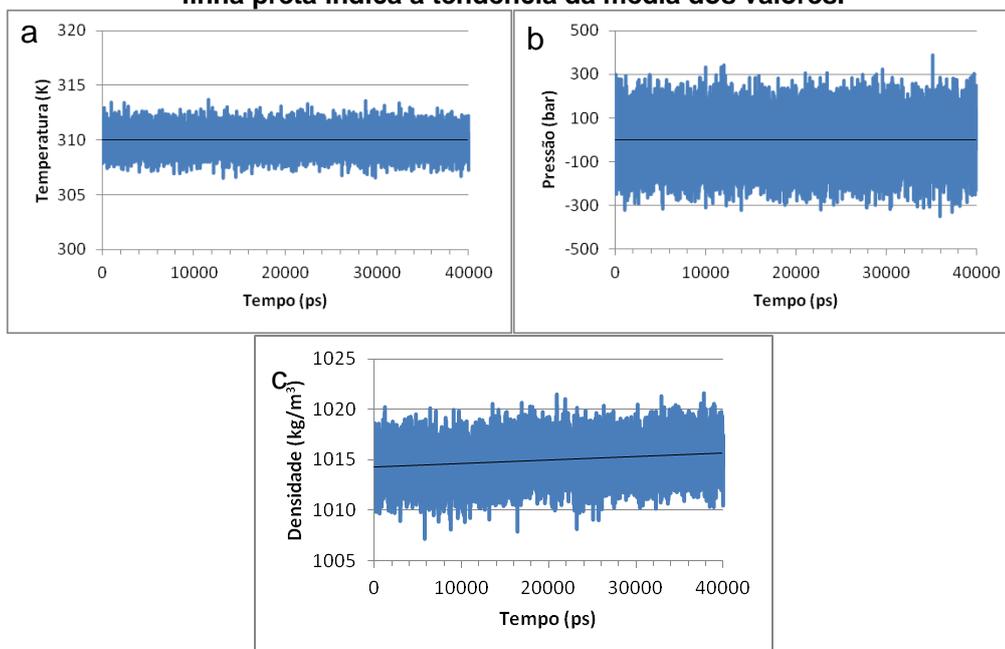


Figura A1.17 - Gráfico de variação de raio de giro da cadeia principal do AT1R nos eixos x (azul), y (vermelho) e z (amarelo) da caixa de simulação pelo tempo da dinâmica do complexo AT1R-SI.

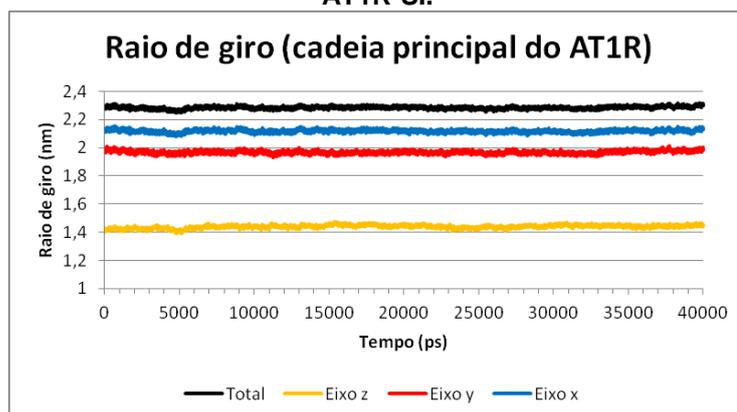


Figura A1.18 - Gráfico da variação de energias de Lennard-Jones (azul), de Coulomb (vermelho), potencial (amarelo) e total (preto) do sistema pelo tempo de simulação da dinâmica do complexo AT1R-DVG.

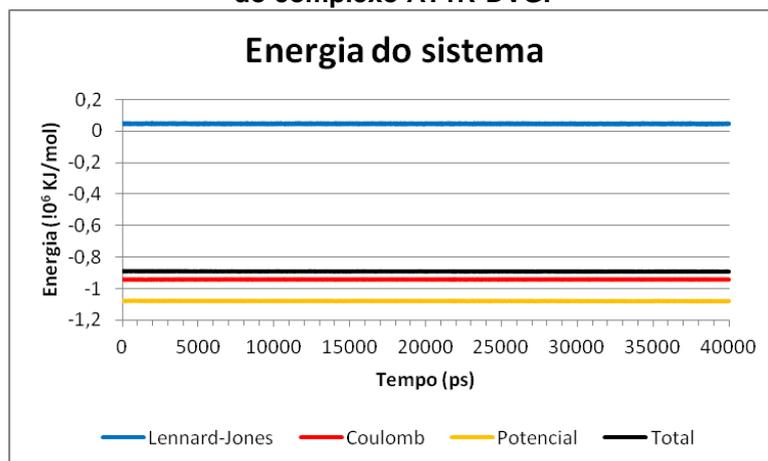


Figura A1.19 - Variação da temperatura (a), da pressão (b) e da densidade da água (c) do sistema em função do tempo da simulação de dinâmica molecular do complexo AT1R-DVG. A linha preta indica a tendência da média dos valores.

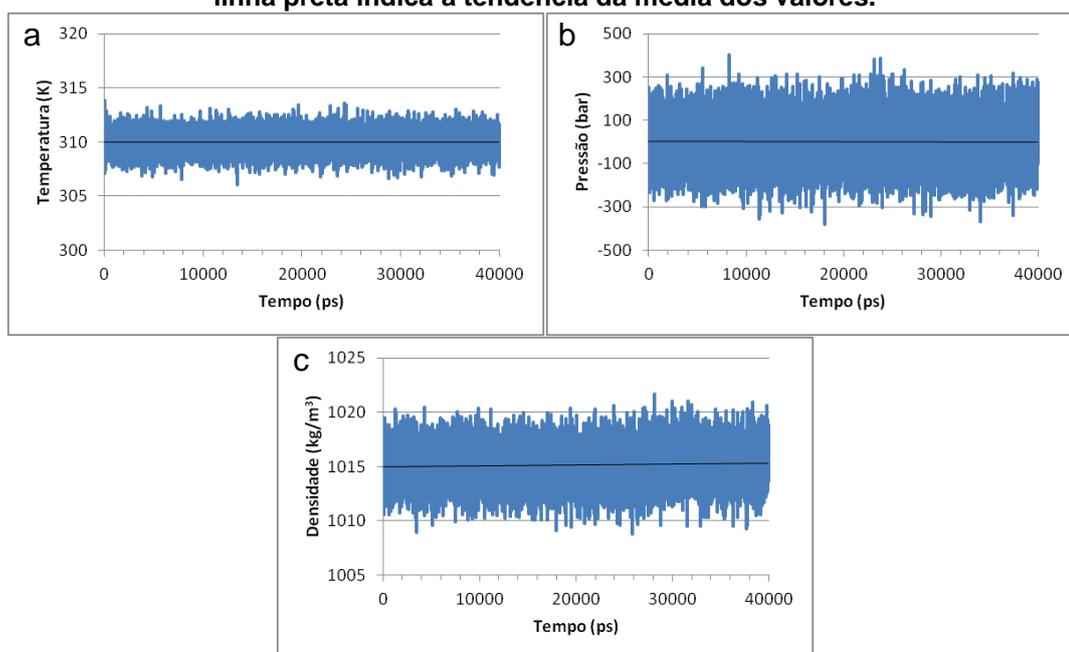
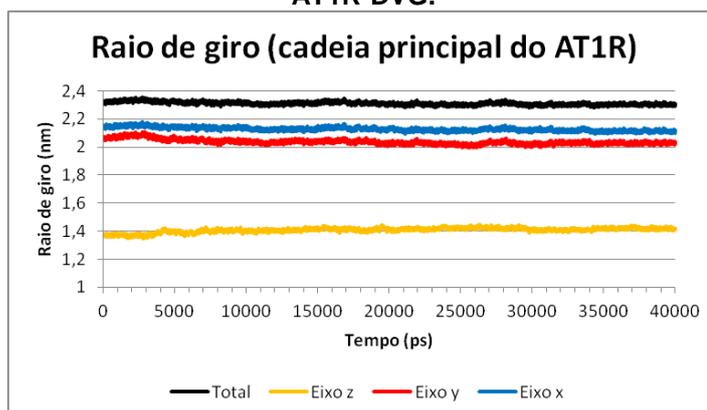


Figura A1.20 - Gráfico de variação de raio de giro da cadeia principal do AT1R nos eixos x (azul), y (vermelho) e z (amarelo) da caixa de simulação pelo tempo da dinâmica do complexo AT1R-DVG.



APÊNDICE 2 – Análise dos campos de interação molecular (MIFs)

Figura A2.1 – Representações da análise de campos de interação molecular do AT1R (fitas cinza) após a simulação de dinâmica molecular com o peptídeo SVdF (cilindro ciano). Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. Em verde estão os campos hidrofóbicos (DRY), em azul as regiões favoráveis para aceptores de ligação de hidrogênio (O) e em magenta as regiões favoráveis para doadores de ligação de hidrogênio (N1). As esferas indicam regiões de coincidência entre o grupamento do ligante e o campo.

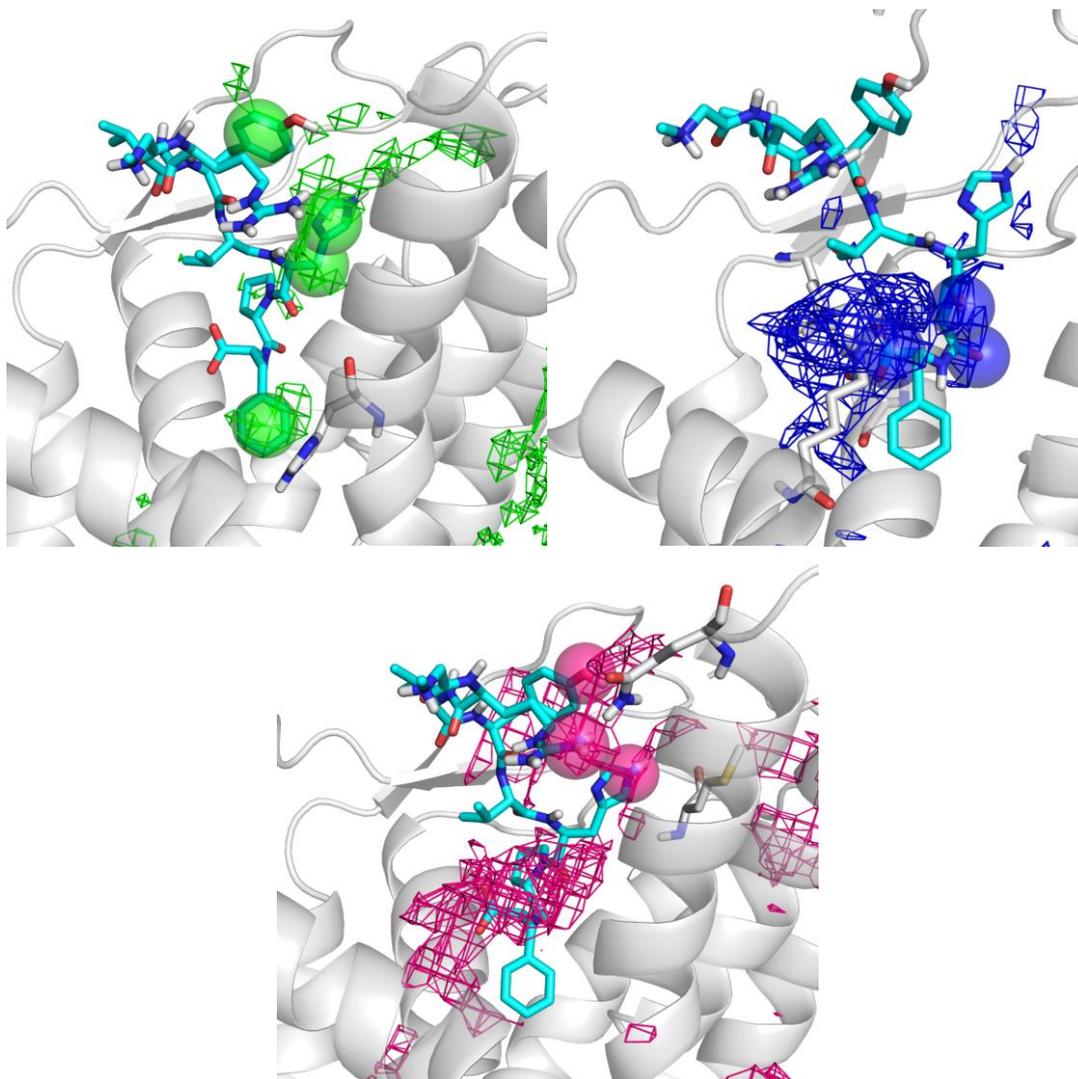


Figura A2.2 – Representações da análise de campos de interação molecular do AT1R (fitas cinza) após a simulação de dinâmica molecular com o peptídeo TRV120027 (cilindro ciano). Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. Em verde estão os campos hidrofóbicos (DRY), em azul as regiões favoráveis para aceptores de ligação de hidrogênio (O) e em magenta as regiões favoráveis para doadores de ligação de hidrogênio (N1). As esferas indicam regiões de coincidência entre o grupamento do ligante e o campo.

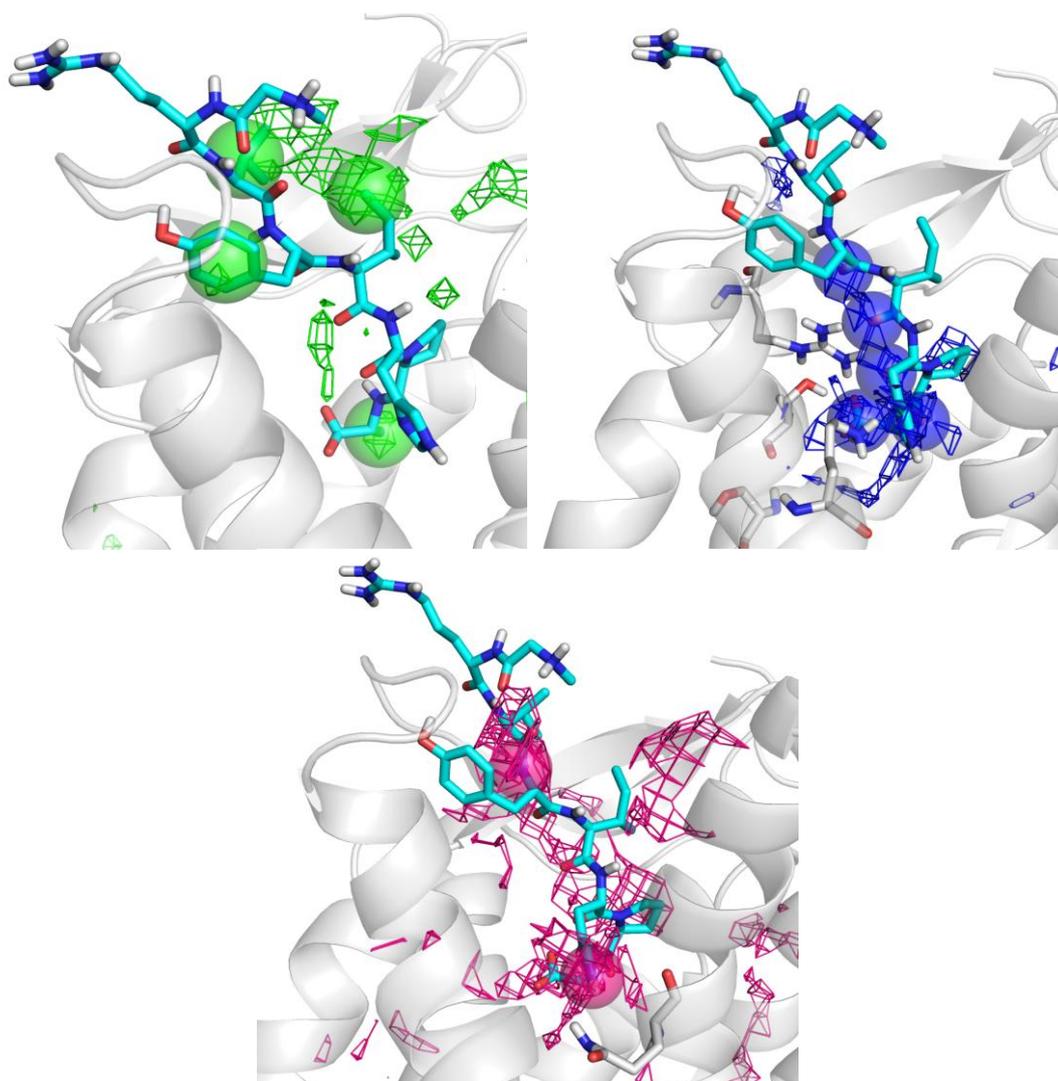


Figura A2.3 – Representações da análise de campos de interação molecular do AT1R (fitas cinza) após a simulação de dinâmica molecular com o peptídeo TRV120023 (cilindro ciano). Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. Em verde estão os campos hidrofóbicos (DRY), em azul as regiões favoráveis para aceptores de ligação de hidrogênio (O) e em magenta as regiões favoráveis para doadores de ligação de hidrogênio (N1). As esferas indicam regiões de coincidência entre o grupamento do ligante e o campo.

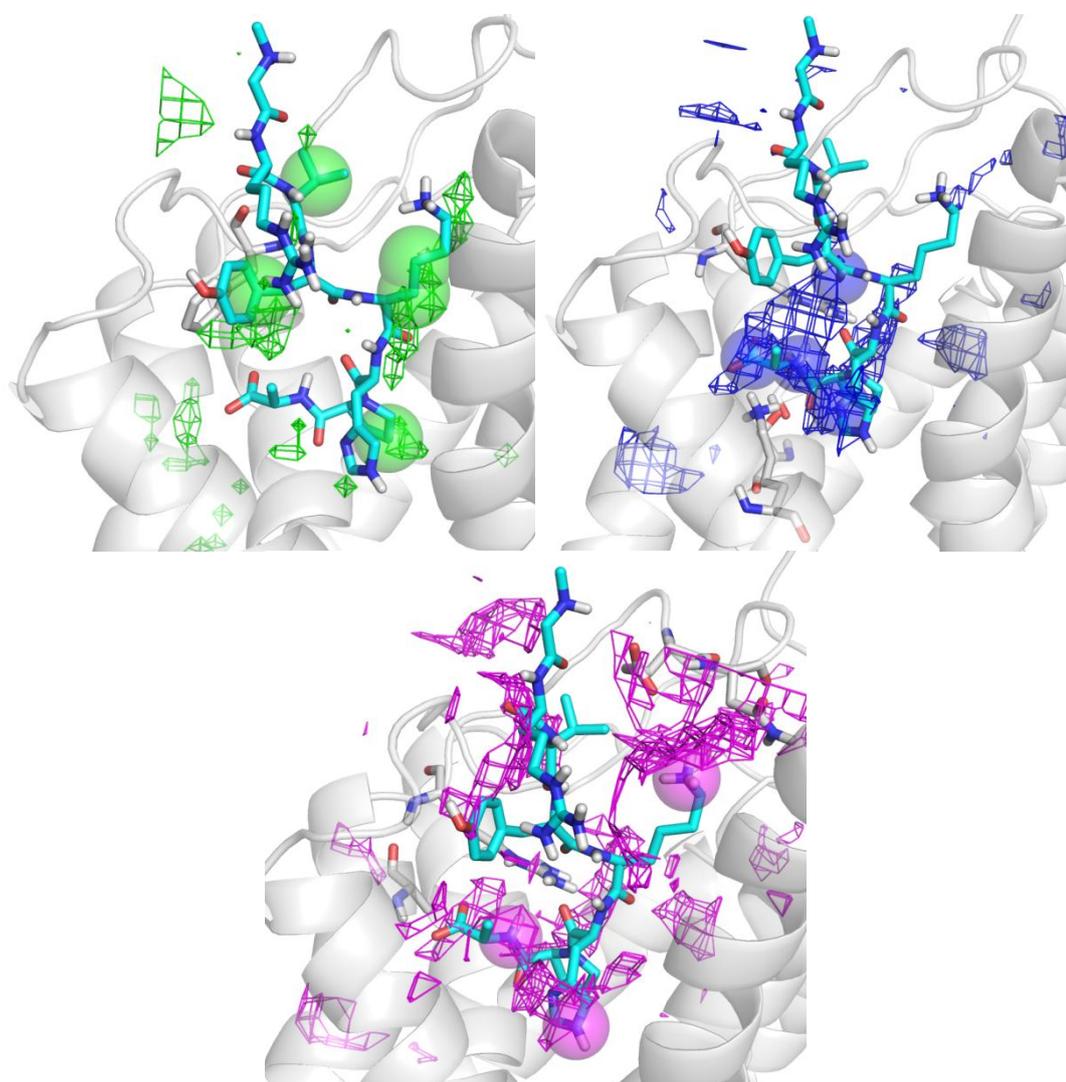


Figura A2.4 – Representações da análise de campos de interação molecular do AT1R (fitas cinza) após a simulação de dinâmica molecular com o peptídeo SII (cilindro ciano). Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. Em verde estão os campos hidrofóbicos (DRY), em azul as regiões favoráveis para aceptores de ligação de hidrogênio (O) e em magenta as regiões favoráveis para doadores de ligação de hidrogênio (N1). As esferas indicam regiões de coincidência entre o grupamento do ligante e o campo.

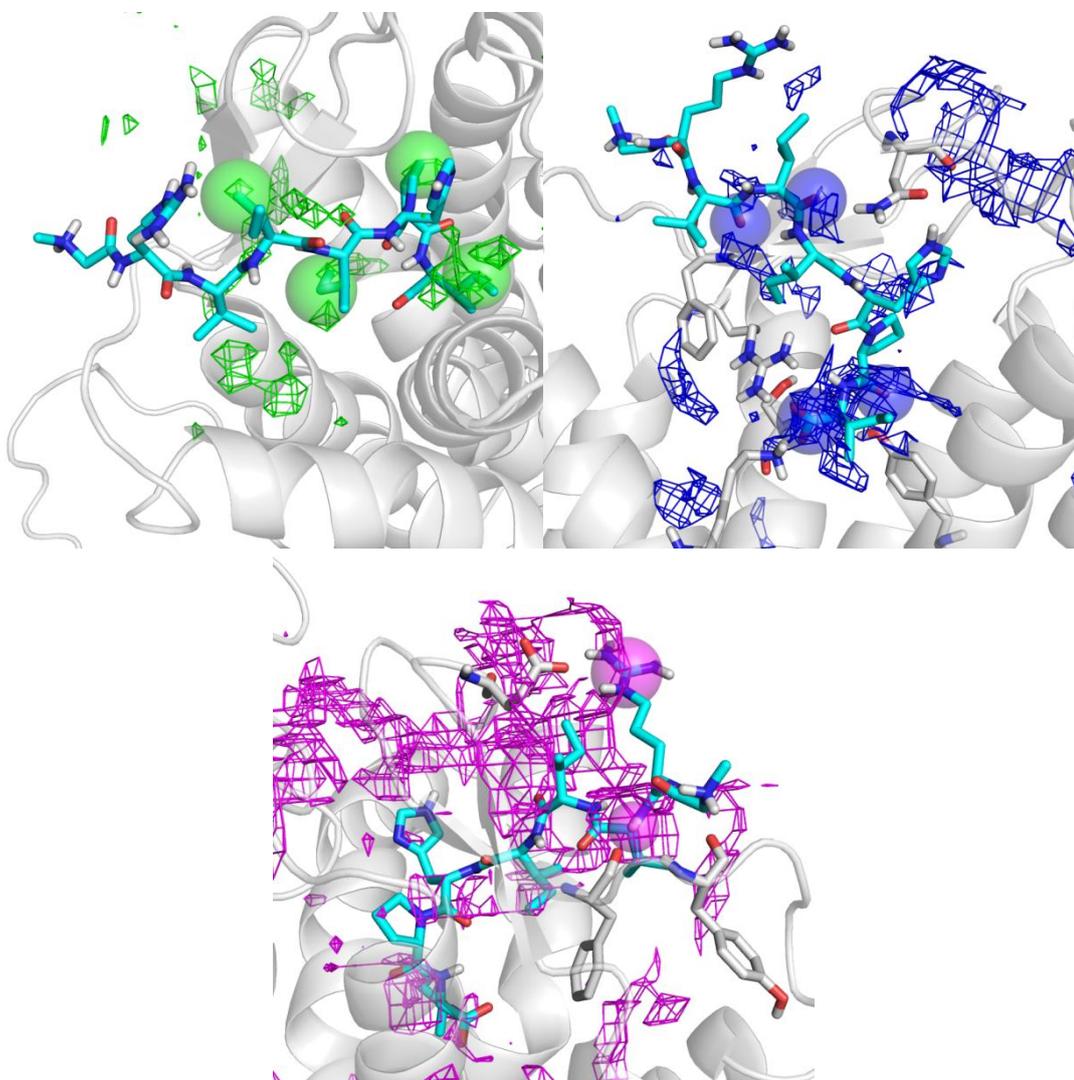


Figura A2.5 – Representações da análise de campos de interação molecular do AT1R (fitas cinza) após a simulação de dinâmica molecular com o peptídeo SI (cilindro ciano). Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. Em verde estão os campos hidrofóbicos (DRY), em azul as regiões favoráveis para aceptores de ligação de hidrogênio (O) e em magenta as regiões favoráveis para doadores de ligação de hidrogênio (N1). As esferas indicam regiões de coincidência entre o grupamento do ligante e o campo.

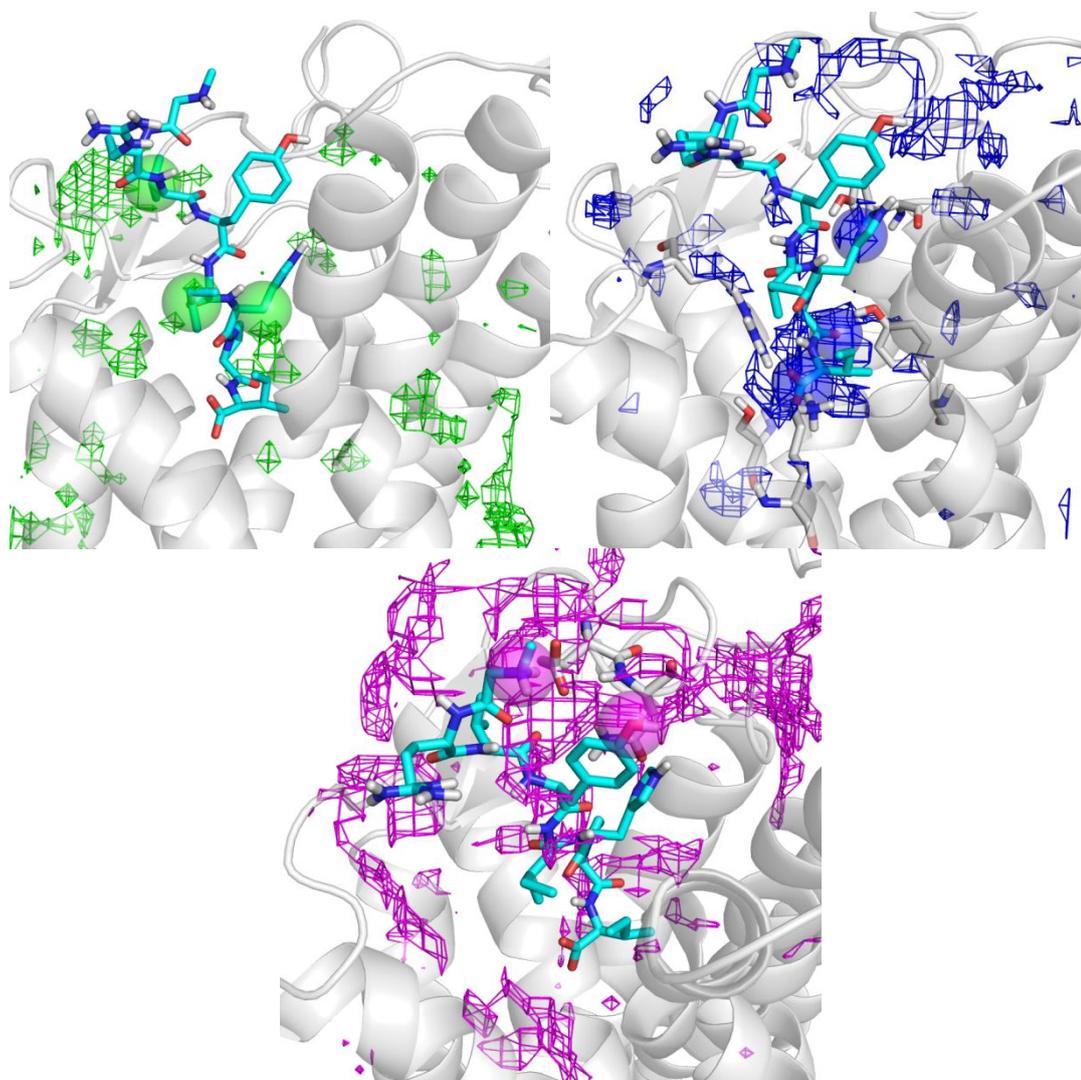
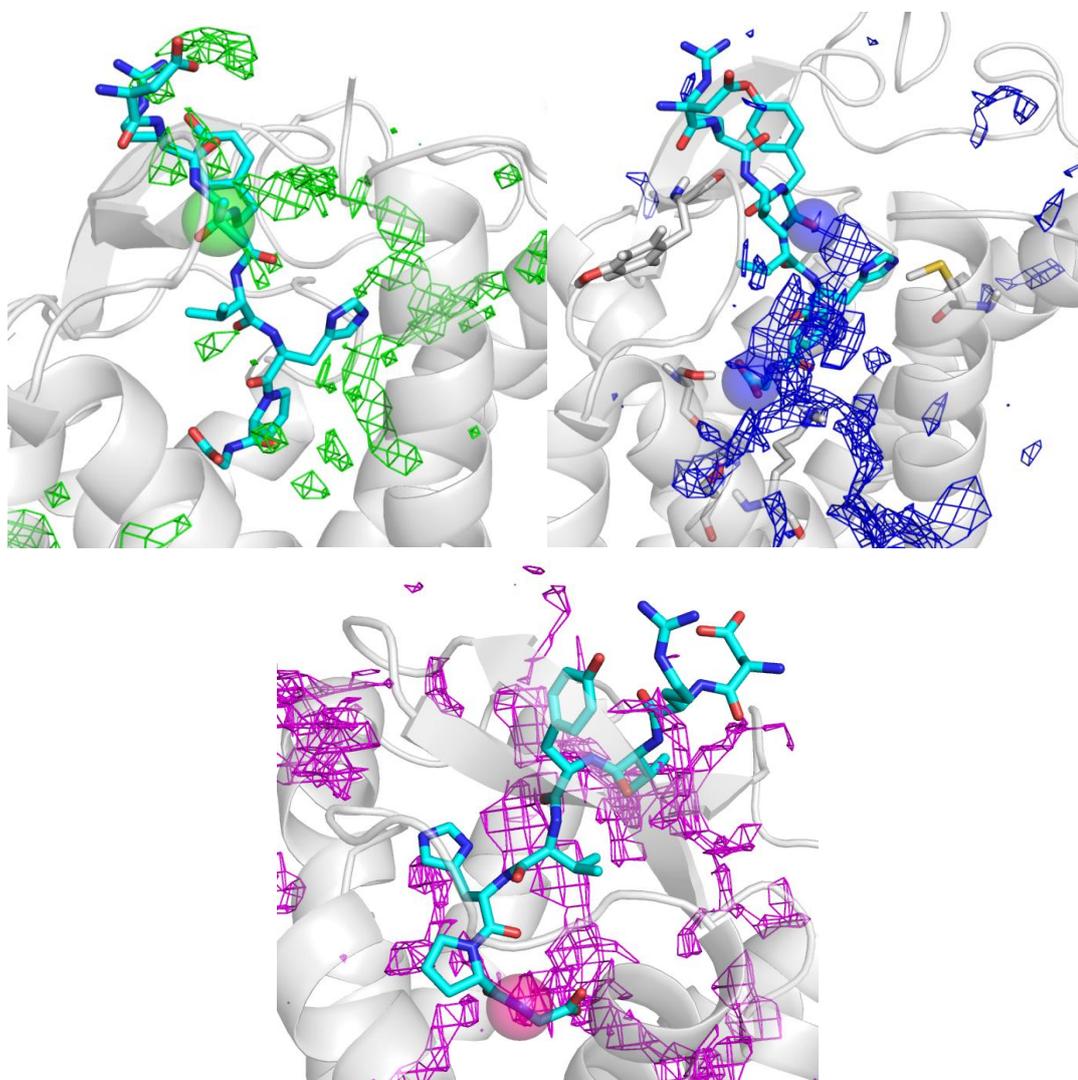
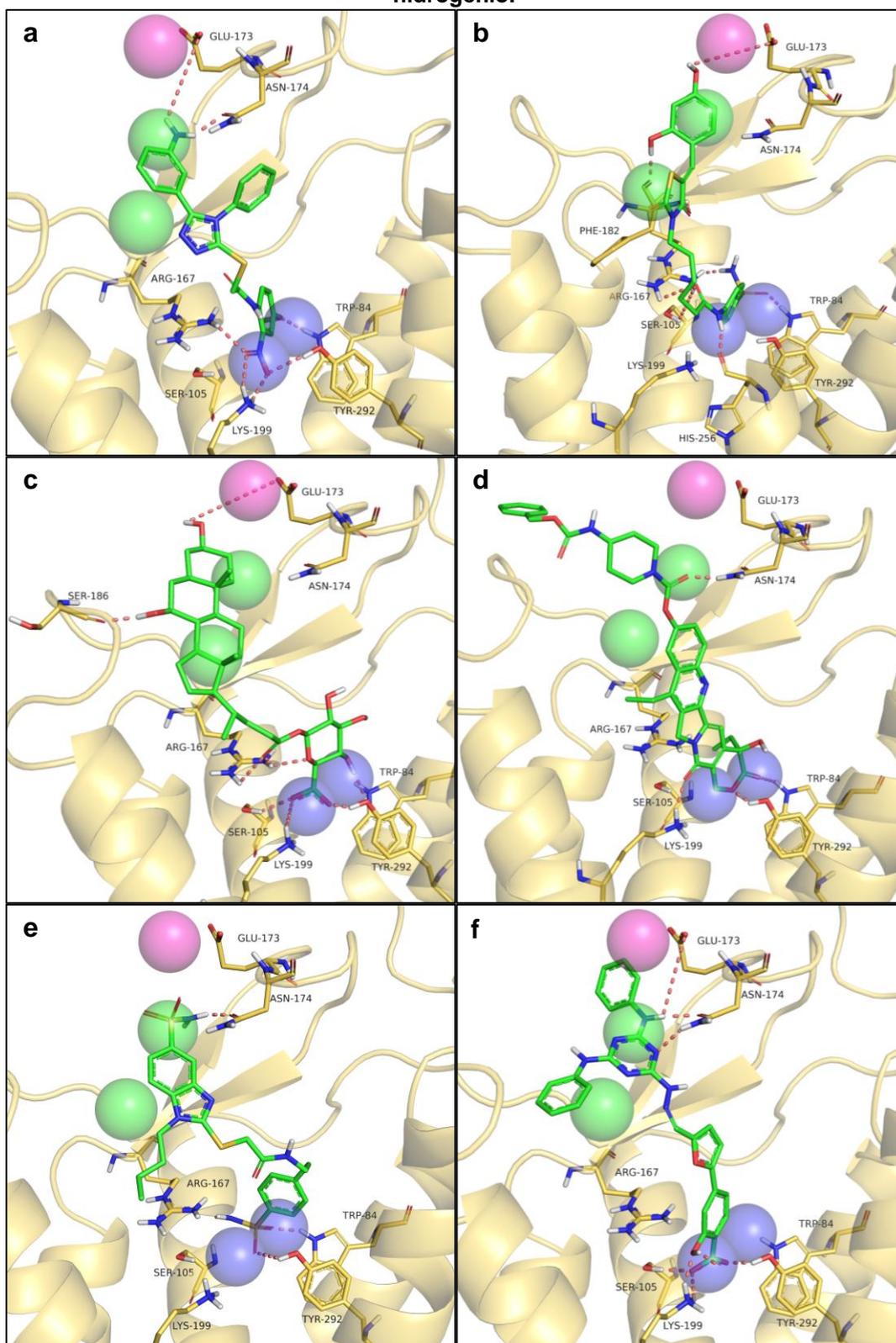


Figura A2.6 – Representações da análise de campos de interação molecular do AT1R (fitas cinza) após a simulação de dinâmica molecular com o peptídeo DVG (cilindro ciano). Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. Em verde estão os campos hidrofóbicos (DRY), em azul as regiões favoráveis para aceptores de ligação de hidrogênio (O) e em magenta as regiões favoráveis para doadores de ligação de hidrogênio (N1). As esferas indicam regiões de coincidência entre o grupamento do ligante e o campo.

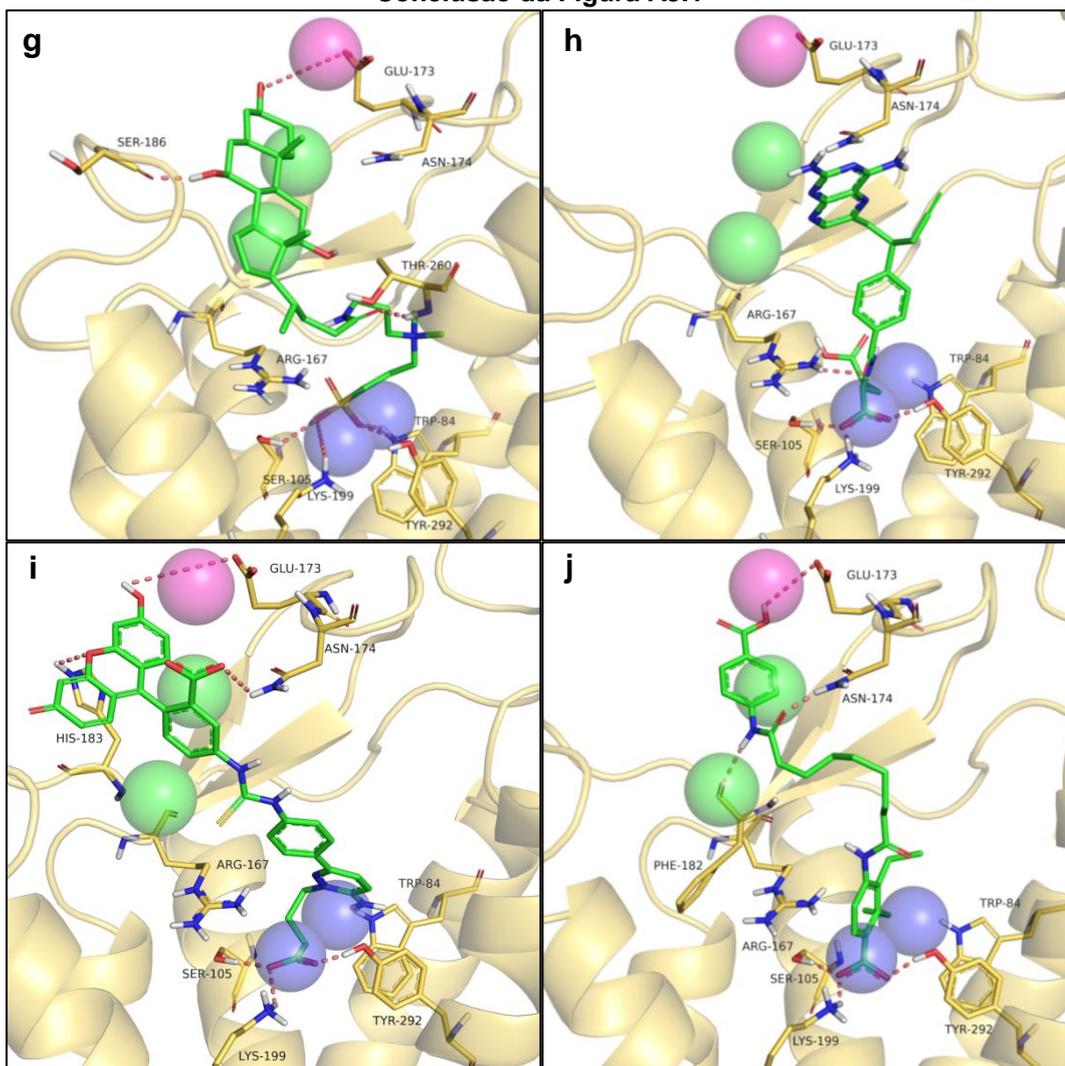


APÊNDICE 3 – Ancoramento das moléculas selecionadas na busca virtual.

Figura A3.1 – Complexos retirados do ancoramento do AT1R com o farmacóforo e as moléculas de número 1 (a), 2 (b), 3 (c), 5 (d), 6 (e), 7 (f), 8 (g), 10 (h), 12 (i) e 15 (j). As esferas representam o farmacóforo. O AT1R está representado em modelo de fitas de cor amarela e os ligantes em cilindro com carbonos em verde. Os nitrogênios estão representados em azul e os oxigênios em vermelho. As linhas laranja pontilhadas indicam possíveis ligações de hidrogênio.



Conclusão da Figura A3.1



ANEXOS

ANEXO A - Cópia do documento Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B – Ficha do Aluno atualizada

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 4403302/1 - Juliana Gallottini de Magalhães

Email: juliana.gallottini.magalhaes@usp.br
Data de Nascimento: 01/01/1990
Cédula de Identidade: RG - 35,635,938-4 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
 Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 26/07/2013
Início da Contagem de Prazo: 26/07/2013
Data Limite para o Depósito: 26/01/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Carlota de Oliveira Rangel Yagui - 26/07/2013 até 30/01/2015.
 Email: corangel@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 26/07/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 28/08/2014
Data do Depósito do Trabalho: 25/11/2014
Título do Trabalho: "Busca virtual de agonistas enviesados não peptídicos do receptor de angiotensina II do tipo 1"
Data Máxima para Aprovação da Banca: 09/01/2015
Data de Aprovação da Banca: 03/12/2014
Data Máxima para Defesa: 18/03/2015
Data da Defesa: 30/01/2015
Resultado da Defesa: Aprovado

Acesso à dissertação/tese: **Banco de Teses da USP**

A titulação é: Somente USP

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013),

Última ocorrência: Titulado em 30/01/2015

Impresso em: 19/03/2015 10:04:46



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 4403302/1 - Juliana Gallottini de Magalhães

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ENC5863-3/4	Prática Pedagógica no Ensino Superior (Escola de Enfermagem - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	11/11/2013	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5777-3/1	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	15/08/2013	27/11/2013	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MPT5760-4/3	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	16/08/2013	17/10/2013	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5786-3/1	Metodologias e Modelagem Molecular no Planejamento de Fármacos	17/09/2013	18/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5754-1/1	Atualização em Ciências Farmacêuticas	21/10/2013	27/10/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5802-1/2	Alvos Bioquímicos no Planejamento de Fármacos	04/02/2014	19/05/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5734-7/3	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico	04/02/2014	19/05/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/02/2014	28/05/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

9138 - 4403302/1 - Juliana Gallottini de Magalhães

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
638825	Carlota de Oliveira Rangel Yagui	FCF - USP	Presidente
494242	Alberto Malvezzi	Externo	Membro
969387	Káthia Maria Honorio	EACH - USP	Membro
5480350	Antonio Sergio Kimus Braz	UFABC - Externo	Membro

Última ocorrência: Titulado em 30/01/2015

Impresso em: 19/03/2015 10:04:46