UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Planejamento e desenvolvimento de ligantes não peptídicos com atividade agonista enviesada no receptor de angiotensina II tipo 1 empregando-se técnicas de modelagem molecular e ensaios *in vitro*

> Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

> Área de concentração: Tecnologia Químico-Farmacêutica.

Doutorando: Silvestre Massimo Modestia

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de O. Rangel-Yagui

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Planejamento e desenvolvimento de ligantes não peptídicos com atividade agonista enviesada no receptor de angiotensina II tipo 1 empregando-se técnicas de modelagem molecular e ensaios *in vitro*

> Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

> Área de concentração: Tecnologia Químico-Farmacêutica.

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 6018/2011

Doutorando: Silvestre Massimo Modestia

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de O. Rangel-Yagui

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M689p	Modestia, Silvestre Massimo Planejamento e desenvolvimento de ligantes não peptídicos com atividade agonista enviesada no receptor de angiotensina II tipo 1 empregando-se técnicas de modelagem molecular e ensaios in vitro / Silvestre Massimo Modestia São Paulo, 2019. 107 p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Yagui, Carlota de Oliveira Rangel
	1. modelagem molecular. 2. agonismo enviesado. 3. receptor de angiotensina II do tipo 1. 4. insuficiência cardíaca. I. T. II. Yagui, Carlota de Oliveira Rangel , orientador.

Silvestre Massimo Modestia

Planejamento e desenvolvimento de ligantes não peptídicos com atividade agonista enviesada no receptor de angiotensina II tipo 1 empregando-se técnicas de modelagem molecular e ensaios *in vitro*.

> Comissão Julgadora da Tese para a obtenção do grau de DOUTOR

> > Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, Giuseppe e Suely. O apoio incondicional de vocês foi fundamental para esse trabalho.

Às minhas irmãs, Bruna e Rúbia. que mesmo estando longe sempre me apoiaram e me encorajaram a seguir em frente.

À minha orientadora, Carlota. Por ser um exemplo de pessoa tanto profissional quanto pessoal e por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela dedicação diária.

Aos meus queridos amigos de laboratório por fazeram meus dias mais alegres, especialmente a Mariana, Iguaracy, Luiz e Agatha.

Aos meus queridos amigos, Sergio e Heloise. por sempre me ajudarem.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Kriger por confiar no meu trabalho.

Ao meu orientador no exterior, Prof. Dr. Gregory R. Bowman.

Aos meus colegas do estágio no exterior, Neha, Sukrit e Maxwell.

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Insuficiência cardíaca	13
2.2. AT1R e agonismo enviesado	14
2.3. Modelagem molecular no estudo conformacional de proteínas	19
2.4. Ensaios de afinidade com radioligantes (ensaios de <i>binding</i>)	21
3. OBJETIVOS	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. Ensaios Computacionais	23
4.1.1. Refinamento do cristal e construção dos ligantes	23
4.1.2. Dinâmica Molecular	
4.1.3. Equilibração	25
4.1.4. Dinâmica molecular de produção	
4.1.5. Seleção de confôrmeros	27
4.1.6. Ancoramento Molecular	27
4.1.7. Dinâmica molecular de complexos	27
4.1.8. Construção de farmacóforo	
4.1.9. Triagem virtual e construção de bases de dados	29
4.2. Ensaios experimentais	30
4.2.1. Células AT1R competentes	30
4.2.2. Cultivo e manutenção de células HEK-293	31
4.2.3. Ensaio de afinidade (<i>binding</i>)	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	

5.1. Refinamento da estrutura do cristal do AT1R 32
5.2. Dinâmica molecular 34
5.3. Seleção de confôrmeros 39
5.4. Ancoramento molecular 39
5.5. Simulated Annealing
5.6. Análises de dinâmica Molecular 48
5.6.1. Angiotensina II 48
5.6.2. TRV027 48
5.6.3. Comparação entre os três sistemas 50
5.6.4. Comparação com o cristal 6DO161
5.7. Hipótese sobre o modo de ligação68
5.8. Seleção de confôrmero70
5.9. Farmacóforo72
5.10. Triagem virtual 76
5.7. Ensaios de afinidade 80
5.7.1. Piloto do ensaio de binding 81
5.7.2. Ensaio de binding 82
6. CONCLUSÃO
7. PERSPECTIVAS
8. ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDA
9. REFERÊNCIAS
10. MATERIAL SUPLEMENTAR97

LISTA DE ABREVIATURAS

AngII	Angiotensina II					
AT1R	Angiotensin II Type 1 Receptor (Receptor de Angiotensina II do tipo 1)					
AT2R	Angiotensin II Type 2 Receptor (Receptor de Angiotensina II do tipo 2)					
BRET	Bioluminescense Ressonance Energy-Transfer (Transferência de energia da					
	da bioluminescência ressonância da bioluminescência)					
DM	Dinâmica Molecular					
DAG	Diacilglicerol					
DEER	Double Electron-Electron Ressoance (Ressonância Dupla Elétron-Elétron)					
ECL	Extracellular Loop (Alça Extracelular)					
eGFP	Enhanced Green Fluorecent Protein (Proteína verde fluorescente)					
FRET	Fluorescence Ressoance Energy Transfer (Transferência de energia de					
	fluorescência ressonância)					
ICL	Intracellular Loop (Alça Intracelular)					
IC	Insuficiência cardíaca					
GPCR	G Protein Coupled Receptor (Receptor Acoplado à Proteína G)					
GRK	Quinase de receptores acoplados a proteína G					
LBDD	Ligand Based Drug Design (Planejamento baseado na estrutura do ligante)					
PDB	Protein databank					
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato					
РКС	Proteína kinase C					
PLC	Fosfolipase C					
RMSD	Desvio quadrático médio das posições atômicas					
RMSF	Flutuação do desvio quadrático médio					
SA	Simulated Annealing					
SAR	Sarcosina					
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia					
SBDD	Structure Based Drug Design (Planejamento baseado na estrutura do receptor)					
SUS	Sistema Único de Saúde					
TM	Transmembrana					

RESUMO

MODESTIA S. M. Planejamento e desenvolvimento de ligantes não peptídicos com atividade agonista enviesada no receptor de angiotensina II tipo 1 empregando-se técnicas de modelagem molecular e ensaios *in vitro*. 2019. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome de elevada morbimortalidade, correspondendo a um grave problema de saúde pública. Uma das abordagens terapêuticas para IC consiste no uso de antagonistas do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R), conhecidos como sartanas. Estudos apontam que uma nova classe de compostos, os agonistas enviesados, é capaz de induzir a sinalização da via da β-arrestina sem ativação da via da proteína G. Essa seletividade funcional é particularmente interessante, pois a via dependente da proteína G é responsável pelo aumento da pressão arterial, morte celular e fibrose tecidual, levando a hipertrofia cardíaca e progressão da IC. No entanto, a via da β-arrestina está associada com renovação celular e aumento do inotropismo. Além disso, estudos in vivo sugerem que agonistas enviesados poderiam corresponder a uma terapia superior à dos antagonistas convencionais, que bloqueiam ambas as vias. Apesar do potencial terapêutico, esses compostos possuem estrutura peptídica e, por isso, tem sua administração restrita à via intravenosa. A resolução da estrutura cristalográfica do AT1R permitiu estudos de modelagem molecular mais acurados. Tendo isso em mente, nesse trabalho foram propostos agonistas enviesados de natureza não peptídica para o AT1R por meio de técnicas de modelagem molecular e validação das hipóteses levantadas por ensaios in vitro. Foram realizados estudos de dinâmica molecular com o AT1R (PDB ID: 4YAY) em uma bicamada lipídica e ensaios de ancoramento molecular da angiotensina II (AngII) e do ligante enviesado TRV027. As poses de ancoramento molecular selecionadas foram utilizadas em dinâmicas de complexo, que revelaram diferenças entre os sistemas apo (sem nenhum ligante) e holo (com o ligante no sitio de ligação). Nossos resultados sugerem que o TRV027 induz um padrão exclusivo de ligações de hidrogênio e de estrutura secundária, enquanto que a AngII afeta os resíduos do bolso hidrofóbico do sitio de ligação, principalmente a conformação do Trp253^{6.48}. Com base nas simulações, três farmacóforos foram criados e utilizados de maneira complementar em triagens virtuais na base de dados ZINC15, resultando na seleção de cinco compostos. Um desses compostos apresentou afinidade pelo receptor AT1R e, ainda que estudos complementares de ativação de vias especificas sejam necessários para que o composto possa ser classificado como agonista enviesado, já se constitui em molécula potencialmente promissora. Além disso, esses estudos permitiram a proposição de estruturas inéditas que podem vir a ser hits no processo de desenvolvimento de agonistas enviesados para AT1R. Portanto, como continuidade desse trabalho, essas moléculas serão sintetizadas e investigadas quanto à possível interação com o receptor.

Palavras-chave: modelagem molecular, agonismo enviesado, receptor de angiotensina II do tipo 1, insuficiência cardíaca.

ABSTRACT

MODESTIA S. M. Drug design of non-peptidic biased agonists for angiotensin II type 1 receptor using molecular modeling techniques and in vitro tests. 2019. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Heart Failure (HF) is a common syndrome with high morbimortality, being considered a serious public health problem. One of the therapeutic approaches for HF consists in the use of the sartan class, which are angiotensin II type 1 receptor (AT1R) antagonists. Recent studies have shown that a new class of compounds, known as biased agonists, is able to induce signaling via βarrestin without G-protein activation. This functional selectivity is particularly interesting since G-protein dependent signaling is responsible for cell death and cardiac tissue fibrosis, which leads to cardiac muscle hypertophy and HF progression. On the other hand, β -arrestin signaling is associated with cellular renewal and increased inotropism. In vivo studies suggests that biased agonists could correspond to a superior therapy over conventional angiotensin II type 1 receptor antagonists, which blocks cell signaling as a whole, however their peptidic structure restricts their use to intravenous administration. Moreover, the AT1R crystal structure determination holds great promise for more accurate molecular modeling studies. With that being said, the aim of this work was to plan and develop new non-peptidic biased agonists for ATR1 employing molecular modeling techniques and in vitro tests for hypothesis validation. Molecular dynamics (MD) simulations of the refined AT1R crystal (PDB ID: 4YAY) embedded in a lipid bilayer and molecular docking studies with angiotensin II (AngII) and TRV027 (biased agonist) were conducted. Selected docking poses from both ligands underwent complex MD simulations revealing differences between apo (ligand free) and holo (ligand in the binding site) systems. Our results suggest that TRV027 induces an exclusive hydrogen bond and secondary structure pattern, while AngII affects the hydrophobic pocket conformation, mainly Trp253. Based on the simulations, three pharmacophore models were created and used in virtual screenings in the ZINC15 database, resulting in the selection of five compounds that were tested in vitro. One of the compounds displayed affinity for AT1R and is a promising molecule. Nonetheless, it needs further pathway activation characterization in order to be a classified as a biased agonist. Furthermore, these results have contributed significantly for the proposition of new structures that could be hits with biased agonist activity for AT1R. Thus, for future works, we point out the necessity for synthesis and characterization of this new compounds.

Keywords: molecular modeling, biased agonism, angiotensin II type 1 receptor, heart failure.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A resolução de problemas de eficácia e segurança de fármacos e medicamentos, bem como a busca por novas terapias, são alguns dos objetivos das ciências farmacêuticas. Na área de cardiologia, alguns desafios precisam ser superados quanto ao uso de bloqueadores do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R) na insuficiência cardíaca. Esses antagonistas compreendem a classe das sartanas, utilizadas no tratamento da hipertrofia cardíaca e hipertensão, que fazem parte da síndrome da insuficiência cardíaca. Mesmo apresentando eficácia na diminuição da pressão sanguínea, o uso de antagonistas de AT1R provoca um efeito inotrópico negativo, ou seja, resulta na diminuição da força de contração do músculo cardíaco. Esse efeito secundário é prejudicial, principalmente em pacientes com insuficiência cardíaca, pois leva a progressão da doença (Porth, 2011, Metra *et al.*, 2017, SBC, 2019).

Quando o agonista pleno se liga ao AT1R, um receptor acoplado à proteína G (GPCR), acredita-se que a via iniciada pela proteína G seja responsável pelo aumento da pressão sanguínea e hipertrofia cardíaca, enquanto que a via da β -arrestina seja responsável pelo processo de renovação celular e o efeito inotrópico positivo. Em contrapartida, as sartanas impedem ambas as vias de sinalização, provocando a diminuição da pressão sanguínea, por inibição da via da proteína G, mas também provocam efeitos indesejados, por inibição da via da β -arrestina (Brunton, 2012).

A descoberta de compostos capazes de se ligarem ao AT1R e ativarem exclusivamente a via da β -arrestina, resultou na criação de uma nova classe de compostos, os agonistas enviesados (Violin et al., 2014). Desse modo, esses novos agonistas seriam capazes de diminuir a pressão sanguínea sem causar o efeito inotrópico negativo, pois a via da β -arrestina é ativada, podendo corresponder a uma terapia superior às sartanas (Granier, *et al.*, 2012).

Até o momento, todos os agonistas enviesados conhecidos para o AT1R são peptídeos baseados na estrutura da angiotensina II. O mais ativo destes compostos, o TRV1200027 (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala), chegou a ser testado em ensaios clínicos de fase II por uma empresa especializada em fármacos com atividade enviesada, a Trevena Inc (Pang *et al.*, 2017). Apesar do potencial desses compostos, algumas limitações farmacocinéticas precisam ser superadas. Por ser um peptídeo, o composto TRV1200027 apresenta uma meia-vida de apenas dois minutos e não pode ser administrado por via oral, sendo, portanto, limitado ao ambiente hospitalar. Desta forma, a descoberta de outros agonistas enviesados de natureza não peptídica para o AT1R é de extrema relevância e teria grande impacto no tratamento da insuficiência cardíaca. Nesse sentido, o emprego de técnicas computacionais, como a triagem virtual, associadas a técnicas experimentais, corresponde a uma alternativa viável para a descoberta de agonistas enviesados não peptídicos para o AT1R.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é definida como uma complexa síndrome resultante de qualquer desordem funcional ou estrutural do coração que cause o desenvolvimento de um baixo débito cardíaco. Essa capacidade reduzida de bombear sangue compromete as necessidades metabólicas do organismo, podendo levar à morte. A IC não é uma doença isolada, consistindo na via final de comorbidades, como hipertensão arterial sistêmica, diabetes *melitus*, doença de Chagas e coronariopatias. (Nogueira *et al.*, 2010; Brunton, 2012; Metra *et al.*, 2017; SBC, 2019).

A prevalência da IC aumentou nas últimas cinco décadas e, ainda hoje, a mortalidade pode ultrapassar 50% em 5 anos, a partir do momento do diagnóstico (Mozaffarian *et al.*, 2016). Estudos de prevalência estimam que 23 milhões de pessoas no mundo tenham essa síndrome e que dois milhões de casos novos sejam diagnosticados anualmente. Além dos custos diretos relacionados às frequentes internações, a IC também é responsável por aposentadorias precoces e significante perda de qualidade de vida. Nos Estados Unidos, estima-se que os custos foram de 30,7 bilhões de dólares em 2012, sendo 68% desse valor atribuído a custos médicos diretos e o restante à morbidade da doença (Heidenreich *et al.*, 2013).

Por ser uma via final de outras patologias, a incidência de IC aumenta com o envelhecimento da população. Somente nos Estados Unidos, estima-se que 5,8 milhões de pessoas tenham IC e que a incidência seja de mais de 915.000 casos por ano (Mozaffarian *et al.*, 2016). De fato, no Brasil, a IC já é a principal causa de internação pelo SUS (Sistema Único de Saúde) em pacientes acima de 60 anos (SBC, 2019). Projeções indicam que em 2025 o Brasil terá a sexta maior população de idosos do mundo (Nogueira *et al.*, 2010) e que essa síndrome será a principal causa mundial de morte por doença cardiovascular. Por esses motivos, a IC é considerada um grave problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Desde a década de 50, diversos fármacos foram introduzidos na terapêutica de IC, inicialmente com o intuito de apenas amenizar os sintomas e, posteriormente, focando na diminuição da progressão da doença (Porth, 2011). Os fármacos utilizados na terapêutica incluem: inibidores da enzima conversora de Angiotensina (ECA),

digitálicos, diuréticos, antagonistas de aldosterona, bloqueadores β -adrenérgicos, vasodilatadores, antagonistas de canais de cálcio, antiarrítmicos, anticoagulantes e os antagonistas do receptor de angiotensina II, as chamadas sartanas (SBC 2019).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é um eixo endócrino responsável pela regulação da pressão e balanço eletrolítico do nosso organismo. Uma das abordagens terapêuticas para IC, consiste no bloqueio da sinalização do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R, *Angiotensin II Type 1 Receptor*). A interação da angiotensina II (AngII, Figura 1) com o AT1R resulta em resposta inotrópica positiva no músculo cardíaco, hipertrofia cardíaca e aumento da pressão arterial. A losartana, composto protótipo da classe das sartanas, age antagonizando os efeitos sistêmicos da angiotensina II (AngII). Apesar da diminuição da hipertrofia cardíaca e pressão sanguínea ser benéfica, o efeito inotrópico negativo pode ser prejudicial para pacientes com IC pois agrava a deficiência (Belmonte *et al.*, 2012).



Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-Pro7-Phe8

Figura 1. Estrutura molecular e sequência de aminoácidos do hormônio angiotensina II.

2.2. O Receptor de Angiotensina II do Tipo 1 (AT1R)

O AT1R pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCR – *G protein-coupled receptor*), que enviam sinal intracelular a partir da interação com um ligante ou estímulo presente no meio extracelular, desencadeando uma cascata de sinalização. O AT1R faz parte da família mais populosa de GPCRs: os receptores semelhantes à rodopsina. Esses receptores são caracterizados pelos sete domínios transmembrana em α -hélice (TM 1-7), três alças extracelulares (*extracellular loop*, ECL 1-3), três alças intracelulares (*intracellular loop*, IL1-3) e as porções N-terminal e C- terminal (Venkatakrishnam *et al.*, 2013). Recentemente a estrutura do AT1R foi resolvida por cristalografia de fase lipídica (Figura 2) revelando a posição de diversos resíduos conservados e o modo de ligação de antagonistas (ZD7155 e olmesartana, Zhang *et al.*, 2015a, Zhang *et al.*, 2015b). Apesar da diferença de número e sequência de aminoácidos entre os receptores, GPCRs compartilham grupos de resíduos altamente conservados com funções bem definidas, os chamados motivos. Para facilitar a comparação entre GCPRs adotaremos a nomenclatura de Ballesteros-Weinstein (Ballesteros and Weinstein, 1995), que atribui dois números para cada aminoácido. O primeiro número identifica o domínio ao qual o aminoácido pertence e o segundo indica a posição em relação ao aminoácido mais conservado da hélice, o resíduo 50. Desta forma, por exemplo, o Asp125^{3.49} corresponde ao Asp125 que antecede o resíduo mais conservado na hélice 3 (TM3), a Arg126^{3.50}.



Figura 2. Estrutura do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R, código PDB: 4YAY) obtido por cristalografia, mostrando os sete domínios transmembrana (7TM) em α -hélice característicos da classe das GPCRs. Ao lado esquerdo, encontra-se a divisão estrutural do AT1R com os respectivos intervalos de resíduos pertencentes à cada domínio. Representação na forma de *cartoon*.

A sinalização celular do AT1R (Figura 3) começa com a ligação da angiotensina II, provocando a estabilização da conformação capaz de se ligar à proteína G heterotrimérica (Dewire *et al.*, 2007). A proteína G então se dissocia em um dímero ($\beta\gamma$) e na subunidade α_q , que ativa a fosfolipase C (PLC). A ativação da PLC resulta na liberação de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃, por sua vez, provoca aumento dos níveis intracelulares de cálcio, provocando a ativação da proteína quinase C, PKC (junto com o DAG). A continuação dessa cascata resulta nas respostas celulares anteriormente citadas, como a vasoconstrição (Aplin *et al.*, 2009).

Logo após a ativação, os GPCRs são prontamente fosforilados por quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs) e se ligam a proteínas da classe das β -arrestinas. Essa ligação impede a interação receptor/proteína G, interrompendo a sinalização do receptor, processo chamado de dessensibilização. Por fim, a β -arrestina ainda ativa outras vias que resultam na internalização do receptor.



Figura 3. Cascata de sinalização do AT1R segundo o paradigma clássico. A ligação da AngII provoca a estabilização da conformação do receptor capaz de levar à ligação e ativação da proteína G heterotrimérica (G_{αq}). A proteína G, então, ativa a fosfolipase C (PLC), que gera trifosfato de inositol (IP₃). Este segundo mensageiro provoca o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺, consequentemente, ativando a proteína quinase C dependente de cálcio (PKC). A cascata de sinalização continua e resulta nos efeitos biológicos descritos anteriormente. Uma vez ativados, os GPCRs são rapidamente fosforilados por quinases de receptores acoplados à proteína G (GRK – *G protein-coupled receptor kinases*) e se ligam a proteínas da classe das β-arrestinas (β-Arr2). Este processo interfere com a interação do receptor, a β-Arr2, também promove a internalização do receptor (adaptado de Godin *et al.,* 2012).

Estudos demostraram que ligantes são capazes de ativar a via da β -arrestina de forma independente da ativação da proteína G e vice-versa, resultando em vias de sinalização e respostas biológicas distintas (Kenakin, *et al.*, 2005). Estudos com mutantes do AT1R indicam que essa ativação seletiva poderia ocorrer tanto pela falta de

capacidade de ativar a proteína G, quanto por uma maior afinidade do receptor pela β arrestina (Granier; Kobilka, 2012). A observação de fenômenos similares em diferentes GPCRs, como o receptor β -adrenérgico e μ -opióide, levou ao desenvolvimento do termo seletividade funcional ou agonismo enviesado (Violin *et al.*, 2014; Granier *et al.*, 2012).

O primeiro agonista enviesado para o AT1R, um peptídeo baseado na Ang II denominado SII [(Sar¹,Ile⁴,Ile⁸)-AngII], foi capaz de ativar a ERK (segundo mensageiro da cascata de sinalização da β-arrestina) de modo independente da ativação da proteína G (Wei et al., 2003). Apesar de apresentar baixa afinidade pelo receptor quando comparado à AngII (Holloway et al., 2002), o peptídeo SII possibilitou a descoberta de [(Sar¹,Lys⁵,Ala⁸)-AngII] dois agonistas enviesados, TRV1200023 novos e TRV1200027 [(Sar¹,D-Ala⁸)-AngII], com maior afinidade pelo receptor (Violin *et al.*, 2010). Outros peptídeos com ação enviesada foram descritos mais recentemente, porém, com afinidade inferior aos já descritos (Zimmeramann et al., 2012 e Rajagopal et al., 2011, St-Pierre et al., 2018).

Esta seletividade funcional do AT1R é particularmente interessante porque a componente dependente de proteína G (Figura 4) é responsável pelo desenvolvimento de morte celular e fibrose tecidual, o que leva à hipertrofia cardíaca deletéria e a progressão à insuficiência cardíaca. Por outro lado, a sinalização seletiva da via da β -arrestina está associada com fenótipos como renovação celular e regulação de contrações musculares (Boerrigter *et, al.,* 2011). Portanto, compostos capazes de ativar apenas a via da β -arrestina poderiam corresponder a uma nova estratégia terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares (Violin *et al.,* 2014).

O composto mais potente, o TRV120027 (TRV027), chegou a etapa de ensaios clínicos de Fase II para o tratamento de insuficiência cardíaca aguda descompensada (Trevena Inc., NCT01187836; NCT01444872, 2012). No entanto, o TRV027 não provocou melhoras clínicas quando comparado ao placebo ao longo de 30 dias (Pang *et al.*, 2017). Liu e colaboradores apontam que agonistas enviesados específicos para a via da β -arrestina1, como o TRV027, ativam o receptor transiente de cálcio da subfamília 3 (TRPC3), resultando na liberação de catecolaminas que provocam um aumento da pressão arterial. (Liu et al., 2018). Alternativamente, compostos que ativem seletivamente a via da β -arrestina2 exclusivamente, como o TRV067, mostraram a

capacidade de melhora de função cardíaca *in vitro* e ainda correspondem a uma possível alternativa às sartanas (Ryba *et al.*, 2017).



Figura 4. Diferentes efeitos de ligantes sobre o AT1R (adaptado de Aplin et al., 2009).

Apesar do potencial representado pelos agonistas enviesados, sua natureza peptídica os torna farmacocineticamente inviáveis por via oral devido à degradação por peptidases gástricas, o que os limita ao ambiente hospitalar (Soergel *et al.*, 2013). Desta forma, o entendimento dos requisitos estruturais que levam ao agonismo enviesado é informação fundamental para o planejamento de novos compostos capazes de ativar somente a via da β -arrestina.

A obtenção dos cristais do AT1R com um antagonista (ZD7155) e um agonista inverso (olmesartana) corresponderam a uma oportunidade para estudos mais precisos na área de modelagem molecular (Zhang *et al.*, 2015a, Zhang *et al.*, 2015b), pois as estruturas obtidas por cristalografia são as mais confiáveis para o início de estudos de modelagem molecular (Leach, 2003). Até então, modelos de homologia baseados na estrutura de outros cristais, como o CXCR4 (Zhou, *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2010), eram usados para modelar o AT1R. No entanto, como as sartanas possuem um modo de ligação exclusivo (Unal *et al.*, 2010), o conhecimento sobre o modo de ligação de peptídeos dependia de estudos de mutagênese, ensaios bioquímicos e estudos farmacológicos (Fillion *et al.*, 2013). Paralelamente ao nosso trabalho, o AT1R teve sua estrutura resolvida com o agonista parcial S118 ([Sar¹, Leu⁸]AngII), PDB ID: 6DO1, Wingler *et al.*, 2019b), o que corresponde a um marco para a compreensão do modo de ligação de peptídeos.

2.3. Modelagem molecular no estudo conformacional de proteínas

A modelagem molecular é uma alternativa cada vez mais viável e econômica no processo de introdução de um novo fármaco no mercado. Isso se deve aos constantes avanços em diversas áreas, como a caracterização de biomacromoléculas, conhecimento de processos bioquímicos envolvidos nas bases moleculares das doenças e, principalmente, da ciência computacional (Katrizky *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2006).

Segundo a IUPAC, a modelagem molecular é definida como a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional de um sistema, sob um dado conjunto de circunstâncias. Nesta definição se encaixam os sistemas biológicos como os envolvidos na interação fármaco-biomacromolécula alvo (receptor, enzima, ácido nucléico e canais de íons). A modelagem molecular pode ser dividida em duas vertentes, o planejamento indireto ou independente do receptor (*Ligand Based Drug Design*, LBDD), que se vale somente da estrutura dos ligantes disponíveis, e o planejamento direto ou dependente do receptor (*Structure Based Drug Design* SBDD), que utiliza a estrutura tridimensional da biomacromolécula alvo em complexo com a micromolécula, (Cohen *et al.*, 1996; Wermuth, 2007).

O ancoramento molecular, ou *docking*, é uma técnica comumente utilizada na abordagem de SBDD. Ela permite o estudo da interação entre uma micromolécula e uma biomacromolécula por fornecer uma predição da estrutura do complexo fármaco-receptor, a chamada pose de *docking*. O ancoramento molecular envolve duas etapas básicas: a primeira consiste na predição da conformação, posição e orientação do ligante no sitio de ligação da proteína e a segunda na avaliação da afinidade pelo receptor. Essas duas etapas podem ser sumarizadas como método de amostragem de confôrmeros e estimação da afinidade da pose pelo receptor, respectivamente (Meng *et al.*, 2011). As funções de *score* baseadas em campos de força fazem uma estimativa dessa afinidade do ligante pelo receptor calculando a soma das interações do tipo não ligada (eletrostática e *van der Waals*). Alguns programas, como o GOLD, consideram ainda ligações de hidrogênio, solvatação e até alguns termos entrópicos, entretanto, a capacidade preditiva destas funções continua longe do ideal (Cheng *et al.*, 2015). Outra limitação desta técnica diz respeito ao tratamento da biomacromolécula, que é considerada rígida ou semirrígida, durante o ancoramento. Para contornar esse

problema, pode-se realizar o ancoramento em um conjunto de confôrmeros da proteína, o chamado *ensemble docking* (Korb *et al.*, 2012), ou ainda se recorrer a outras técnicas que permitam estudar a flexibilidade de complexos, como a dinâmica molecular.

As simulações de dinâmica molecular (DM) correspondem a uma técnica versátil e tem se tornado ferramenta indispensável no estudo estrutural de modelos de biomoléculas para complementar os dados experimentais. De fato, atualmente a DM permite a implementação de estratégias de SBDD que utilizam a total flexibilidade estrutural do modelo-fármaco receptor (de Vivo et al., 2016). A dinâmica molecular é capaz de gerar conformações representativas de moléculas em escala atômica ao longo do tempo, promovendo um panorama detalhado das mudanças conformacionais do sistema (Leach, 2001). A DM é baseada nos princípios da mecânica newtoniana, considerando as moléculas como grupos de átomos unidos por forças harmônicas medidas através de energias potenciais (VanGunsteren et al., 1990). Ao conjunto de funções de energia potencial e parâmetros utilizados para descrever o sistema é dado o nome de campo de força. O campo de força permite que a energia potencial total do sistema seja calculada como a soma de diversos termos de contribuição de energia. Considerando-se E_{tot} como a energia potencial total do sistema, um campo de força típico pode ser expresso por meio das seguintes contribuições de energia, indicadas na equação 1.

$$E_{tot} = \sum E_{est} + \sum E_{ang} + \sum E_{vdW} + \sum E_{1,4} + \sum E_{el} + \sum E_{tors}$$
(Eq.1)

O valor de cada termo é calculado com base em um valor de equilíbrio (ou ideal), sendo E_{est} a energia de deformação axial ou de estiramento de ligação, E_{ang} representa a energia de deformação angular, E_{vdW} representa a energia de *van der Waals*, $E_{1,4}$ corresponde à energia de interações não ligadas do tipo 1-4 ou de Lennard-Jones, E_{el} é a energia de atração ou repulsão de Coulomb entre duas cargas (eletrostática) e E_{tors} , que corresponde à deformação torsional ou de diedros próprios (Pronk *et al.*, 2013). A escolha de um campo de força depende do sistema a ser estudado, pois eles são parametrizados para reproduzir dados experimentais de determinados tipos de moléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, em condições específicas.

2.4. Ensaios de afinidade com radioligantes (ensaios de *binding*)

Ensaios de afinidade com radioligantes correspondem a uma ferramenta importante para a quantificação e caracterização de receptores, sendo vastamente empregados em estudos com GPCRs. Um radioligante é definido como qualquer ligante que tenha em sua estrutura um átomo que emita radiação e que seja capaz de interagir com um receptor, enzima, canal ou outra proteína de interesse (Hulme *et al.*, 2010). Desta forma, o uso de detectores de emissão permite identificar a presença destes compostos marcados em amostras contendo proteínas e avaliar a ocorrência ou não de ligação com as mesmas. A técnica é baseada na lei de ação de massas e os principais eventos cinéticos são brevemente descritos abaixo.

Quando o ligante em solução possui energia suficiente e orientação adequada, a colisão com o receptor resulta na formação do complexo ligante-receptor. A taxa de associação, ou número de eventos de formação ligante-receptor, é igual ao produto da concentração de ligante pela concentração de receptor multiplicada por uma constante K_{on}, que é definida como a constante de taxa de associação. Uma vez formado, o complexo ligante-receptor permanece unido por um tempo dependente da afinidade do ligante pelo receptor e outros eventos estocásticos, sofrendo depois uma dissociação. De modo análogo, a taxa de dissociação, ou número de eventos de dissociação por unidade de tempo, corresponde ao produto da concentração de complexos ligante-receptor por K_{off} (constante da taxa de dissociação). Quando o equilíbrio é atingido, os complexos ligante-receptor são formados na mesma velocidade em que se dissociam, como mostrado abaixo:

$$[Ligante] \cdot [Receptor] \cdot K_{on} = [Ligante-Receptor] \cdot K_{off}$$
(Eq. 2)

Rearranjando a fórmula para a obtenção da constante de dissociação, temos:

$$\frac{[\text{Ligante}] \cdot [\text{Receptor}]}{[\text{Ligante-Receptor}]} = \frac{K_{\text{off}}}{K_{\text{on}}} = K_{\text{d}}$$
(Eq. 3)

O quociente K_{off}/K_{on} é chamado de constante de dissociação do equilíbrio e possui unidade de concentração de número de mols por litro. Mais especificamente, o valor de K_d corresponde à concentração em que metade dos receptores estão ocupados pelo ligante, sendo, portanto, a medida de afinidade de um ligante pelo receptor. Um

ligante com valor de K_d igual ou inferior a 1 μ M é considerado um ligante de alta afinidade (Hulme *et al.*, 2010). Existe um valor diferente de K_d para cada par de complexos ligante-receptor e para diferentes subtipos de receptor (até mesmo para conformações diferentes e estados de ativação do mesmo receptor).

Os ensaios de afinidade por sua vez podem ser divididos em dois tipos, ensaios de saturação e ensaios de competição. Os ensaios de saturação permitem a determinação da afinidade de um receptor por um radioligante e, mais importante, a densidade de receptores (B_{max}). Já os ensaios de competição utilizam uma única concentração de radioligante que compete com concentrações crescentes do ligante em estudo. Este tipo de estudo permite a caracterização farmacológica de receptores e descoberta ou caracterização de subtipos de receptor, sendo que fornecem valores de concentração inibitória média (IC₅₀) (Cheng et al, 1973). Um caso especial dos ensaios competitivos, o ensaio competitivo homólogo, ocorre quando o ligante e o radioligante correspondem ao mesmo composto. Estes ensaios podem ser utilizados como uma alternativa aos ensaios de saturação para a determinação dos valores de K_d. Como apenas uma concentração de radioligante é utilizada, estes ensaios apresentam como vantagem um custo inferior e reduzida geração de resíduos radioativos (Auld et al., 2012). Desta forma, ensaios de afinidade podem ser usados para a caracterização da afinidade de compostos por um receptor, sendo por isso, facilmente encontrados em projetos de planejamento de fármacos.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é o planejamento e desenvolvimento de ligantes não peptídicos que possam apresentar atividade agonista enviesada no receptor de angiotensina II do tipo 1. Para alcançar esse objetivo, as seguintes etapas foram estabelecidas:

- Ancoramento do agonista pleno e agonista enviesado em um modelo do AT1R inserido em bicamada lipídica;
- Simulações de dinâmica molecular dos complexos estabelecidos para determinação das principais interações entre os ligantes e o receptor;
- Construção de um farmacóforo, seguida de triagem virtual de ligantes com possível perfil agonista enviesado;
- Ensaios de afinidade para confirmar a ligação dos compostos triados no AT1R.

4. METODOLOGIA

Para facilitar a visualização das etapas do projeto, um esquema geral da metodologia é apresentado abaixo (Figura 5):



Figura 5. Esquema geral do projeto, mostrando as técnicas e programas empregados. A seta tracejada indica que os resultados de ensaios de afinidade de trabalhos anteriores foram utilizados para refinar o farmacóforo gerado nesse trabalho.

4.1 Ensaios computacionais

4.1.1. Refinamento do cristal e construção dos ligantes

Neste trabalho utilizou-se a estrutura resolvida da angiotensina II complexada com o antagonista ZD7155 obtida por cristalografia (Zhang *et al*, 2015a, código PDB: 4YAY) com resolução de 2,9 Å. O cristal 4YAY foi refinado no programa MODELLER 5.0 (Webb *et al.*, 2014) e foram geradas 50 conformações do receptor pelo sistema de multimoldes. A estrutura da angiotensina II (AngII) obtida por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de H¹ (RMN) foi retirada do *Protein Data Bank* (PDB), sob o código 1N9V (Spyroulias *et al.*, 2003). Esta estrutura foi utilizada como geometria inicial para a construção do agonista enviesado TRV120027 (Tabela 1) no programa computacional PyMOL v.1.7.6 (PyMOL, Schrödinger, Nova York). **Tabela I** - Peptídeos com ação no AT1R utilizados no estudo. Em negrito estão representadas as mutações em relação à sequência da AngII. "Sar" corresponde ao aminoácido artificial sarcosina (*N*-metilglicina).

Nome	Sequência peptídica	Ação no AT1R	Referência
AngII	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Agonista	Spyroulias et al., 2003
TRV027	Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-DAla	Agonista Enviesado	Violin <i>et al.</i> , 2010

4.1.2. Dinâmica Molecular (DM)

As simulações de DM foram realizadas no pacote de programas computacionais GROMACS v. 5.0.2. (Abraham et al., 2015) utilizando o campo de força CHARMM36 (Huang et al., 2013). Desde a versão 4.6, o GROMACS faz uso de algoritmos de aceleração de cálculo por unidade de processamento gráfico (graphical processing unit, GPU) de tal modo que a etapa mais custosa de cada passo de DM, o cálculo de interações do tipo não-ligada, fica designado exclusivamente para a GPU, deixando assim a unidade de processamento central (central processing unit, CPU) livre para outros cálculos simultâneos (Kutzner et al., 2015) e combinação dos resultados para o próximo passo da dinâmica. O resultado é um aumento de 5 a 10 vezes na velocidade dos cálculos, que, dependendo do tamanho do sistema e tempo total de simulação, seriam proibitivos de outro modo. Desta forma, justifica-se o uso do serviço de computação de alta performance da USP (High Performance Computing, HPC-USP). Dentre os recursos disponíveis, utilizou-se o cluster Lince, especializado em computação de alto desempenho por GPU, que é constituído por 32 servidores, cada um com 6 cores Intel(R) Xeon(R) E7- 2870 @ 2.40GHz, 2 placas Tesla K20m, 128 GB RAM e um sistema de armazenamento de arquivos temporários de 55 TB. As demais etapas computacionais foram realizadas em computadores normais do tipo desktop.

O receptor refinado completo foi inserido em uma membrana de palmitoil-oleilfosfatidilcolina (POPC, Figura 6) contendo 144 lipídeos por camada (288 lipídeos no total), tendo como geometria inicial a bicamada de POPC fornecida por Klauda e colaboradores (Klauda *et al.*, 2010). A inserção na bicamada lipídica foi feita com o *script* InflateGRO. Inicialmente, a expansão da bicamada nos eixos x e y foi realizada espaçando os lipídeos proporcionalmente, de modo a criar espaço para a inserção do receptor no centro da caixa. Depois, os lipídeos que se sobrepuseram com a estrutura da proteína foram removidos (Kandt *et al.*, 2007). Por fim, um processo iterativo de redução da caixa e, consequente, reaproximação dos lipídeos foi realizado, seguido de uma minimização. Esse processo é repetido até que a membrana atinja um valor de área por lipídeo próximo ao experimental, 0,66 nm² para o POPC (Lyurbartsev *et al.*, 2016). Este lipídeo foi escolhido pois se encontrar em fase líquida a temperatura corpórea (310 K) e por ser o lipídeo mais abundante de membranas de animais (Silvus, 1982). O sistema obtido foi inserido em uma caixa cúbica de simulação de aresta de 10 nm, distando 2 nm da borda da caixa. Empregamos condições periódicas de contorno (*Periodic Boundary Conditions*, PBC) e preenchemos a caixa com moléculas de água do modelo TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983) e íons Na⁺ e Cl⁻ de modo a neutralizar a carga líquida do sistema, e atingir uma concentração molar intracelular fisiológica de 150 mM. Após essa etapa, para eliminar contatos atômicos inadequados, uma minimização de energia por declive máximo foi realizada até que força máxima fosse menor que 1000 kJ/mol. A geometria inicial da bicamada de POPC foi obtida do trabalho de Klauda e colaboradores (Klauda *et al.*, 2010).



Figura 6. Estrutura molecular e fórmula molecular do lipídeo palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC).

4.1.3. Equilibração

Antes da etapa de simulação é necessário que os íons e o solvente adquiram uma orientação adequada em torno da bicamada lipídica e da proteína. Diferente da DM de produção, as DM de equilibração são realizadas mantendo-se a proteína e a bicamada rígidas. A primeira etapa da equilibração foi conduzida em acoplamento NVT canônico (NVT- número de partículas, volume e temperatura constantes) durante 2 ns. Para todas as simulações, o esquema de raio de corte de *Verlet* foi utilizado, juntamente com raio de corte de interações eletrostáticas de curto alcance e de *Van der Waals* de 12 Å, esta última com mudança do potencial a uma distância de 1.0 nm para manter a conservação de energia. O esquema de constrição holonômica LINCS foi aplicado em todas as simulações (Hess *et al.*, 1997), permitindo o uso de tamanho de passo de 2 fs. O

termostato de Berendsen (Lemak *et al.*, 1994) foi utilizado tendo a temperatura de 310K como referência e constante de acoplamento de 0,2 ps. O acoplamento foi feito de modo independente para o receptor, a bicamada lipídica de POPC e o solvente. Depois de chegarmos na temperatura alvo, aplicamos pressão ao sistema até que ele atinja a densidade apropriada. A segunda equilibração foi realizada em *ensemble* NPT (isotérmico-isobárico) por 10 ns, mantendo-se as condições prévias com exceção da adição do barostato de Parrinello-Rahman (Parrinelo *et al.*, 1982), tendo como referência a pressão de 1 bar e constante de acoplamento de 0,2 ps. Equilibrações tão longas são necessárias para a acomodação dos lipídeos após a inserção da proteína na membrana (Anézo, *et al.*, 2003)

4.1.4. Dinâmica molecular de produção

Dez dinâmicas moleculares de produção sem ligante foram realizadas, cada uma com 50.000.000 passos de 0,002 ps totalizando 200 ns de simulação individual e 2µs de tempo total de simulação por tipo de sistema. Além disso, com exceção do campo de força AMBER99sb, simulações acima das centenas de nanossegundos correm um risco cada vez maior de ficarem presas em estados de alta energia livre, tornando o processo de amostragem conformacional ineficiente (Lange *et al*, 2010). O algoritmo *leap-frog* foi empregado para a resolução da equação Newtoniana de movimento. A temperatura de referência de 310 K e a pressão de 1 bar foram equilibradas separadamente pelo uso do termostato de Nosé-Hoover (Evans *et al.*, 1985) e o barostato de Parrinello-Rahman (Pronk *et al.*, 2013), respectivamente. As coordenadas, velocidades e energias foram salvas a cada 50 ps, enquanto os arquivos de trajetória foram salvos a cada 25.000 passos de simulação, gerando um total de 4.000 confôrmeros para cada simulação.

4.1.5. Seleção de confôrmeros

Os confôrmeros foram selecionados utilizando-se o algoritmo de Jarvis-Patrick (Jarvis, *et al.*, 1973), uma técnica não paramétrica baseada no compartilhamento de vizinhos mais próximos. De acordo com essa técnica, dois pontos são colocados no mesmo agrupamento (*cluster*) se eles compartilharem um número mínimo de vizinhos mais próximos e estiverem na lista de vizinhos mais próximos um do outro. Para o

agrupamento consideramos as posições dos carbonos α de cada quadro (*frame*) e um valor limite de RMSD de 0,3 nm.

4.1.6. Ancoramento molecular

Os ensaios de ancoramento molecular foram realizados utilizando o programa GOLD (Jones *et al.*, 1997) e os resultados foram visualizados no módulo HERMES. Definiu-se como espaço para o ancoramento um raio de 18 Å no centro da cavidade do receptor, que corresponde ao resíduo His256 (Balakumar, *et al.*, 2014). As poses geradas foram ranqueadas pela função de *score* GoldScore, mantendo-se a melhor pose do ligante de cada uma das 20 rodadas de algoritmo genético para cada *frame* de DM. Apesar do AT1R ser mantido rígido durante todo o procedimento, a liberdade de rotação das ligações químicas dos ligantes foi total, com exceção das ligações torcionais dos átomos de C e N das ligações peptídicas dos análogos de AngII. O software GOLD tenta contornar o problema da rigidez do ligante pela redução do termo de repulsão de *van der Waals* na função de *score*, procedimento chamado de *soft-docking* (Meng *et al.*, 2011), apesar disso, utilizamos 8 frames oriundos da etapa de agrupamento para cada ligante com o intuito de aumentar a amostragem conformacional do receptor, de modo semelhante à técnica de *ensemble docking* (Korb *et al.*, 2012).

4.1.7. Dinâmica molecular de complexos

As simulações do complexo fármaco-receptor seguiram o mesmo protocolo anterior, com exceção da adição do procedimento de arrefecimento simulado, ou *simulated annealing* (SA), antes da dinâmica de produção (Kirkpatrick *et al.*, 1983). Na área de metalurgia, o SA é um processo em que uma substância é aquecida até temperaturas próximas do seu ponto de fusão e em seguida sofre um resfriamento lento, resultando em um produto menos quebradiço. Na área computacional, o SA funciona de maneira análoga, buscando uma solução ótima para sistemas com diversas soluções possíveis, neste caso uma conformação ótima. Em temperaturas mais altas, é permitido que o sistema ocupe regiões de alta energia do espaço conformacional e assim possa atravessar barreiras energéticas. À medida que a temperatura é reduzida, estados energéticos mais baixos se tornam mais prováveis de acordo com a distribuição de *Boltzmann*, e, portanto, um novo mínimo local é alcançado (Leach, 2001). De fato, o SA é usado em associação com DM para refinar estruturas obtidas por difração de raios-X e RMN.

No programa GROMACS o SA é feito por uma mudança linear na temperatura de referência usada no termostato (*ensemble* npt). Desta forma, temos um grande aumento de temperatura seguido de um resfriamento mais lento. O esquema de mudanças de temperatura é mostrado na tabela abaixo:

Tabela II – Esquema de aquecimento da etapa de *simulated annealing*.

Tempo (ps)	0	200	400	500	600	700	800	900	1000	1200
Temperatura (K)	310	600	700	800	700	600	500	450	400	310

Comparamos os valores de RMSD dos aminoácidos da cavidade do sistema TRV027-AT1R com o cristal 6DO1. O frame que apresentou o menor valor de RMSD com o cristal ativo foi selecionado para a etapa de criação de farmacóforo.

4.1.8. Construção de farmacóforo

O programa Unity do pacote computacional Sybyl-X Suite 2.0 (TRIPOS 2011) foi empregado para a criação de farmacóforos com base na estrutura do receptor e do ligante, que tiveram origem nas simulações de dinâmica molecular anteriores. Os seguintes grupos farmacofóricos foram considerados para a criação dos modelos: doador de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donor, HBD*), aceptor de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptor, HBA*), grupo hidrofóbico, grupo carregado negativamente, grupo carregado positivamente e grupo aromático. Com base na literatura e nas análises de dinâmica molecular, cada um desses grupos foi atribuído a porções do ligante/receptor e diversos modelos foram gerados de maneira iterativa. A capacidade desses modelos em discriminar verdadeiros positivos (sensibilidade) versus a taxa de falsos positivos (1-especificidade) foi avaliada construindo-se a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*, ou COR, Característica de Operação do Receptor), que é a representação gráfica da habilidade de um modelo em discriminar classes

distintas (MARTINEZ 2003). Agonistas enviesados (tabela III) foram submetidos ao servidor DUD-E (Mysinger *et al.*, 2012) para gerar compostos falsos positivos chamados de *decoys*. Os *decoys* são semelhantes aos compostos teste do ponto de vista físico-químico (carga formal, massa molecular, clogP, número de ligações rotacionáveis, ligações de hidrogênio, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio), mas diferentes do ponto de vista topológico para não possuírem afinidade pelo receptor, podendo assim agir como falsos positivos. *Decoys* são utilizados para testar a robustez de funções de score de *docking* que são sabidamente enviesadas por propriedades físico-químicas (Huang *et al.*, 2015).

Tabela III – Ligantes enviesados utilizados na etapa de criação de falsos positivos (*decoys*). Sar = N-metil glicina, Nar = N-metil alanina.

Nome	Sequência de aminoácidos	Referência		
TRV023	Sar-Arg-Val-Tyr-Lys-His-Pro-Ala	Violin <i>et al.,</i> 2010		
TRV027	Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala			
TRV034	Nar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala	Rajagopal <i>et al.,</i> 2011		
TRV044	Nar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-D-Ala			

4.1.9. Triagem virtual e construção de bases de dados

Para a triagem virtual, o subgrupo "*in stock*" da base de dados ZINC15 (Sterling *et al.*, 2015), totalizando 13.241.888 de compostos, foi selecionado. Por se tratar de um receptor muito estudado, resolvemos deixar os critérios de filtragem mais abrangentes de modo a incluir compostos que provavelmente foram excluídos em outros trabalhos (Sallander *et al.*, 2016, Matsoukas *et al.*, 2013). Desta forma, os compostos foram filtrados empregando-se o programa Filter (OpenEye Scientific) seguindo os seguintes critérios: massa molecular entre 130-781 Da, carga formal entre -3 e +3, doadores de ligação de hidrogênio (HBD) entre 0 e 5, aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) entre 0 e 10, logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (log P) entre -3,0 e 6,8, número de anéis no sistema entre 0 e 5, ausência de grupo nitro e ausência de compostos agregantes e metais.

Todas as bases de dados foram salvas em formato "*smiles*" e depois tiveram suas coordenadas 3D geradas pelo módulo Concord no programa Sybyl X. As triagens foram

realizadas usando o modo de busca Unity com busca flexível (*Flex Search*), tendo tempo máximo de processamento de 1 minuto para cada composto e sem usar demais filtros.

A busca flexível do Unity usa uma única conformação 3D armazenada na base de dados para gerar todas as conformações possíveis, reduzindo o custo de armazenamento. Além disso, um algoritmo é utilizado para avaliar as poses geradas e a viabilidade do composto candidato em cumprir os requisitos da busca. Caso não seja possível atender aos requisitos mesmo flexionando os ângulos de ligação, o algoritmo interrompe as tentativas e passa para o próximo composto, reduzindo assim o custo computacional total. Não utilizamos busca parcial, ou seja, os compostos triados devem atender todos os requisitos determinados pelos farmacóforos. Os compostos selecionados foram submetidos a ensaios de ancoramento molecular seguindo os mesmos critérios na seção 4.1.6.

4.2. Ensaios experimentais

Baseamos o protocolo do ensaio de afinidade (seção 4.2.3) nos trabalhos anteriores de busca e caracterização de agonistas enviesados para o AT1R (Violin *et al.*, 2010, Zimmerman, *et al.*, 2012, Rajagopal *et al.*, 2011). Todos os regentes utilizados neste trabalho possuem grau analítico e todas as soluções tampão e reagentes foram preparados com água deionizada por sistema de purificação de água Milipore tipo Mili-Q (Bedford, MA).

4.2.1. Células AT1R competentes

Células HEK-293 (Human Embrionic Kidney) do banco de células do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP - InCor) foram cedidas para a realização dos ensaios de afinidade. Estas células foram transfectadas permanentemente com o plasmídeo pLV.ExBi.P/Puro-EF1\α-AGTR1-IRES-eGFP (Figura 7) contendo o gene AGTR1 (organismo de origem: *Homo sapiens*) e eGFP. Desta forma, essas células expressam constitutivamente o receptor AT1, que é a proteína de interesse, e a proteína fluorescente verde melhorada (*Enhanced Green Fluorecent Protein*, eGFP, *Zhang et al.*, 1996), que é um marcador de transfecção.



Figura 7. Mapa do vetor do plasmídeo AT1R selvagem.

4.2.2. Cultivo e manutenção de células HEK-293

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² com 10 mL de meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM-High, Thermos Fisher Scientific) com alta concentração de glicose, 10% de soro bovino fetal (GIBCO), estreptomicina 100 U/mL (Thermo Fisher Scientific) e penicilina 10 mg/mL (Thermo Fisher Scientific), sendo as garrafas armazenadas em estufa umidificada a 37°C e 5% CO₂.

4.2.3. Ensaio de afinidade (binding)

Placas de 24 poços (1,9 cm² por poço) previamente tratadas com polilisina (Sigma-Aldrich) receberam 10^5 células por poço e foram cultivadas nas mesmas condições de manutenção por 24 h (seção 4.2.2). Imediatamente antes do início do ensaio, cada poço foi lavado com 1,0 mL de tampão de lavagem (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, MgCl₂ 5mM, 0,1% albumina de soro bovino). Em seguida, adicionou-se 500 µL de tampão de ensaio (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, MgCl₂ 5 mM, 0,1% albumina de soro bovino e bacitracina (Sigma Aldrich) numa concentração final de 100 µg/mL) contendo 50.000 cpm (contagens por minuto)/poço de angiotensina II triciada (³H-AngII, GE-Healthcare) em todos os poços. Os controles

positivos (AngII e losartana) e os compostos testes foram adicionados em contrações de 10^{-6} a 10^{-11} M nos respectivos poços e as placas foram armazenadas a 4° C por 24 horas. Passado esse período, os poços foram lavados duas vezes com tampão de lavagem e 1 mL de tampão de lise (ureia 48%, detergente NONIDET P-40 2%, preparados em ácido acético 3 M) foi adicionado em cada poço. Após 15 minutos de incubação com o tampão de lise, realizou-se o processo de raspagem das células e transferiu-se 900µL desta solução para tubos plásticos de cintilação contendo 5 mL de líquido de cintilação (Ultima GOLD XR, Perkin Elmer). Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados ao abrigo da luz por 30 minutos. Por fim, a emissão de radiação β das amostras foi determinada no contador Tricarb 2100 TR (Packard Biosciences) fornecendo valores de cpm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Refinamento da estrutura do cristal do AT1R

Apesar da estrutura geral do receptor ter sido resolvida cristalograficamente, foi necessário um processo de refinamento para completar cadeias laterais e segmentos de resíduos faltantes. Adicionamos os seguintes segmentos utilizando o programa Modeller v9: 1-16 (N-terminal), 173-176 (ECL2), 186-189 (ECL2), 225-234 (ICL3), 317-359 (C-terminal). Quanto às cadeias laterais, completamos os seguintes resíduos: Lys20^{N-terimnal}, Lys135^{ICL2}, Se136^{ICL2}, Arg137^{ICL2}, Ile177^{ECL2}, Leu191^{ECL2}, Ile193^{5.36}, Thr198^{5.41}, Lys199^{5.42}, Ile201^{5.44}, Leu205^{5.48}, Phe206^{5.49}, Phe208^{5.51}, Leu305^{HelixVIII}, Lys308^{HelixVIII}, Tyr312^{HelixVIII}, Gln315^{HelixVIII}, Leu317^{HelixVIII}. Além disso, a proteína b₅₆₂RIL (BRIL, Chun *et al.*, 2012) na porção N-terminal e o ligante ZD7155 do sitio de ligação do receptor foram removidos. Vale lembrar que mantivemos as pontes dissulfeto entre as cisteínas 18-274 e entre 101-180.

A estrutura produzida pelo programa MODELLER v.5.0 (Figura 8) foi avaliada quanto à validade da relação entre os ângulos Φ (phi) e Ψ (psi) utilizando-se o gráfico de Ramachandram (Figura 9; Lovell *et al.*, 2003). A região com a maior concentração de resíduos corresponde ao intervalo característico de α -hélices (-60 > Φ > -120 e -60 > Ψ > -120), que é ocupada pelas sete porções transmembrana (7TM) do receptor. A região no quadrante superior esquerdo corresponde à área das folhas β (-60 > Φ > -120 e 60 > Ψ > -160), sendo ocupada principalmente pelos resíduos da ECL2. Com exceção dos resíduos Asp17^{N-Term} e Thr190^{ECL2}, é possível verificar que somente as zonas permitidas e favorecidas são ocupadas. Os dois resíduos citados são imediatamente precedidos por segmentos que foram adicionados pelo programa (resíduos 1-16 e 186-189) e, como a estrutura do cristal foi mantida completamente rígida durante a criação destes segmentos, é possível que isso tenha criado uma tensão angular, explicando essa ocupação de regiões desfavoráveis. Mesmo assim, temos apenas 0,5% de resíduos *outliers*, enquanto que o limite para modelos obtidos por homologia é de 3% (Wuthrick *et al.*, 1990).



Figura 8. Estrutura final do AT1R após a etapa de refinamento e inserção na bicamada lipídica. As porções N-terminal e C-terminal adicionadas pelo programa MODELLER. Representação na forma de *cartoon*.



Figura 9. Gráfico de Ramachandran referente à estrutura de AT1R obtida pelo programa MODELLER v.5.0, com base na estrutura cristalográfica PDB 4YAY.

5.2. Dinâmica Molecular

O processo de inserção da proteína na bicamada lipídica começou com a etapa de expansão da caixa de simulação seguida da remoção de qualquer lipídeo sobreposto com a estrutura da proteína. Depois disso, realizamos sucessivas etapas de redução da caixa e minimização até chegarmos no valor referência de área por lipídeo. Para uma bicamada de POPC a 310 K, o valor experimental de área por lipídeo pela técnica de difração de raio-X é 0,668 \pm 0,005 nm² (Lyubartsev *et. al,* 2016). O sistema final continha o receptor (AT1R), 282 moléculas de POPC (6 moléculas removidas), 110 íons cloreto (Cl⁻), 97 íons sódio (Na⁺) e 20.235 moléculas de água. Após a inserção do receptor completo na membrana de POPC, o sistema foi minimizado pelo método *steepest descent*. É possível perceber que após 600 iterações (Figura 10) há a formação de uma assíntota horizontal, indicando a convergência energética do sistema em um mínimo local.



Figura 10. Energia potencial da minimização do sistema. A linha tracejada horizontal indica a convergência em um mínimo local.



Figura 11. Temperatura e densidade das etapas de equilibração NVT e NPT, respectivamente, em função do tempo.

Os parâmetros de controle das etapas NVT e NPT foram mantidos com valores médios de temperatura e densidade de 310 K e 1015 kg/m³, respectivamente (Figura 11). Foram realizadas 10 dinâmicas de 200 ns do receptor na forma apo (ligante ausente). Adotou-se como critério de estabilidade da dinâmica o valor de desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD, *Root Mean Square Deviation*) de todos os átomos, com exceção dos átomos de hidrogênio, em relação à estrutura inicial. No caso da dinâmica 1, a estabilidade foi alcançada no intervalo de 100 ns (Figura 12), pois há a manutenção de um valor médio de RMSD (1,3 Å) acompanhado de uma baixa
amplitude entre o valor máximo e mínimo desse intervalo (0,1 nm) por um longo período (80 ns), os resultados das demais dinâmicas se encontram em anexo (Figuras S1, S2 e S3). Quando removemos os átomos das porções N-terminal e C-terminal, verificamos uma significativa redução no valor de RMSD, indicando como as porções transmembrana embebidas em bicamada lipídica, são mais rígidas e alcançam a estabilidade conformacional em torno de 40 ns, portanto, as demais análises de dinâmica dessa seção e etapa de seleção de confôrmeros considerarão apenas o intervalo de 40-200 ns.



Figura 12. Desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) do AT1R da dinâmica molecular 1 do sistema apo. Em preto temos os átomos pesados do receptor inteiro, em vermelho, foram removidas as porções N-terminal e C-terminal.

O raio de giro é outra forma de estudar a estabilidade do enovelamento de uma proteína, pois permite avaliar o seu grau de empacotamento ao longo da simulação (Pronk *et al.*, 2013). Observamos uma pequena variação do raio de giro total, indicando que a proteína manteve sua estrutura terciaria original (Figura 13). É interessante notar que o intervalo de tempo em que a dinâmica alcançou a estabilidade corresponde ao mesmo intervalo em que observamos a queda no valor de raio de giro em todos os eixos. Também podemos observar que as maiores variações acontecem no eixo z do sistema, ou seja, de modo perpendicular à bicamada lipídica (eixo x e y), por consequência dos movimentos das porções N-terminal e C-terminal.



Figura 13. Raio de giro do AT1R nos eixos x, y e z da dinâmica molecular 1 do sistema apo.

Uma avaliação mais precisa da flexibilidade do receptor foi feita discriminandose cada um dos átomos (Figura 14). O gráfico de flutuação do desvio quadrático médio (RMSF) das 10 dinâmicas concatenadas mostra que três porções do receptor são significantemente mais flexíveis. Essas regiões correspondem ao N-terminal (Met1^{N-} terminal-Glu8^{N-terminal}), ICL3 e C-terminal (Tyr319^{C-terminal}-Asp359^{C-terminal}), que são sabidamente mais flexíveis por não apresentarem estrutura secundária estável e estarem em contato com o solvente. É interessante notar que em todas as simulações a alça Cterminal deixa de apontar para a direção intracelular (Figura 8) e passa a se ancorar na membrana (Figura 15). Diferente dos demais GPCRs, o AT1R carece do sitio de palmitoilação no final da hélice 8 cuja função é justamente ancorar a porção C-terminal na membrana (Escriba et al., 2007). Nas nossas simulações o ancoramento é mediado pela porção C-terminal envolvendo os seguintes resíduos: Pro322^{C-terminal}, Lys323^{C-} terminal, Leu337 ^{C-terminal}, Tyr339 ^{C-terminal}, Arg340 ^{C-terminal}, Pro341^{C-terminal}, Lys351^{C-terminal}, Pro354^{C-terminal}, Cys355^{C-terminal}, Glu357^{C-terminal} e Glu359^{C-terminal}. Outras regiões de alça também se mostraram flexíveis, como a ICL2 (átomos 2113-2232) e a ICL3 (átomos 36115-3869), porém a ECL2 (átomos 2697-3111) apresenta uma queda abrupta no valor de RMSF. Essa menor liberdade de movimentação é explicada pela estrutura de folha β dessa região. Depois dessa avaliação inicial, as 10 dinâmicas concantenadas foram utilizadas na etapa de seleção de confôrmeros.



Figura 14. Flutuação do desvio quadrático médio (RMSF) das 10 dinâmicas moleculares referentes ao processo de inserção do AT1R na bicamada de POPC concatenadas. Reparar na alta flexibilidade da porção N-terminal (1-424), ICL3 (3615-3869) e alça C-terminal (5287-5918).



Figura 15. Estrutura final da dinâmica molecular 1, mostrando o AT1R (representação de *cartoon*) e a bicamada lipídica de POPC (representação do tipo *sticks*). Reparar na posição horizontal assumida pela alça C-terminal. Moléculas de água e íons foram omitidos.

5.3. Seleção de confôrmeros

O agrupamento de confôrmeros foi realizado pelo método Jarvis-Patrick e considerou apenas a posição dos carbonos α da proteína. Confôrmeros da dinâmica que diferiam entre si por até 0,3 Å foram alocados no mesmo agrupamento. As 14.000 estruturas das 10 simulações independentes de dinâmica foram separadas em 192 agrupamentos (Figura 16). O critério utilizado para a seleção dos agrupamentos foi a representatividade, ou seja, selecionamos os agrupamentos com o maior número de estruturas, além disso, dentro de cada agrupamento, há uma estrutura "representativa", que possui a menor soma de distância para todas as estruturas vizinhas do agrupamento, sendo essas estruturas utilizadas para os ensaios de ancoramento molecular. Numa tentativa de equilibrar a amostragem das conformações do receptor com o custo da realização dos ensaios posteriores, optamos por utilizar 8 estruturas de DM para a etapa de ancoramento molecular.



Figura 16. Número de estruturas de dinâmica molecular por agrupamento. A linha horizontal indica o valor de corte para a seleção dos 8 agrupamentos que tiveram o maior número de estruturas.

5.4. Ancoramento molecular

Uma das formas de validar uma função de *score* consiste em ancorar o ligante do complexo proteína-ligante na própria proteína do cristal de origem, processo chamado de *re-docking* (Jones *et al.*, 1997). O *re-docking* permite avaliar se os parâmetros do protocolo e a função de *score* utilizados são capazes de gerar poses iguais ou muito próximas às obtidas experimentalmente por cristalografia (Kitchen *et al.*, 2004, Cheng *et al.*, 2015). Portanto, utilizamos o ligante ZD7155, presente no cristal 4YAY (Zhang

et al 2015a), para ensaios de ancoramento no receptor AT1R. O ligante foi retirado do sitio de ligação do AT1R (PDB ID: 4YAY) e o ancoramos no mesmo sítio utilizando a função *GoldScore*. Das 20 poses geradas, 15 apresentavam a orientação e posição do ligante semelhante ao cristal. Deste grupo, 4 poses apresentaram valor de RMSD inferior a 0,2 Å quando comparadas ao cristal (Figura 17). Desta forma, consideramos o protocolo e a função GoldScore adequados para o ensaio de ancoramento molecular com os demais ligantes, AngII e TRV027.



Figura 17. Poses do composto ZD7155 no sitio de ligação do receptor AT1R. (A) Poses obtidas com a função *GoldScore* (laranja e verde) sobrepostas com a estrutura cristalina do ligante (vermelho), representação do tipo *sticks*. (B) Pose do ZD7155 interagindo com os resíduos Arg167 e Tyr35 sobreposta com o cristal, representação na forma de *sticks* e linha, respectivamente. Ao fundo, o AT1R é apresentado na forma de *cartoon* em ambas as imagens.

A seleção das poses de ancoramento foi baseada nas distâncias entre os resíduos do receptor com a AngII descritos na literatura (Balakumar *et al.*, 2014). O conjunto de critérios de seleção é apresentado abaixo:

- Ponte salina entre o grupo carboxilato do resíduo 8 da Ang II com o nitrogênio ε da Lys199^{5.42}.
- Ponte salina entre o grupo guanidino da AngII-Arg2 com os carboxilatos dos resíduos Asp281^{7.29} ou Asp278^{7.32}.
- Cadeia lateral da Val3 orientada para o bolso hidrofóbico do sitio de ligação.
- Orientação hidroxila da Tyr4 da AngII com a cadeia lateral da Asn111^{3.35}.
- Interação do tipo π-π entre o anel aromático da AngII- His6 com o anel imidazólico da His256^{6.51}.

Estudos com análogos da Ang II com grupos que unem os resíduos Val3 e Ile5 em sistemas alicíclicos de tamanhos diferentes mostram que não há perda de atividade agonista ou agonista enviesada quando as cadeias laterais destes dois resíduos ficam

orientadas no mesmo lado do ligante (St-Pierre *et al.*, 2018). Esse estudo reforça a ideia de dependência da posição relativa desses dois resíduos levantada por estudos de relação estrutura atividade com análogos rígidos da AngII (Naik *et al.*, 2010, Kellici *et al.*, 2015, Sallander *et al.*, 2016). Por fim, vale lembrar que a AngI é inativa para o AT1R e só passa a apresentar atividade pelo receptor após clivagem dos últimos dois resíduos (AngI [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-**His-Leu**]) pela enzima conversora de angiotensina (ECA), resultando na AngII, o peptídeo ativo. Portanto, como consequência do que é descrito acima, consideramos como critério exclusivo para a seleção de poses a orientação vertical da AngII no receptor. Desse modo, o resíduo Phe8 deve estar orientado para o interior do receptor, enquanto que os resíduos Asp1 e Arg2 devem apontar para as alças extracelulares (Fillion *et al.*, 2013). Devido à ausência de outros trabalhos sobre o ancoramento do agonista enviesado TRV027 e pela semelhança estrutural com a AngII (Tabela 1), os mesmos critérios de ancoramento foram adotados.

Dos 8 confôrmeros submetidos aos ensaios, o ancoramento foi possível somente em 5 estruturas. Ao analisar as poses fornecidas pelo programa, observamos a sobreposição atômica entre ligante e receptor. Quando utilizamos a ferramenta de visualização do volume de cavidades do programa PyMOL, verificamos que esses erros provavelmente ocorreram devido à falta de espaço no sitio de ligação do receptor para acomodar o ligante. O valor da função de score de todas as poses que se encontram fora da cavidade é igual a zero (Figura 18), indicando que a melhor solução que o programa encontrou não foi adequada para se continuar o processo de ranqueamento. Quando analisamos as 10 trajetórias não observamos a participação específica de alguma transmembrana ou grupo para explicar essa redução, mas sim uma flutuação de volume decorrente dos movimentos de diferentes resíduos em cada simulação. Mesmo nas 5 estruturas em que se foi possível fazer a análise (Figuras 19 e 20), muitas das interações esperadas não foram observadas, como a Lys199^{5.42}, que se encontrava orientada para fora do receptor na maioria das poses, e a Asn111^{3.35}, que se localiza muito profundamente no receptor para poder interagir com a cavidade. No entanto, observamos a proximidade da AngII-His6 com a His256^{6.51} e da AngII-Arg2 com os resíduos Asp287.321/Asp2787.29.

Angli									
Estrutura 1		Estrutura 2		Estrutura 3		Estrutura 4		Estrutura 5	
Soluções de docking	Goldscore fitness								
19	-114.4677	18	-147.7150	12	-271.4531	4	-152.0537	18	-147.4359
15	-95.8572	19	-78.2476	18	-84.7933	1	-126.3133	6	-132.2015
20	-78.9103	4	-51.2474	14	-62.4755	20	-124.0877	20	-67.0669
9	-75.8875	17	-50.9078	6	-59.1666	14	-72.4269	9	-6.3231
1	-68.2030	6	-45.5119	15	-44.4252	11	-35.1141	3	0.0000
11	-54.6395	9	-37.4826	17	-36.0189	13	-20.0360	7	0.0000
18	-39.2339	3	-33.5918	3	0.0000	3	-6.9792	8	0.0000
12	-35.0376	20	-24.1158	4	0.0000	9	0.0000	11	0.0000
16	-26.5497	14	-22.9186	5	0.0000	15	0.0000	12	0.0000
6	-19.7318	8	-5.6996	8	0.0000	18	0.0000	13	0.0000
4	-13.9968	2	0.0000	9	0.0000	6	0.0000	14	0.0000
8	-11.3974	11	0.0000	10	0.0000	16	1.9144	17	0.0000
2	-10.2721	12	0.0000	11	0.0000	17	3.1634	19	0.0000
14	0.0000	5	11.6471	16	0.0000	7	20.0529	1	13.1073
13	0.0000	1	19.6823	20	0.0000	10	20.0903	16	30.0831
10	0.0000	13	42.5015	13	5.5152	12	24.3897	15	35.0876
5	0.0000	7	49.2852	7	9.1205	19	37.0743	10	43.0587
3	0.0000	10	53.9639	2	17.7839	5	94.1636	2	58.4601
7	37.7534	16	58.9672	1	49.8101	2	102.1360	4	72.5507
17	53.5745	15	63.4273	19	106.9982	8	107.6846	5	110.5108

TRV027

Estrutura 1		Estrutura 2		Estrutura 3		Estrutura 4		Estrutura 5	
Soluções de docking	Goldscore fitness								
9	-113.3075	7	-44.6918	17	-55.6788	6	-43.3739	14	-60.4234
5	-86.0955	13	-43.5013	10	-33.0676	19	-32.7219	1	-42.4132
16	-45.1368	12	-14.3900	4	-21.0873	12	-12.7989	19	-40.2570
11	-36.7943	15	-3.6551	1	-9.4523	20	-12.6665	9	-37.0293
10	-30.8993	4	4.5920	12	-4.4584	4	-8.8103	4	-36.8940
3	-17.0928	3	11.6560	2	0.0000	17	0.0000	17	-22.8902
7	-10.6879	11	14.5016	5	0.0000	5	5.6315	6	-9.7427
8	-10.0792	19	18.2572	15	0.0000	11	9.1378	8	-9.6868
6	0.0000	20	26.2006	19	0.0000	8	10.6158	15	-9.5134
15	0.0000	18	33.1565	20	0.0000	7	20.4394	5	0.0000
17	0.0000	17	34.2974	8	0.8780	13	30.3259	11	0.0000
18	0.0000	5	35.4960	16	6.6982	10	41.7897	18	0.0000
20	0.0000	10	39.5031	3	14.9869	15	54.1000	7	15.0496
4	3.7339	6	51.6138	14	17.2291	16	67.7870	20	28.7807
19	16.7642	8	53.9790	13	38.7350	18	75.2628	16	42.0400
2	25.8143	2	55.5914	11	49.5543	3	77.5273	10	48.1775
13	64.2627	1	66.8504	6	50.7321	9	79.6903	12	49.1324
14	74.7972	9	72.0023	9	53.6698	1	83.1190	2	52.6086
1	79.2333	14	73.9628	7	78.0933	14	91.7956	3	63.0910
12	107 0386	16	78.0267	18	83 9852	2	96,9181	13	65 4265

Cristal Refinado

Angiote	nsina II	TRV027			
Soluções de docking	Goldscore fitness	Soluções de docking	Goldscore fitness		
20	106.08	7	104.61		
17	104.91	6	92.02		
14	104.91	11	91.97		
18	86.97	2	88.02		
1	85.21	3	86.04		
3	83.70	18	81.03		
5	70.71	9	80.28		
19	66.99	1	79.36		
1 2	65.59	14	79.06		
16	57.03	17	75.58		
10	52.28	5	75.35		
11	51.50	12	66.83		
8	48.39	10	64.76		
6	42.63	16	63.41		
15	36.41	15	58.66		
2	34.71	4	57.14		
9	28.66	13	48.91		
7	22.46	19	42.99		
4	-4.46	20	25.44		
13	-39.02	8	16.89		

Figura 18. Resultados do ranqueamento da AngII e TRV027 nas estruturas de dinâmica molecular e no cristal refinado. As flechas indicam as poses selecionadas.

Apesar da maioria das poses com orientação invertida (Phe8 para cima e Arg2 para baixo) apresentarem melhor classificação de acordo com a função de *score*, os dados experimentais da literatura (Balakumar *et al.*,2014) e da própria forma de interação das sartanas no cristal (Zhang *et al.*, 2015a) embasam a desconsideração deste tipo de pose.

Devemos lembrar que as conformações do receptor utilizadas são oriundas de simulações de DM sem nenhum ligante no sitio. Portanto, essa redução do volume da cavidade ao longo da dinâmica era esperada e explica a ausência de interações nessa etapa. De fato, quando repetimos os ensaios de ancoramento com o cristal refinado não observamos poses com sobreposição atômica. Mesmo assim, ressaltamos que muitas das interações descritas na literatura não foram observadas mesmo no cristal. Como exemplo, podemos citar a ponte salina entre His256^{6.51} e Glu173^{ECL2} (Oliveira *et al.*, 2007), que caracterizaria o receptor inativo, a participação do resíduo Phe301^{7.52} na ligação de sartanas no sitio de ligação do receptor (Ji et al., 1994) e a interação entre a AngII-Arg2 com o Asp74 (Nikiforovich, et al., 2006). Verifica-se que a distância/posição dos resíduos descritos anteriormente não seria possível mesmo com grandes mudanças conformacionais do receptor (Figura 21). Essas interações foram descritas com base em ensaios de mutagenicidade, método de acessibilidade de substituição de cisteína e modelos de homologia para o estudo do receptor. Devidos às limitações intrínsecas das técnicas, é natural que a descoberta de novas evidências, como o cristal, indique divergências em relação às interações descritas na literatura e que nem todas estejam realmente presentes no AT1R.



Figura 19. Resultados de ancoramento molecular da AngII. As poses selecionadas (Estruturas 1-5) são mostradas no interior da cavidade do receptor (roxo) com os resíduos utilizados na seleção. Reparar como a angiotensina II (AngII) possui uma porção fora da cavidade na pose A, indicando sobreposição atômica com o receptor. Representação na forma de *sticks*.



Figura 20. Resultados do ensaio de ancoramento molecular do TRV027. As poses selecionadas (Estruturas 1-5) são mostradas no interior da cavidade do receptor (azul) com os resíduos utilizados na seleção. Representação na forma de *sticks*.



Figura 21. Cristal 4YAY refinado (em *cartoon*) e com resíduos destacados (em *sticks*), mostrando como o ligante ZD7155 (vermelho) encontra-se distante da Phe301 (laranja) e do Asp74^{2.50} (verde). Os resíduos His256^{6.51} e Glu173^{ECL2} (rosa) também se encontram a uma distância muito acima da permitida para a ocorrência de interações.

5.5. Simulated Annealing

Como observado anteriormente, as poses de ancoramento oriundas de diferentes conformações de dinâmica não foram convergentes e não apresentaram as interações esperadas segundo os dados experimentais reportados na literatura (Fillion *et al.*, 2010, Balakumar *et al.*, 2014). De modo a refinar as poses dos complexos AT1R-AngII e AT1R-TRV027, realizamos as simulações de *simulated annealing* (SA). Três protocolos de aquecimento foram testados (Tabela IV) até observarmos mudanças de acomodação do ligante no receptor.

A mudança mais significativa e comum a todas as estruturas corresponde à posição da Lys199^{5.42}, que deixou de interagir com o grupo fosfato da membrana e passou a formar uma ponte salina estável com o carboxilato terminal de ambos os ligantes (Figura 22). Essa interação é descrita como o primeiro evento da entrada da AngII no sitio de ligação (Balakumar, *et al.*, 2014). Cada uma dessas simulações foi continuada seguindo o mesmo protocolo de aquecimento, mas não observamos o rompimento dessa ponte salina. Isso indica que o sistema não foi forçado a assumir uma determinada conformação e sim que as mudanças observadas correspondem a um estado energeticamente mais favorável. As 5 estruturas com suas respectivas poses de

ancoramento molecular (TRV027 e AngII) foram utilizadas como estruturas iniciais para as dinâmicas moleculares de complexo.

Protocolo 1		Protocolo 2		Pro	otocolo 3	Protocolo final	
Temp	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura
o (ps)	(K)	(ps)	(K)	(ps)	(K)	(ps)	(K)
0	310	0	310	0	310	0	310
100	400	500	450	200	600	200	600
150	350	1000	400	400	900	400	700
200	310	1500	350	500	1000	500	800
3000	310	2000	310	600	800	600	700
-	-	3000	310	700	700	700	600
-	-	-	-	800	600	800	500
-	-	-	-	900	500	900	450
-	-	-	-	1000	400	1000	400
-	-	-	-	1200	310	1200	310
				3000	310	3000	310

Tabela IV. Esquemas de aquecimento testados para a etapa de simulated annealing.



Figura 22. Resultados da etapa de *simulated annealing* (SA) da estrutura 2. Pose de ancoramento molecular (*docking*) da AngII antes (A) e depois (B) da etapa de SA. Pose de *docking* do TRV027 antes (C) e depois (D) da etapa de SA. Reparar na formação da ponte salina entre carboxilato terminal e Lys199^{5.42} em ambos os casos. Representação na forma de *sticks* e *cartoon*.

5.6. Análise de Dinâmica Molecular

Como a estrutura 2 apresentou a maior semelhança com os critérios de seleção anteriores, descreveremos as interações ligante-receptor somente desses complexos. No caso do receptor *apo*, observamos o mesmo padrão de comportamento em todas as 10 dinâmicas, por esse motivo descreveremos os eventos ocorridos na dinâmica 1. Nesse tópico abordaremos as interações dos ligantes com o receptor e depois compararemos os três sistemas.

5.6.1. Angiotensina II

A porção N-terminal da AngII forma uma ponte salina com o Asp263^{6.58} enquanto a cadeia lateral da AngII-Asp1 interage com a Arg23^{N-terminal}, sendo essa última interação descrita por Santos e colaboradores (Figura 23, Santos et al., 2003). Diferente do esperado, a ponte salina formada entre AngII-Arg2 e Asp281^{7.32} é rompida e a AngII-Tyr4 assume essa posição. Apesar da AngII-Val3 estar orientada para o lado oposto da cavidade do receptor, a AngII-Ile5 está orientada logo acima do bolso hidrofóbico (Phe77^{2.53}, Val108^{3.32}, Leu112^{3.36}, Trp253^{6.48}, Ile288^{7.39}, Ala291^{7.42}, e Tyr292^{7.43}), assim como a AngII-Phe8. Ao longo da simulação o resíduo Trp253^{6.48} deixa de se posicionar de modo vertical, em contato com a cavidade, e passa a se orientar de modo perpendicular ao eixo z e orientado na direção da TM5 (Figura 23). A interação entre o carboxilato terminal da AngII com a Arg167^{ECL2} foi mantida ao longo da dinâmica. Um evento não esperado foi a quebra da ponte salina entre o carboxilato terminal da AngII com a Lys1995.42 no início da simulação, acompanhado pelo afastamento da porção superior das TM4 e TM5, tendo um aumento constante da distância entre os carbonos a dos resíduos Leu161 (TM4) e Lys199 (TM5) passando de 11,0 Å para 15,3 Å ao final da dinâmica.

5.6.2. TRV027

Diferente da AngII, a presença do grupo metila no N-terminal da TRV027-Sar1 (Figura 23) reduz as possibilidades de interação com os grupos ácidos da ECL3, como o Asp263^{6.58}. Apesar disso, observamos a ponte salina entre TRV027-Arg2 e Asp281^{7.32} de modo semelhante ao observado para a AngII, porém há uma troca pela interação

TRV027-Sar1 e Asp281^{7.32} ao longo da simulação. As ligações de hidrogênio entre TRV027-Tyr4 e T87^{2.63} flutuam pelos 60 ns iniciais, mas depois são rompidas.



Figura 23. Padrão de interação ligante-receptor das dinâmicas de complexo. (A) *Frame* inicial e (B) final do complexo AngII-AT1R, reparar no rompimento da ponte salina AngII-Phe8-Lys199. (C) *Frame* inicial e (D) final do complexo TRV027-AT1R, mostrando a manutenção da ponte salina. Reparar na diferença de orientação da Pro-7 de ambos os ligantes. Parte do bolso hidrofóbico (Phe77^{2.53}, Leu112^{3.36}, Trp253^{6.48}, Ile288^{7.39} e Tyr292^{7.43}), é mostrada com resíduos coloridos de laranja. Representação na forma de *sticks* e *cartoon*.

A Pro7 nos ligantes peptídicos provoca uma curva na cadeia principal, que restringe a posição do resíduo 8. Enquanto a AngII-Pro7 restringe o posicionamento da AngII-Phe8 para a cavidade hidrofóbica, no TRV027 a ausência de um grupo volumoso permite que o carboxilato terminal se posicione mais profundamente, afastando-o da Arg167^{ECL2}. De fato, temos a manutenção da ponte salina entre TRV027-D-Ala8-Lys199^{5.42} ao longo da dinâmica, acompanhada do aumento da distância entre

Leu161^{4.42} e Lys199^{5.42} de 10 Å para 12,1 Å do *frame* inicial para o final. O Trp253^{6.48} apresentou um comportamento completamente diferente, permanecendo em contato com a cavidade hidrofóbica e inclusive se projetando para o seu interior ao longo da dinâmica.

Como não observamos mudanças na posição do Trp253^{6.48} nas simulações *apo*, isso sugere que a presença do anel aromático volumoso da AngII-Phe8, ausente no ligante enviesado, seria responsável por provocar as mudanças de posição do Trp253^{6.48}, que participa do processo de ativação do receptor. Também sugerimos que as reduzidas interações do grupo TRV027-Sar1 com os resíduos ácidos da ECL3 facilitariam o posicionamento mais profundo no sitio de ligação, explicando os nossos resultados.

Quanto ao afastamento de TM4 e TM5, não podemos atribuí-lo unicamente ao rompimento da interação entre o carboxilato terminal da AngII e a Lys199. Apesar de a ponte salina ser a combinação das interações do tipo iônica e ligação de hidrogênio, que correspondem às duas interações intermoleculares energeticamente mais custosas de se romper, o afastamento da porção superior das TM4 e TM5 envolveria a participação de diversos outros resíduos, sendo necessária uma análise mais minuciosa para atribuir relação causal.

5.6.3. Comparação entre os três sistemas

O módulo do_dssp do GROMACS faz uso do *Dictionary of Secondary Strucutre* of *Proteins* (dicionário de estrutura secundária de proteínas, DSSP) para calcular a estrutura secundária mais provável de uma proteína com base na sua estrutura tridimensional. Isso é feito pela leitura da matriz de posições atômicas seguida do cálculo de energia das ligações de hidrogênio entre todos os átomos. Com base nos valores de distância, ângulos e nas duas ligações de hidrogênio mais fortes, a estrutura secundária mais provável de cada resíduo é determinada e, consequentemente, da proteína inteira (Pronk *et al.*, 2013).

Os gráficos de DSSP permitem o estudo da estrutura secundária em função do tempo, identificando eventos maiores que envolvam diversos resíduos. De um modo geral, a estrutura das hélices e regiões de alça foram mantidas ao longo das simulações. No entanto, a alça C-terminal apresentou regiões de dobramento, folhas β e até α -hélices, que eram rapidamente formadas e desfeitas. Nas simulações *apo* essa alça passa de uma conformação estendida e paralela à bicamada lipídica (Figura 15) para uma

conformação enovelada e localizada abaixo das alças intracelulares (ICL1, ICL2 e ICL3). No caso dos complexos, as simulações já começam com o C-terminal enovelado abaixo das alças, permanecendo assim ao longo das simulações. Já a porção N-terminal apresenta uma limitação de movimentação devido à ponte dissulfeto entre Cys18^{N-terminal}-Cys274^{ECL3}, resultando no seu posicionamento acima da ECL2 em todos os sistemas.

Quando analisamos as porções transmembrana, as principais observações podem ser divididas em duas partes: segmentos em que ocorre quebra de helicidade e resíduos em que ocorrem angulações, ou "viradas", de α -hélice.

Os resíduos Leu $161^{4.42}$ e Phe $204^{5.47}$, localizados nas TM4 e TM5, respectivamente, correspondem a pontos de virada da α -hélice (Figura 24), ou seja, interrupções de um único resíduo. É interessante notar que essas viradas permanecem em todas as simulações do receptor *apo* e estão presentes inclusive no cristal 4YAY (Zhang *et al.*, 2015a), porém não são constantes nas simulações *holo* (Figura 25). A Leu $161^{4.42}$ está localizada no final da TM4, perto da ECL2, e sua cadeia lateral aponta para fora do receptor, interagindo com a bicamada lipídica. Já a Phe $204^{5.47}$ faz parte de um bolso hidrofóbico localizado logo abaixo do sitio de ligação explorado pelas sartanas. Mutações nesse resíduo levam a perda moderada de afinidade de ligantes não peptídicos (Ohno *et al.*, 2011).



Figura 24. Variação da estrutura secundária de AT1R por tempo de simulação para o sistema *apo*. (A) Dinâmica 1 do receptor *apo*, mostrando a estrutura secundária característica de cada região, como as viradas constantes nos resíduos Leu161^{4.42} e Phe204^{5.47}. (B) Último quadro (*frame*) da dinâmica 1 submetido a uma nova simulação de SA. A perturbação da estrutura secundária (surgimento de viradas) no primeiro nanossegundo de simulação é observada em todas as hélices. Nos dois nanossegundos seguintes a estrutura secundária retorna ao padrão da dinâmica de produção.

Observamos que o intervalo Tyr292^{7,43}-Asn298^{7,49} apresenta pequenas flutuações de helicidade nas simulações do receptor *apo*, no entanto, nas simulações com os ligantes (AngII e TRV027) há uma clara quebra de helicidade (Figura 25). Esse segmento inclui parte do motivo NPxxY (Asn298^{7,44}-Tyr302^{7,53}), que é característico de GPCRs, participando das mudanças conformacionais mediadas por agonistas (Hunyady *et al.* 1995). Mutações na Tyr292^{7,43} impedem a sinalização da via da proteína G e impedem a ocupação do sitio de ligação do receptor por ligantes (Nikiforovich *et al.*, 2006). De modo semelhante, mutações na Phe293^{7,45} e na Asn294^{7,45} prejudicam a ativação do receptor e acoplamento com a proteína G, respectivamente (Hunyady *et al.* 1998; Nikiforovich *et al.* 2006). Cabana e colaboradores utilizaram um modelo de homologia do receptor AT1 e observaram padrões de RMSD distintos no segmento Asn288^{7.39}-Asn295^{7,46} quando compararam os receptores *apo* e *holo* (AT1R-AngII e AT1R-SI; Cabana *et al.*, 2015), sugerindo uma maior flexibilidade nessa região.

Essa porção da TM7 se encontra adjacente ao segmento Ile246^{6.41}-Ile254^{6.49}, que é composto por resíduos hidrofóbicos e ainda contém o motivo CWxP. É descrito que o Trp253^{6,48}, também conhecido como "*rotamer toggle*", é responsável por um processo de rearranjo de posição dos resíduos na TM6, participando da ativação do receptor, como já descrito para a rodopsina e o receptor β-adrenérgico do tipo II (Xie *et al.*, 2011). Por se tratar de uma região apenas com resíduos hidrofóbicos, excetuando-se a Ser252^{6,47}, o custo energético para o rompimento dessas interações seria baixo. No cristal 4YAY e no início das simulações *apo*, o Trp253^{6,48} se encontra orientando de modo paralelo ao eixo z, apontando para o sitio de ligação, localizado logo acima. No entanto, nos demais sistemas o Trp253^{6,48} se curva na direção da TM5 e assume uma conformação perpendicular ao eixo z. Desta forma, as mudanças estruturais observadas na TM7 poderiam ter participação dessa mudança na região de interface entre TM6 e TM7.

Uma virada de α -hélice é observada na região Leu70^{2.46}-Ala71^{2.47} nas simulações da AngII, que faz parte do motivo LALAD (Leu70^{2.46}-Asp74^{2.50}). Diversos estudos demonstram que o resíduo Asp74^{2.50} participa na ativação da via da proteína G mediada por agonista pleno (Bihoreau *et al.*, 1993). É postulado que a ocupação do sitio de ligação pela AngII desestabiliza a ligação de hidrogênio Asn111^{3.35}-Asn295^{7.46}, permitindo que a Asn295^{7.46}/Tyr292^{7.43} façam uma ligação de hidrogênio com o Asp74^{2.50} (Marie *et al.* 1994, Groblewski *et al.* 1997, Inoue *et al.* 1997). Mutações únicas ou duplas nos resíduos Asp74^{2.50} e Tyr292^{2.43} impedem a ocorrência da ligação

de ligantes e reduzem a produção de IP₃ (via da proteína G; Nikiforovich et al., 2006), indicando a participação direta ou indireta desses resíduos. A ligação de hidrogênio Asn111^{3.35}-Asn295^{7.46} está presente no cristal (Figura 26), mas ela é rapidamente rompida nas simulações *apo* e uma ligação de hidrogênio estável Asp74^{2.50}-Asn295^{7.46} é formada, permanecendo por toda a dinâmica. Viradas de α -hélice ou pequenas quebras de hélice próximas do resíduo Asn46^{1.50} ocorreram nos sistemas holo. Estudos de modelagem sugerem que o receptor ativo teria uma rede de ligações de hidrogênio entre Asn46^{1.50}, Asp74^{2.50} e Asn295^{7.46} (Cabana et al., 2013, Cabana et al., 2015). Nas nossas simulações com a AngII observamos ligações de hidrogênio entre Asp74^{2.5}- Asn295^{7.46} e Asn46^{1.50}-Asp74^{2.50} em 24% e 17% dos frames totais, respectivamente. Nas simulações com o TRV027 ambas as ligações anteriores estão presentes, porém a ligação Asn46^{1.50}-Asp74^{2.50} existe em apenas 8% dos frames. O mutante N46D é constitutivamente ativo para a via da β -arrestina, indicando que a mudança para uma carga negativa e redução de sua capacidade de ser um doador de ligação de hidrogênio são essenciais para a ocorrência de agonismo enviesado (Cabana et al., 2015), no entanto, a abolição de interações no mutante N46G leva a um receptor incapaz de ser ativado. Desta forma, a redução da frequência das ligações de hidrogênio observada entre Asn46^{1.50}-Asp74^{2.50} observada nas simulações com o TRV027 sugere um padrão de interação semelhante ao do mutante enviesado. Essa quantidade reduzida de interações reforçaria a hipótese levantada anteriormente de que o ligante enviesado manteria o receptor em um estado intermediário de ativação. No entanto, devemos ressaltar que a diferenca de frequência de ligações de hidrogênio Asn46^{1.50}-Asp74^{2.50} no sistema *apo* é de 5%, um valor muito próximo do obtido para o ligante enviesado.



Figura 25. Variação da estrutura secundária de AT1R por tempo de simulação para os sistemas *holo*. (A) dinâmica de produção do complexo AngII-AT1R e (B) dinâmica de produção do complexo TRV027-AT1R. As setas vermelhas indicam as regiões de quebra de helicidade (Tyr292^{7.43}-Asn298^{7.49}) em ambos os sistemas. A virada na região Leu70^{2.46}-Ala71^{2.47} é exclusiva do sistema AngII, enquanto a virada Leu81^{2.57}-Phe82^{2.58} é exclusiva do sistema TRV027. Flutuações de estrutura secundária na região correspondente ao resíduo Asn46 são observadas em ambos os sistemas.

Para nos certificarmos de que as quebras de helicidade e viradas de α -hélice aqui observadas foram consequência da presença dos ligantes no sitio de ligação e não do aquecimento súbito na etapa de SA, submetemos o último frame da simulação do receptor *apo* ao mesmo protocolo de SA dos complexos (Figura 24). De fato, observamos uma desestabilização de todas as hélices no primeiro nanossegundo de aquecimento, porém, com a redução de temperatura, em menos de 2 ns temos o retorno da estrutura secundária original. Isso indica que as mudanças descritas anteriormente foram provocadas pela presença dos ligantes no sitio de ligação do receptor e não pelo processo de SA.

Um possível marcador de estado ativo para o AT1R, o chamado "ionic lock" (Figura 27), ou trava iônica, é encontrado em GPCRs de classe A, como o receptor β adrenérgico do tipo 1 e a rodopsina (Dror et al. 2011, Rovati, et al. 2007). A hipótese mais aceita diz que a Arg^{3.50} do motivo E/DRY possui uma ponte salina com o Asp/Glu^{6.30} mantendo a porção intracelular das TM3 e TM6 próximas em um estado "fechado", impedindo a interação com a proteína G heterotrimérica (Hébert et al., 2017), enquanto no receptor ativo, essa interação é rompida e a Arg^{3.50} passaria a interagir com Asp^{3.49}. Gabörik e colaboradores demostraram que esse motivo participa do processo de ativação do receptor e que o mutante DRY/AAY ativa exclusivamente a via da β-arrestina, sendo, portanto, um mutante enviesado. O "ionic lock" não seria possível no AT1R, pois este não possui um resíduo ácido na posição 6.30, como descrito no cristal (Zhang et al., 2015a). No entanto, observamos a formação de uma ponte salina entre Arg $126^{3.50}$ e Asp $236^{6.32}$ em 7 das 10 simulações do receptor *apo*. Além dessa interação se mostrar estável por dezenas de nanossegundos, quando rompida temos a formação simultânea de uma nova ponte salina com o resíduo Asp125^{3.49}. O mais interessante é que o oposto também foi observado, com a troca de interação da Asp125^{3.49} para Asp236^{6.32} (Figura 29). A análise de distribuição de distância entre esses resíduos mostra um claro comportamento bimodal (Figura S4), reforçando a hipótese da existência de um sistema de interações semelhante ao "ionic lock". No caso das simulações de complexo, todos os frames selecionados para a etapa de ancoramento molecular possuíam a ponte salina entre Arg126^{3.50} e Asp125^{3.49}, e assim permaneceram "abertos" ao longo de todas as dinâmicas de produção.

Como descrito para o receptor AT2R, a ativação do receptor seria acompanhada de uma mudança na posição das hélices (Zhang *et al.*, 2017), como o afastamento das TM3 e TM6. No entanto, com exceção do afastamento da TM4 e TM5 no sistema da

AngII (pose 1 e pose 2), os movimentos globais das porções transmembrana não se mostrou de maneira pronunciada. Devemos lembrar que o processo de ativação total de GPCRs é da ordem de escala dos microssegundos, enquanto nossas simulações têm duração de nanossegundos. Portanto, era esperado que mudanças estruturais maiores envolvendo o afastamento ou aproximação de transmembranas não fossem observadas. No entanto, eventos relacionados a interações pontuais entre grupos de resíduos, que pertencem à escala dos nanossegundos, foram observados. De fato, somente com um tempo de simulação total da ordem dos microssegundos e o uso de modelos estatísticos que Kohlhoff e colaboradores observaram movimentos globais do receptor βadrenérgico do tipo II (Kohlhoff et al., 2013). Nossos resultados sugerem que os eventos observados nos nossos sistemas holo são semelhantes aos observados nos demais GPCRs correspondendo a eventos iniciais da ativação do receptor, ou estados próximos ao estado ativo (active-like states). Com base nos nossos resultados, sugerimos o seguinte mecanismo para explicar a ativação pelo agonista pleno AngII: mudança conformacional do Trp253^{6.48} induzida pela AngII-Phe8 da receptor, perda de helicidade das TM1, TM2 e TM7, resultando no padrão de ligação de hidrogênio com alta frequência da ligação Asn46^{1.50}-Asp74^{2.50}. No caso do ligante enviesado, não teríamos as mudanças no Trp253^{6.48}, as mudanças conformacionais na TM1 e TM7 ocorreriam, mas a TM2 permaneceria sem a virada no motivo LALAD, o que causaria um posicionamento do Asp74^{2.50} semelhante ao do receptor apo, prejudicando a ocorrência da ligação de hidrogênio Asn46^{1.50}-Asp74^{2.50}, portanto, o agonista enviesado provocaria apenas parte dos eventos de ativação induzidos pela AngII, capturando o receptor em um estado intermediário de ativação.



Figura 26. Padrão de ligação de hidrogênio de todos os sistemas. (A) Cristal 4YAY, mostrando a ligação de hidrogênio Asn111^{3.35}-Asn295^{7.46}, característica do estado inativo. (B) Receptor *apo*, destacando-se a ligação de hidrogênio estável entre Asp74^{2.50}-Asn295^{7.46}. (C) Complexo AngII-AT1R e TRV027-AT1R (D), mostrando a rede de ligação de hidrogênio entre Asn46^{1.50}-Asp74^{2.50} e Asp74^{2.50}-Asn295^{7.46}, reparar como a quebra de helicidade na região LALAD (Leu70^{2.46}-Asp74^{2.50}) facilita o posicionamento e interação com Asn46. (E) Frequência de ligação de hidrogênio de cada sistema concatenado. Representação na forma de *sticks* e *cartoon*.



Figura 27. Representação do possível *ionic lock*, ou trava iônica, no AT1R. A interação entre os resíduos Arg126-Arg236 manteria o receptor em um estado "fechado". O rompimento dessa interação e a formação da ponte salina entre Asp125-Arg126 provocaria a "abertura" do *ionic lock* seguida de um afastamento das porções intracelulares das TM3 e TM6. Visualização da porção intracelular do receptor (de baixo para cima), representação na forma de *sticks* e *cartoon*.



Figura 28. Estruturas dos sistemas *holo*. (A) Complexos AngII-AT1R e (B) TRV027-AT1R. Em azul escuro temos a TM1 mostrando a curvatura da α -hélice, em laranja temos a TM7 mostrando a quebra de helicidade dos resíduos (Ile290-Leu300), em amarelo é mostrado o motivo CWxP, em azul claro temos a pequena virada na TM2 (Leu80-Ala81, somente no sistema TRV027). Os ligantes no sitio de ligação são mostrados em verde. Representação na forma de superfície e *cartoon*.



Figura 29. Padrão de interação do possível "*ionic lock*". (A) Pontes salinas entre Asp74^{2.50}-Arg236^{3.32} (esquerda) e Asp125^{3.50}-Arg126^{3.51} (direita) caracterizando os estados "fechado" e "aberto", respectivamente. Gráficos de distância mínima entre Arg126^{3.51}-Asp236^{3.32} (esquerda) e Asp125^{3.50} e Arg126^{3.51} (direita) nos sistemas apo (B), AngII-AT1R (C) e TRV027AT1R (D). Reparar na mudança de interação simultânea entre os dois resíduos ilustrando o processo de fechamento do *ionic lock* em 80 ns na simulação apo. Nos sistemas *holo* a ponte salina Asp125^{3.50}-Arg126^{3.51} é constante, mantendo o *ionic lock* "aberto".

Paralelamente à publicação dos resultados apresentados até aqui, outros grupos desenvolveram estudos computacionais e experimentais visando solucionar essas mesmas questões sobre o mecanismo de ativação e interações ligante-receptor (Singh et al., 2019). Dentre eles, destaca-se o grupo de Lefkowitz, que resolveu a estrutura do AT1R ativo com um ligante peptídico (agonista parcial) no sitio de ligação utilizando a técnica de cristalografia de raio X em associação com nanobodies (PDB ID: 6DO1). (Wingler et al., 2019a). Apesar das limitações intrínsecas da cristalografia de proteínas de membrana, como a necessidade de truncamento de segmentos e uso de condições não representativas do ambiente proteico, muitos desses resultados estruturais também foram observados pela técnica de espectroscopia de ressonância dupla elétron-elétron (Double Electron-Electron Resonance, DEER), reforçando a importância dos achados (Wingler et al., 2019b). Até então, somente o estado inativo e o modo de ligação das sartanas era compreendido, e havia um hiato de trabalhos computacionais com esse cristal. Como esses trabalhos correspondem a um marco no estudo do AT1R, consideramos importante comparar nossos resultados baseados no cristal inativo 4YAY com os dados experimentais recentemente publicados para o cristal ativo 6DO1, como forma de validação experimental do modo de ligação dos ligantes peptídicos.

5.6.4. Comparação com o cristal 6DO1

Diferente dos cristais anteriores, o 6DO1 possui a proteína termoestabilizadora BRIL inserida na porção intracelular entre os resíduos Tyr226^{ICL3} e Asp227^{ICL3} ao invés da porção N-terminal. Essa mudança evita a perda de afinidade do receptor por ligantes, porém interfere no posicionamento da ICL3. Logo abaixo da ICL2 e TM3, encontra-se o *nanobody*, cuja função é estabilizar o receptor num estado ativo com afinidade aumentada pelo ligante peptídico que se encontra no sitio de ligação, o composto S1I8 [(Sar¹, Ile⁸)-AngII]. A sobreposição dos cristais ativo e inativo revela que as mudanças de posicionamento de resíduos e hélices envolvem as TM5, TM6 e TM7. O mecanismo de ativação do AT1R proposto pelos autores começa com a S1I8-Ile8 iniciando a cascata de mudanças conformacionais que são propagadas do centro do receptor para as porções intracelulares. Comparado com o estado inativo, há o deslocamento da Lys199^{5.42} e da TM5 na direção do carboxilato terminal do ligante em 4,5 Å. A cadeia alifática da S1I8-Ile8 empurra o Trp253^{6.48} e a Tyr292^{7.43} para baixo da cavidade do receptor. Essas mudanças estariam ligadas com uma trava conformacional diretamente abaixo causando a Phe249^{6.44} e a Phe250^{6.45} a passar pela Phe208^{5.51}, de modo semelhante a uma cremalheira. Por um movimento de rotação da TM6, ocorre a criação de um espaço vazio que pode ser preenchido pela Asn295^{7.46} quebrando a ligação de hidrogênio com a Asn111^{3.35} presente na estrutura inativa. Finalmente, o afastamento da porção intracelular da TM6 seria acompanhado do movimento da TM7, que seria estabilizado pela formação da ligação de hidrogênio mediada por água entre Tyr215^{5.58} e Tyr302^{7.53} do motivo NPxxY.

Nas nossas simulações também observamos que a cadeia lateral do resíduo 8 seria responsável pelo processo de ativação do receptor por causa do posicionamento propício dos ligantes e pelas mudanças induzidas pela AngII-Phe8 no Trp253^{6.48} (Figura 23). No entanto, observamos uma rotação e deslocamento do grupo indol do Trp253^{6.48} na direção intracelular, permanecendo entre a TM5 e TM6, enquanto no cristal 6DO1 o motivo CWxP é deslocado em 1,1 Å para a porção intracelular. Em nossas simulações as mudanças no motivo CWxP não envolvem uma rotação tão pronunciada da TM6, portanto não observamos o mecanismo de cremalheira, sendo o afastamento da porção intracelular intermediário ao observado para o estado ativo (Figura 30, Figura S5). O mesmo vale para a TM7, observamos a perda de helicidade, principalmente no segmento Tyr292^{7.43}-Asn295^{7.46}, mas não observamos a rotação da hélice como um todo.

O cristal ativo 6DO1 não apresenta as regiões de virada da TM1 (Asn46^{1.50}) e TM2 (motivo LALAD) que observamos e nem as mudanças na rede de ligações de hidrogênio reportadas por Cabana e colaboradores (Cabana et al., 2015). Na verdade, a sobreposição dos resíduos das TM1, TM2, TM3 e TM4 entre os cristais ativo e inativo é quase que completa (Figura 31), indicando que as mudanças relacionadas à ativação do receptor se limitam às demais regiões.

Apesar da hélice 8 assumir uma posição paralela ao eixo da membrana plasmática no cristal ativo, como observado para o AT2R (Zhang *et al.*, 2017), Wingler e colaboradores reportam que resultados de DEER e de simulações de dinâmica molecular convergem para um comportamento desordenado da hélice 8. Nossas simulações foram obtidas empregando o mesmo campo de força, geometria inicial (4YAY) e composição de bicamada lipídica, reforçando esses achados. Além disso, o AT1R carece do sitio de palmitoilação da hélice 8, que seria responsável pelo ancoramento da hélice na membrana nas demais proteínas da classe (Escriba *et al.*, 2007). Isso reflete uma das limitações da cristalografia, que é fornecer uma única estrutura de um sistema tão flexível como as GPCRs. Outra limitação é a criação de ambientes não representativos, como a inserção da proteína BRIL na ICL3, resultado na formação de uma α -hélice ao fim da TM5, que não corresponde a uma conformação possível da ICL3, pois ela conecta as TM5 e TM6. Apesar disso, entendemos que a manutenção da capacidade de sinalização celular e da afinidade por ligantes deste mutante, indicam que o posicionamento da TM5 corresponderia a uma das principais conformações do estado ativo.

Apesar de trabalhos anteriores reportarem o S1I8[(Sar¹,Ile⁸)-AngII] como um agonista enviesado para as vias da β -arrestina 1 e 2 (Zimmerman et al 2012, Domazet *et* al., 2015), estudos mais recentes mostram a capacidade desse peptídeo de ativar a via G_q com E_{max} equivalente a 50% do agonista pleno (Namkung et al., 2018, Karnik et al., 1999), o que o torna um agonista parcial. É interessante notar que o a única diferença entre o agonista enviesado TRV027 [(Sar¹,D-Ala⁸)-AngII] e o composto S1I8 corresponde a cadeia lateral do resíduo 8, que apresenta uma isoleucina no lugar da Dalanina. Zimmerman e colaboradores exploraram o efeito do volume da cadeia lateral na posição 8 e descobriram que agonistas plenos possuem grupos volumosos nessa posição, como o composto SVdF [(Sar¹,D-Phe⁸)-AngII] e a AngII, enquanto agonistas enviesados possuem grupos de volume pequeno, como o TRV023 [(Sar¹,Lys⁵D-Ala⁸)-AngII] (Zimmerman et al., 2012). Devido à alta semelhança estrutural, é muito provável que tanto a AngII quanto o TRV027 tenham um modo de ligação semelhante ao do S1I8, portanto, faremos comparações diretas sobre o modo de ligação destes compostos. Diferente das etapas anteriores, utilizaremos a pose 1 do sistema AngII-AT1R, pois esta apresentou a orientação de resíduos mais próxima do cristal ativo (Figura 31) essa mudança não foi necessária para o sistema TRV027-AT1R.



Figura 30. Comparação da posição das hélices na porção intracelular do AT1R. (A) Cristal 4YAY (inativo) sobreposto com sistema TRV027-AT1R (pose 2A - frame 102 ns). (B) Cristal 6DO1 (ativo) sobreposto com sistema TRV027-AT1R (pose 2A - frame 102 ns). As viradas na TM1 e TM2 provocam mudança no posicionamento das porções intracelulares que não são observadas nos cristais. Apesar disso, observamos mudanças na posição das TM5, TM6 e TM7 que se assemelham mais ao estado ativo do receptor. Representação na forma de *cartoon*.

O ligante S1I8 encontra-se orientado de modo vertical na cavidade com a porção N-terminal apontada para a porção extracelular e, consequentemente, com o último resíduo no interior da cavidade do receptor, como descrito para a AngII (Fillion et al., 2013). A S1I8-Sar1 se posiciona entre os resíduos Gln15^{N-terminal}, Asp17^{N-terminal} His183^{ECL2}, de modo mais externo do que o primeiro resíduo de ambos os ligantes nas nossas simulações. O posicionamento da porção N-terminal sobre a folha-beta (ECL2) forma uma terceira folha antiparalela de modo semelhante a um beta barril parcial, observamos a formação desse esse mesmo padrão nas simulações com a AngII.



Figura 31. Sobreposição dos sistemas simulados e cristais do AT1R. (A) Comparação entre cristal ativo 6DO1 (colorido) e inativo 4YAY (cinza). (B) Comparação da pose 2 do sistema TRV027-AT1R (colorido) com o cristal 6DO1 (cinza). (C) Comparação da pose 1 da AngII-AT1R com o cristal 6DO1 (cinza). (D) Cavidade do cristal ativo mostrando as diferenças de posicionamento com a TM5 do sistema TRV027-AT1R. (E) Cavidade do sistema TRV027-AT1R comparado com o cristal 6DO1. (F) Cavidade do sistema AngII-AT1R comparado com o cristal 6DO1. (F) Cavidade do sistema AngII-AT1R comparado com o cristal 6DO1. Reparar nas diferenças de tamanho de cavidade e sobreposição com a molécula de água estrutural do 6DO1.

O grupo guanidínico da S1I8-Arg2 se encontra mais internamente no receptor entre os resíduos Asp263^{6.58} e Asp281^{7.32}, assim como observamos para as simulações da pose 2 do TRV027 e, temporariamente, para a pose 2 da AngII. Inesperadamente, há uma curvatura na cadeia principal do peptídeo causada pela S1I8-Tyr4 resultando na orientação da Tyr4 para o interior da cavidade de modo a formar uma ligação de hidrogênio com o carboxilato terminal. Nas nossas simulações a Tyr4 apresentou alta diversidade conformacional interagindo com resíduos das TM1, TM2 e N-terminal, porém sem a formação dessa ponte salina interna. Vale lembrar que o ligante enviesado SII[(Sar1,IIe4,IIe8]-AngII) é o único composto com mutação na posição 4 e apresenta uma capacidade baixa de ativação de ambas as vias quando comparado com a AngII, reforçando a importância dessa interação na ativação do receptor (Wei *et al.*, 2002, Balakumar *et al.*, 2014).

Os resíduos S1I8-Val3 e S1I8-Ile5 se orientam para o mesmo lado, apontando para a TM2. Pierre e colaboradores sintetizaram análogos da AngII com anéis de diferentes tamanhos unindo as posições 3 e 5 e mostraram que a rigidez anelar não causava perdas de afinidade e atividade somente quando os resíduos ficavam orientados no mesmo lado, sugerindo que os ligantes peptídicos acíclicos assumiriam a mesma orientação relativa desses resíduos (Pierre et al., 2018). Esse posicionamento é evidente na pose 1 da AngII-AT1R e a consequência dessa orientação da Ile5 é o posicionamento da Pro7 de modo que os carbonos carbonílicos dos resíduos 6 e 7 fiquem orientados para a Arg167^{ECL2}, assim como observado anteriormente para o TRV027-AT1R. Outra consequência do posicionamento da Pro7 se reflete na cadeia lateral da Ile8, que se encontra ao lado da Ile288^{7.39} e logo acima da Leu112^{3.64}, Tyr292^{7.43} e Trp253^{6.48}. Nas simulações com o agonista enviesado, observamos parte da Pro7 e o último resíduo ocupando essa mesma região. No entanto, nas simulações do sistema AngII-AT1R (pose 1 e pose 2) a AngII posiciona-se mais profundamente com o grupo fenil logo acima do Trp253^{6.48} e a Ile5 interagindo com Tyr292^{7.43}. Como apontado pelos autores, a substituição da SI-Ile8 por uma Phe8 não seria possível sem causar sobreposição atômica, indicando que um grupo mais volumoso necessariamente provocaria perturbações ainda maiores nessa porção do bolso hidrofóbico.

A existência da ponte salina entre o carboxilato terminal dos resíduos na posição 8 com a Lys199^{5.42} foi confirmada no receptor ativo (Noda *et al.*, 1995, Fillion *et al.*, 2010, Balakumar *et al.*, 2014). Quando comparamos as nossas simulações com o novo cristal, observamos uma rotação da Lys199^{5.42} acompanhada de uma aproximação da

porção extracelular da TM5 de 3,5 Å na direção do centro do receptor, reduzindo significativamente o volume da cavidade. Além disso, o cristal apresenta uma molécula de água estrutural entre a Ser105^{3.29} e a Lys199^{5.42}, limitando ainda mais o ligante a uma posição completamente vertical. Essa ponte salina foi o principal critério para a seleção das poses dos ligantes e não dispúnhamos de informações sobre águas estruturais, consequentemente, as poses selecionadas se localizam mais profundamente na cavidade do receptor. Na etapa de SA do sistema AngII-AT1R, tanto a pose 1 quanto a pose 2 apresentaram a rotação da Lys199^{5.42} acompanhada da aproximação da TM5, no entanto ao longo da dinâmica, como comentado anteriormente, observamos um afastamento da porção extracelular das TM5 e TM4 em relação ao centro do receptor. Tendo em vista a semelhança dos eventos observados afetando o motivo CWxP e a pose reportada para o S1I8, é provável que as mudanças no Trp253^{6.48} sejam representativas, mas não o afastamento das transmembranas, sugerindo que a pose real da AngII seria mais vertical. Até o momento, experimentos de BRET, FRET e DEER, apresentam como principal limitação justamente o acompanhamento unicamente dos movimentos das porções intracelulares, sendo o 6DO1 a evidência mais forte da aproximação da TM5.

O posicionamento da ECL2 impede que poses verticais do ligante alcancem a TM5, sendo a curvatura da cadeia principal a solução encontrada pelo algoritmo de ancoramento molecular para permitir essa interação, resultando nas poses de ancoramento já discutidas. É tentador hipotetizar que inicialmente a entrada do ligante seria mais profunda, como descrevemos, e que depois haveria o retorno a uma posição mais externa e vertical, como o observado para o cristal. No entanto, essa hipótese é muito pouco provável devido ao custo energético de dessolvatação do ligante em uma pose mais profunda; à necessidade de rearranjo de moléculas de água no bolso e às mudanças conformacionais do ligante para o retorno a uma posição vertical. O mais provável seria que durante a entrada do ligante peptídico haveria uma aproximação da TM5 seguida de sua estabilização pela formação da ponte salina.

O processo de entrada do ligante peptídico no sítio e as mudanças conformacionais recíprocas que levam à aproximação da TM5 ainda são desconhecidas. Apesar dessas limitações, obtivemos interações ligante-receptor semelhantes para as cadeias laterais dos resíduos nas posições 2, 3, 5, 7 e 8. Além delas, destacamos a interação dos oxigênios carbonílicos da cadeia principal dos resíduos 6 e 7 com a Arg167^{ECL2} observadas no S1I8 e no ligante enviesado. Na próxima seção discutiremos as implicações dessa observação com mais detalhes.

5.7. Hipótese sobre o modo de ligação.

Como dito anteriormente, os ligantes peptídicos possuem a capacidade de estabilizar a ponte salina com a Lys199^{5.42} (Balakumar *et al.*, 2014) no entanto, um conjunto cada vez maior de trabalhos aponta que o mesmo não é válido para as sartanas. Resultados de FRET, BRET (Domazet et al., 2015, Namkung et al., 2018) e DEER (Wingler *et al.*, 2019b) indicam que as sartanas mantém as flutuações conformacionais do receptor em estados semelhantes ao *apo* e estudos de mutagênese mostram que o mutante K199A afeta apenas a afinidade de ligantes peptídicos (Zhang *et al.*, 2015b). Os cristais 4YAY e 4ZUD possuem sartanas com o grupo tetrazol estabelecendo uma ponte salina com a Arg167^{ECL2} ao invés da Lys199^{5.42} e quando esses cristais são usados como geometrias iniciais em simulações de dinâmica molecular, as interações com a TM5 também têm baixa frequência e não ocorrem em todas as sartanas (Singh *et al.*, 2018). O conjunto dessas observações aponta para a ausência da ponte salina entre o grupo tetrazol das sartanas e a Lys199^{5.42}.

Nossos ensaios de ancoramento molecular da olmesartana com o novo cristal revelam que a presença da molécula de água na cavidade resulta em poses afastadas da TM5 e mesmo sem ela, como no cristal 4ZUD, a distância do grupo tetrazol para a Lys199^{5.42} passa de 4,5 Å para 4,9 Å (Figura 32). O planejamento racional da classe das sartanas foi feito de modo que o grupo tetrazol fosse um bioisóstero do carboxilato terminal da AngII (Sallander *et al.*, 2016), mas segundo nossas simulações e o cristal 6DO1, suas interações equivaleriam às que observamos para os oxigênios carbonílicos da cadeia principal dos resíduos 6 e 7. Consequentemente, é possível que a classe das sartanas não explore a ponte salina entre um grupo carregado negativamente e a Lys199^{5.42}, ficando limitada a regiões equivalentes aos resíduos nas posições 4-7 dos ligantes peptídicos.

Outro ponto interessante sobre as sartanas é que o aumento do volume de substituintes na posição *para* em relação ao grupo carregado negativamente, como o composto L-162-782, pode causar atividade agonista (Pelman *et al.*, 1997). Zhang e colaboradores apontam que além desse aumento do volume na cavidade é necessária uma redução das interações com a Tyr87^{2.63} para a conversão de antagonista para agonista, como demonstrado para o composto R774847 (Zhang *et al.*, 2015b). A presença de um grupo volumoso na porção hidrofóbica mais profunda do receptor corrobora com a hipótese de participação da região CWxP na ativação da via Gq e

aponta para a ausência da ponte salina com a Lys199^{5.42} no mecanismo de ativação desses compostos não peptídicos.



Figura 32. Sobreposição do cristal 4ZUD (cinza) com a pose de ancoramento molecular da olmesartana gerada no cristal ativo 6DO1. A presença da molécula de água estrutural resulta em uma pose com orientação e distância do grupo tetrazol (4,5 Å) que não permite interações com a Lys199^{5.42}.

Em vista desses novos resultados, descrevemos a seguinte hipótese para os ligantes no AT1R (Figura 33). Agonistas enviesados estabilizam a ponte salina com a Lys199^{5.42} e estabelecem interações do tipo dipolo entre os carbonos carbonílicos dos resíduos 6 e 7 com a Arg167^{ECL2}. Agonistas plenos fazem as mesmas interações, porém a presença da Phe8, um grupo volumoso, desloca o motivo CWxP na direção

intracelular causando a ativação da via Gq. Por fim, as sartanas, como a olmesartana, estabelecem uma ponte salina com Arg167^{ECL2} e uma ligação de hidrogênio com a Tyr35^{1.39}, porém não estabilizam a ponte salina com a Lys199^{5.42} e só deslocam o motivo CWxP quando grupos volumosos se encontram na posição para.



Figura 33. Diagrama de interações entre ligante-receptor para o TRV027 (A), AngII (B) e olmesartana (C). Interações do tipo hidrofóbica são mostradas em amarelo e interações polares como linhas tracejadas. As setas em cinza indicam a aproximação da TM5 e a seta laranja (B) indica o movimento do Trp253^{6.48}. O grupo volumoso do agonista R794847 (D) é destacado em vermelho.

5.8. Seleção de confôrmero

Para as demais etapas utilizaremos o conjunto de aminoácidos do receptor em contato com os ligantes. De um modo geral, podemos dividir a cavidade em duas partes, a primeira delas é composta de resíduos hidrofóbicos, pouco polares e aromáticos, que correspondem a maior porção da cavidade (Figura 34). Nesta porção temos as TM1 e TM2 interagindo com as cadeias laterais apolares da Val3 e Ile5 do ligante, enquanto na

parte mais profunda da cavidade localiza-se o bolso hidrofóbico, diretamente abaixo dos resíduos na posição 7 e 8 dos ligantes peptídicos. Os aminoácidos que compõem essa primeira parte da cavidade são: Ile31^{1.35}, Tyr35^{1.39}, Phe77^{2.53}, Leu81^{2.57}, Trp84^{2.60}, Tyr87^{2.63}, Thr88^{2.64}, Tyr92^{ECL1}, Val108^{3.32}, Leu112^{3.36}, Tyr113^{3.37}, Phe182 ^{ECL2}, Trp253^{6.48}, Met284^{7.35}, Pro285^{7.36}, Ile288^{7.39} e Tyr292^{7.43}.

A segunda porção, localizada logo abaixo da ECL2, é composta de resíduos polares e carregados que são responsáveis pelas interações mais fortes com os ligantes. A obrigatoriedade dessas interações limita as conformações possíveis dos ligantes na cavidade, resultando nas poses já discutidas. Os aminoácidos dessa porção são: Ser105^{3.29}, Ser109^{3.33}, Arg167^{ECL2}, Lys199^{5.42}, His256^{5.51}, Thr260^{5.55}, Asp263^{5.58}, Gln267^{5.62} e Asp281^{7.32}.



Figura 34. Cavidade do receptor AT1R destacando-se a cadeia lateral dos aminoácidos em contato com o ligante. Reparar na concentração de aminoácidos apolares e aromáticos nas TM1, TM2 e TM3 e na porção mais profunda da cavidade nas TM6 e TM7. Representação na forma de *sticks* e *cartoon*.

Como dito anteriormente, resultados experimentais e computacionais apontam que agonistas enviesados estabilizam estados intermediários de ativação, desta forma a maneira encontrada de se selecionar conformações para a etapa de criação de um farmacóforo levaria em conta as informações do estado ativo do receptor. Separamos os resíduos da cavidade do receptor 6DO1 e os utilizamos como critério para o cálculo de RMSD das trajetórias do complexo TRV027-AT1R. O confôrmero cuja cavidade mais se assemelhou ao estado ativo foi utilizado na etapa seguinte (Figura 35).


Figura 35. Desvio quadrático médio da posição atômica (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) da dinâmica TRV027-AT1R pose 2a em relação ao cristal 6DO1. Essa análise levou em consideração somente os átomos pesados da cavidade do receptor. O frame selecionado (102 ns) encontra-se depois do intervalo de estabilização da dinâmica (40 ns).

5.9. Farmacóforo

Um dos desafios de se trabalhar com agonistas enviesados é encontrar peptídeos que apresentem um alto fator de viés (*bias factor*) para a via da β -arrestina para poderem ser usados nas etapas de validação dos modelos. Além disso, à medida que novos trabalhos são divulgados, compostos descritos anteriormente como enviesados são reclassificados frente à novas evidências, como o composto S1I8, resultando na diminuição do número de compostos disponíveis e causando a reformulação de modelos anteriores. Estruturalmente, agonistas e agonistas enviesados são similares, e estudos explorando análogos de AngII com mutações nas posições 1, 3, 5 e 8 mostram que compostos que possuem N-metil glicina ou N-metil alanina na posição 1 apresentam afinidade aumentada pelo receptor, enquanto peptídeos com cadeias laterais pequenas na posição 8 possuem viés para a via da β -arrestina. A soma destes critérios resulta nos agonistas enviesados mais potentes descritos até o momento, $[(Sar^1, D-Ala^8)-AngII],$ viés: TRV027 apresentando alto fator de **TRV023** [(Sar¹,Lys⁵,Ala⁸)-AngII], TRV034 [(NAla¹,Ala⁸)-AngII] e TRV044 [(NAla¹,D-Ala⁸)-AngII] (Zimmerman et al., 2012, Rajagopal, et al., 2011, Violin et al., 2010).

Esse grupo de agonistas enviesados foi utilizado no servidor DUD-E (Mysinger et al., 2012) para a geração de *decoys* (59 por ligante), totalizando um grupo de 236 *decoys*. Geramos as estruturas tridimensionais de cada um desses compostos, resultando na criação da base de dados de agonistas enviesados e de *decoys*, que foram utilizadas nas etapas de exploração e validação dos modelos por construção da curva ROC e, posterirormente, em ensaios *in vitro*.

A geração de farmacóforos foi feita de modo iterativo: começamos escolhendo três pontos de interação que se mostraram relevantes tanto nas nossas simulações quanto na literatura, atribuímos um grupo farmacofórico adequado para cada um, por exemplo, região hidrofóbica na cadeia lateral da Ile288^{7.39}, e realizamos uma triagem na base de agonistas enviesados fortes. Caso todos os agonistas enviesados fossem encontrados nessa triagem teste, adicionávamos outro ponto de interação e fazíamos uma nova triagem. Se o novo modelo resultasse em menos agonistas enviesados selecionados, substituíamos o ponto adicionado e repetíamos o processo. Como a combinação de pontos iniciais poderia afetar o resultado final, trabalhamos com todas as combinações iniciais possíveis.

Diversos modelos foram gerados e percebemos que a adição de mais do que 5 grupos farmacofóricos resultava em modelos incapazes de encontrar os compostos teste, enquanto a simplificação dos critérios de busca para apenas 4 resultava num número inviável de compostos triados para serem analisados quando usamos uma base de dados maior, como o ZINC15. Por questões práticas, mostraremos apenas os modelos finais.

O farmacóforo 1 (Figura 36) foi baseado na estrutura do ligante TRV027 e as tentativas inicias consideraram as cadeias laterais dos resíduos Tyr4, Ile5, His6, Pro7 e D-Ala8, e os oxigênios carbonílicos da His6 e Pro7. O farmacóforo 2 foi baseado na estrutura do receptor e inicialmente considerou os resíduos Tyr35^{1.39}, Trp84^{2.60}, Arg167^{ECL2}, Lys199^{5.42}, His256^{5.51}, Ile288^{7.39} e Tyr292^{7.43}. Apesar dos estudos de mutagenicidade e os cristais das sartanas apontarem para a importância da Tyr35^{1.39}, tanto nossas simulações quanto o cristal 6DO1 não apresentam interações estáveis. Como comentado anteriormente, a redução das interações com esse resíduo e o aumento do volume próximo do anel estão associados com agonismo, portanto, a não inclusão da Tyr35^{1.39} é estratégica no sentido de excluir possíveis compostos com a atividade antagonista. Além de terem se mostrado relevantes nas nossas simulações, os resíduos que compuseram o modelo final se encontram nas porções mais profundas do receptor e

mutações nos mesmos causam perda de afinidade dos ligantes peptídicos (Zhang *et al.*, 2015a, Zhang *et al.*, 2015b, Balakumar *et al.*, 2014).

O farmacóforo 3 foi baseado na estrutura do ligante presente no cristal 6DO1 e utilizou o mesmo conjunto de resíduos do modelo 1. Os modelos iniciais incluíram um doador de ligação de hidrogênio na Tyr4, cuja importância é discutida pelos autores do cristal 6DO1, porém esses modelos apresentavam seletividade inferior, sendo descartados na etapa de validação (Wingler *et al.*, 2019). Além disso, os pontos finais para ambos os modelos 1 e 3 foram os mesmos, possibilitando uma maior varredura do espaço químico na etapa de triagem virtual já que apenas a distância relativa do centro de cada *grupo* farmacofórico foi alterada.

As curvas ROC representam a probabilidade de um modelo encontrar os compostos ativos independentemente da quantidade e proporção de ativos e *decoys* utilizados. Os 3 farmacóforos (Figura 37) se mostraram robustos, pois apresentaram valores de área sob a curva (AUC, *Area Under the Curve*) superior a 60% (Martinez *et al.*, 2003). Por fim, testamos os 3 farmacóforos finais em uma base de dados de 13 compostos que foram obtidos por triagem virtual em trabalhos anteriores do nosso grupo visando a obtenção de agonistas enviesados para o AT1R (Figura S6). Esses compostos não apresentaram ligação ao AT1R em ensaios de afinidade (Figura S7) e, portanto, caso fossem triados pelos novos modelos seriam falsos-positivos. Nenhum dos 3 modelos selecionou compostos das triagens anteriores. Cabe ressaltar que esses compostos não foram incluídos na etapa de validação, pois apresentam alta variabilidade estrutural e seriam menos específicos que os *decoys*, que são obrigatoriamente semelhantes aos ligantes de referência. Por fim, prosseguimos para a etapa de triagem virtual.



Figura 36. Farmacóforos gerados com base na estrutura dos ligantes TRV027 (A) e SI (E) e do receptor (C). A disposição espacial e as distâncias entre os grupos farmacofóricos de cada modelo são mostradas ao lado (B, D e F). Representação na forma de *sticks* e *cartoon*.



Figura 37. Curva ROC dos três farmacóforos gerados para o AT1R, mostrando que todos os modelos apresentam valor de área sob a curva (AUC) acima de 60% (p-value < 0.0001).

5.10. Triagem virtual

A base de dados ZINC15 *in stock*, inicialmente com 13.241.888 de compostos (20/02/2019), foi filtrada, resultando em 12.836.482 de compostos. As triagens virtuais foram feitas com essa nova base de dados tendo como critério de busca os farmacóforos gerados na etapa anterior (Figura 38). Utilizamos informações extras da literatura para reduzir o número de compostos triados que seguiram para a etapa de ancoramento molecular.

Com exceção de compostos como a eprosartana, os antagonistas do AT1R apresentam um sistema com dois anéis aromáticos interligados restringindo a liberdade conformacional das porções polares e carregadas da sartana, geralmente um ácido carboxílico e um grupo tetrazol, respectivamente. Esses grupos se posicionam de ambos os lados da Arg167^{ECL2}, de modo semelhante a uma pinça (Naik *et al.*, 2010, Kellici *et al.*, 2015, Sallander *et al.*, 2016), portanto, incluímos a presença de dois anéis aromáticos diretamente ligados para facilitar essa possível interação. Como discutido anteriormente, as porções hidrofóbicas e polares da cavidade são bem delimitadas, então

também adotamos como critério de exclusão compostos que apresentassem grupos polares ou carregados que ficassem orientados para as porções hidrofóbicas do receptor. Por fim, o último critério foi a exclusão de compostos com porções volumosas próximas do grupo carregado negativamente que pudessem impedir a interação com a Lys199^{5.42}.



Figura 38. Protocolo de triagem virtual mostrando os principais critérios e compostos selecionados em cada etapa.

A adoção destes critérios resultou na seleção de 249 compostos que prosseguiram para a etapa de ancoramento molecular seguindo a mesma metodologia da etapa anterior (Seção 4.1.6). Desconsideramos novamente os valores das funções de score para a seleção de compostos devido ao problema de orientação invertida na cavidade, portanto, a seleção foi feita com base na inspeção visual seguindo os seguintes critérios: distância do grupo carregado negativo da Lys199^{5.42}, distância do aceptor de ligação de hidrogênio da Arg167^{ECL2}, orientação das porções hidrofóbicas para o bolso hidrofóbico e TM1 e TM2. Os compostos que apresentaram as menores distâncias para esses grupos e orientação adequada foram selecionados, totalizando sete compostos (Figura 39). Apesar de fazerem parte do grupo *in stock*, somente cinco dos sete compostos triados estavam disponíveis para compra imediata e puderam prosseguir para a etapa de ensaios de afinidade (Figura 40).



Figura 39. Resultado final da triagem virtual para os farmacóforos 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Os compostos S1 e S2 não estavam disponíveis para compra. A semelhança estrutural entre os compostos C5 e a valsartana (D) é destacada em azul e verde.



Figura 40. Poses de ancoramento molecular selecionadas dos compostos triados mostrando as distâncias entre os ligantes e os resíduos definidos como essências para agonismo enviesado.

Dentre os compostos triados, destacamos o composto C5 por possuir uma alta semelhança estrutural com a valsartana (Figura 39). Comparado com o grupo dos bifenil tetrazóis, esse composto apresenta um deslocamento na posição do grupo carregado negativo e sua substituição por um grupo carboxilato. Esses dois fatores estão

relacionados com uma diminuição da afinidade pelo receptor (Sallander et al 2016), porém essa posição alternativa facilitaria a interação com a Lys199^{5.42}, que consideramos necessária para o agonismo enviesado. O C5 é um inibidor de receptor tirosina quinase do tipo 2 (Tie2, Liu *et al.*, 2008), mas ainda não foi testado para o AT1R. Outro ponto interessante é que mesmo tendo um log P de 5,8 e 7 HBA, o uso de critérios mais abrangentes na etapa de filtração permitiu a sua seleção.

Após a triagem inicial e antes da seleção com base nas informações extras, o conjunto de compostos triados pelos três modelos continha a série das sartanas, indicando que os modelos utilizados capturaram parte da capacidade de identificar compostos ativos para o AT1R mesmo diferindo entre si e de outras abordagens (Matsoukas *et al.*, 2013, Kellici *et al.*, 2015). Também observamos uma convergência dos 3 modelos pela seleção de outras séries comuns, como os 5-fenilpirazois e 2-fenilfuranos, sugerindo que o número de compostos capazes de atender aos critérios estipulados seja limitado pela base de dados e não apenas pelos farmacóforos em si.

5.7. Ensaios de afinidade

As células HEK-293 transfectadas foram cultivadas segundo as condições descritas na metodologia. Por apresentarem o crescimento na forma de grumos, foi necessária a adição de poli-lisina nas placas de 24 poços para evitar a perda de células por falta de aderência durante as etapas de lavagem. Uma forma rápida e simples de avaliar a expressão do plasmídeo contendo eGFP é o uso da microscopia de fluorescência. Quando incidimos luz com comprimento de onda de 488 nm (azul), o eGFP tem a sua emissão máxima no comprimento de 509 nm (verde), como mostrado na Figura 41. Portanto, assumimos indiretamente a presença do receptor pela presença da proteína eGFP que se encontra no mesmo plasmídeo.

A contagem da ³H-AngII indicou 577.680 cpm/ µL. Desta forma, cada placa de 24 poços foi preparada com 2,07 µL de ³H-AngII e diferentes concentrações dos compostos controle e compostos teste. Após o período de 24 h, as células foram rompidas com tampão de lise e transferidas para tubos contendo líquido de cintilação para a leitura. Em todos os experimentos utilizamos como controle negativo um poço contendo apenas as células e os reagentes do ensaio e como controle positivo um poço

contendo apenas a ³H-AngII. Os valores de contagem por minuto (cpm) destes poços foram considerados os valores 0 e 100%, respectivamente em cada um dos ensaios. Os valores de erro também são mostrados na forma de intervalo de confiança com nível de significância de 5%.



Figura 41. Fotos de células HEK-293 obtidas por microscopia de fluorescência. Células transfectadas com o AT1-GFP (em verde) e células não transfectadas (canto direito).

5.7.1. Piloto do ensaio de binding

O ensaio piloto foi realizado apenas com o ligante não marcado angiotensina II em 6 concentrações diferentes e em triplicata. Os resultados indicam que ocorreu o deslocamento da ³H-AngII para a solução em função da concentração de AngII (Figura 42), sendo obtida uma curva característica de ensaios de afinidade (Zimmerman *et al.*, 2012, Rajagopal, *et al.*, 2011).

Chamamos de ensaio de afinidade de competição do tipo homóloga quando o mesmo composto é usado como radioligante e como composto teste. Nestes ensaios é possível a determinação do valor de K_d do ligante não-marcado, também chamado de ligante frio, quando a concentração da ³H-AngII, o ligante quente, é conhecida. A determinação é feita segundo a equação de Cheng e Prusoff (Cheng *et al.*, 1973):

$$K_d = (IC_{50} - [Radioligante])$$
 (Eq.4)

Substituindo-se os valores na equação 4 e considerando a concentração de ³H-AngII igual a 0,66 nM (GeHealthcare) temos $K_d = 4,5$ nM. Na literatura o valor de K_d da angiotensina II é reportado entre 1,5 - 12 nM (Cheng *et al.*, 1994, Cheng *et al.*, 1995). Idealmente, a queda da curva concentração-resposta de 90% de *binding* para 10% deve ocorrer quando reduzimos a concentração em 81 vezes, ou duas escalas logarítmicas (Auld *et al.*, 2012), o que é observado no ensaio acima. Vale lembrar que K_d é uma propriedade do receptor e do ligante não marcado, enquanto a IC₅₀ é uma propriedade do experimento em si. Portanto, quando mudamos as condições do experimento estamos afetando diretamente o valor de IC₅₀, mas o mesmo não ocorre com o valor de K_d (Auld *et al.*, 2012).



Figura 42. Ensaio de afinidade para a Ang II no receptor AT1R - Porcentagem de ligação da ³H-AngII em função da concentração da AngII.

5.7.2. Ensaio de afinidade

Inicialmente, foram realizados ensaios de afinidade com compostos triados empregando-se um modelo anteriormente desenvolvido pelo nosso grupo (Figura S6). Devido ao intervalo entre os primeiros ensaios de afinidade e os testes com os compostos triados a partir do modelo desenvolvido nesse trabalho (Figura S7), fizemos uma nova contagem da ³H-AngII que resultou em 512.994 cpm/µL. Esse ensaio teve caráter exploratório e por isso utilizamos uma única concentração (1x10⁻⁶ M) para cada

composto. Compostos com afinidade da ordem de micromolar, ainda são interessantes do ponto de vista de planejamento de fármacos, pois podem fornecer uma estrutura base para que modificações sejam propostas (Wermuth, 2007), o chamado composto *hit*. No entanto, com o uso de concentrações mais altas corremos o risco de obtenção de falsos positivos pela ocorrência de agregação de ligantes (Hubner *et al.*, 2010). Outro cuidado utilizado foi o de não exceder 1% do volume total do poço com DMSO para evitar a perturbação ou lise celular durante o ensaio (Auld *et al.*, 2012).



Figura 43. Porcentagem de ligação da ³H-AngII em função da concentração dos compostos testes. Os 5 compostos tiveram seus nomes omitidos para não revelar o composto *hit*.

Como observado na Figura 43, um dos cinco compostos apresentou afinidade pelo receptor, ou seja, foi capaz de competir com a ³HAngII, resultando na diminuição da emissão de radiação β , como observado para a AngII e losartana. Um novo ensaio com diferentes concentrações do composto teste determinará os valores de IC₅₀ e K_d, enquanto que ensaios de ativação de vias específicas, como ensaios de ativação da via da β -arrestina e via G_q, confirmarão se o composto teste possui atividade agonista enviesada (Namkung et al., 2018). Apesar disso, a identificação de um composto "*hit*" com afinidade da ordem de micromolar já possui grande potencial e pode ser utilizado com estrutura base para a geração de análogos com maior afinidade pelo receptor.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho modelamos e simulamos o receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) em três condições diferentes para investigar os eventos conformacionais e interações ligante-receptor responsáveis pelo agonismo enviesado. A comparação dos nossos resultados com o conjunto de trabalhos experimentais e computacionais da literatura nos permite afirmar que nossas observações nos sistemas *holo* são semelhantes às observados nos demais GPCRs e no próprio cristal ativo 6DO1, portanto, observamos eventos iniciais da ativação do receptor, ou estados parecidos com o ativo (*active-like state*). Dentre esses eventos destacamos o deslocamento do motivo CWxP, a perda de helicidade do motivo NPxxY e o deslocamento das porções intracelulares das TM5 e TM6.

Nossas simulações também permitiram a observação de um padrão de interação ligante-receptor que nos permitiu criar uma hipótese sobre o modo de ligação de possíveis ligantes enviesados envolvendo uma ponte salina com a Lys199^{5.42} e ausência.

Apresentamos aqui três modelos que foram usados de maneira complementar para varrer a base de dados ZINC15 *in stock* e selecionar possíveis agonistas enviesados para o AT1R. Dentre os cinco compostos selecionados, um deles apresentou afinidade pelo receptor, podendo, portanto, ser considerado promissor para o desenvolvimento de agonistas enviesados de AT1R. Porém, necessita ter seu padrão de ativação de vias avaliado.

7. PERSPECTIVAS

Por fim, cabe ressaltar que as informações obtidas a partir do estudo detalhado dos eventos conformacionais e interações ligante-receptor responsáveis pelo agonismo enviesado em AT1R, bem como o posterior delineamento de um farmacóforo para esse tipo de resposta, nos permitiram a proposição de uma série de moléculas inéditas com potencial de possíveis *hits* para o desenvolvimento de agonistas enviesados. Torna-se importante, a partir desse trabalho, o estabelecimento de parcerias para a síntese dessas moléculas e realização de novas simulações e testes de afinidade para que se possa confirmar o potencial das mesmas.

8. ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018). Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019 Impresso em: 31/08/2019 15:17:42

 $rac{Panus}{Panus}$ - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9135 - 5941378/1 - Silvestre Massimo Modestia

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5818-1/1	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos – Fundamentos e Aplicações de Análises Multivariadas no Planejamento de Fármacos	15/06/2015	21/06/2015	30	2	85	В	N	Concluída
Crédito Externo	Biologia Estrutural Aplicada a Complexos Protease-Inibidor (1)	03/08/2015	07/08/2015	-	3	90	т	-	-
FBT5738-1/2	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	03/08/2015	19/10/2015	30	0	-	-	Ν	Matrícula cancelada
FBT5776-5/2	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	28/09/2015	11/10/2015	30	2	100	Α	Ν	Concluída
FBF5734-7/4	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico	16/02/2016	30/05/2016	90	6	85	Α	Ν	Concluída
ICB5720-1/5	Curso de Proteção Radiológica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	22/02/2016	28/02/2016	15	1	75	в	Ν	Concluída
FBF5805-2/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/03/2016	19/05/2016	90	6	90	Α	Ν	Concluída
FBT5700-3/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica	08/04/2016	09/06/2016	90	0		-	N	Pré- matrícula indeferida
FBT5738-1/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	01/08/2016	10/10/2016	30	2	90	Α	Ν	Concluída
ICB5752-1/1	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	14/09/2016	27/09/2016	30	0		-	N	Pré- matrícula indeferida
FBT5700-3/4	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica	10/03/2017	11/05/2017	90	6	100	Α	Ν	Concluída
EDM5100-3/1	A Formação do Professor Universitário (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	14/03/2017	05/06/2017	120	0	-	-	N	Pré- matrícula indeferida
FBA5728-4/4	Aprimoramento Pedagógico	30/05/2017	26/06/2017	60	4	75	Α	Ν	Concluída

	Créditos mín	Créditos obtidos			
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese			
Disciplinas:	0	25	32		
Estágios:					
Total:	0	25	32		

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Disciplinas(s) cursada(s) na(o) Universidade Federal de São Paulo. Atribuição de créditos aprovada pelo(a) Comissão de Pós-Graduação em Sessão de 09/03/2016.

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.

Última ocorrência: Matricula de Acompanhamento em 15/07/2019 Impresso em: 31/08/2019 15:17:42

10. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PALL, S.; SMITH, J. C. GROMACS: High performance molecular simulation through multi-level parallelism form laptops to supercomputers. **SoftwareX**. v. 1-2, p 19-25, 2015.
- APLIN, M.; BONDE, M. M.; HANSEN, J. L. Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. J Molecular Cell Cardiol, v. 46, p. 15-24, 2009.
- ANÉZO, C; DE VRIES, A. H.; HÖELTJE, H., TIELEMAN, D. P; MARRINK, S. Methodological issues in lipid bilayer simulations. J. Phys. Chem. B. v. 107, 9424–9433, 2003.
- AULD, D. S., FARMEM, M. W.; KAHL, S. D. Receptor binding assays for HTS and Drug Discovery, 2012. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91992/. Acesso em 9 de agosto de 2019.
- BALAKUMAR, P.; JAGADESEESH, G. Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. J Mol Endocrinol. v. 52, p. 71-92, 2014.
- BALLESTEROS, J. A; WEISTEIN, H. Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure–function relations in G-protein coupled receptors. Methods in Neurosciences, v. 25, p. 366–428, 1995.
- LEACH, A. R. Molecular Modelling: Principles and Applications, 2.ed. Londres: Prentice Hall, 2001. 744p.
- BELMONTE, S. L.; BLAXALL, B. C. Conducting the G-protein coupled receptor (GPCR) signaling symphony in cardiovascular diseases: New therapeutic approaches. Drug DiscovToday: Dis Models, v. 9, n. 3, p. e85-e90, 2012.
- BIHOREAU, C; MONNOT, C; DAVIES, E. TEUTSCH, B; BERSTEIN, K.E; Mutation of Asp74 of the rat angiotensin II receptor confers changes in antagonist affinities and abolishes Gproteincoupling. PNAS. v. 90, p. 5133–5137, 1993.
- BOERRIGTER, G.; LARK, M. W.; WHALEN, E. J.; SOERGEL, D. G.; VIOLIN, J. D.; BURNETT, J. C. Jr. 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. Circ Heart Fail, 2011.

- BRUNTON, L; CHABNER, B; KNOLLMAN, B. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12^a edição. Nova York. McGraw-Hill, 2011
- CABANA, J.; HOLLERAN, B.; BEAULIEU, M.E.; LEDUC, R.; ESCHER. E. Critical Hydrogen Bond Formation for Activation of the Angiotensin II Type 1 Receptor. J.Bio. Chem. v. 288, n. 04. p. 2593-2604, 2013.
- CABANA, J.; HOLLERAN, B.; LEDUC, R.; ESCHER. E. Identification of Distinct Conformations of the Angiotensin-II Type 1 Receptor Associated with the Gq/11 Protein Pathway and the β-Arrestin Pathway Using Molecular Dynamics Simulations. J.Bio. Chem. v. 290, n. 25. p. 15835-15854, 2015.
- CHENG, Y.; PRUSSOF W. H. Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. **Biochem Pharmacol.** v. 22, p. 3099-3108, 1973.
- CHENG, H. F.; BECKER, B. N.; HARRIS R. C. Angiotensin 11 Upregulates Type-I Angiotensin 11 Receptors in Renal Proximal Tubule. J Clin Invest. v.12, p. 2012-2019, 1995.
- CHENG, H. F.; BECKER, B. N.; HARRIS R. C. Reduced proximal tubule angiotensin II receptor expression in streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Kidney Int**. v.46, p. 1603-1610, 1994.
- CHENG, Y. P. Beware of docking. Trends Pharmacol Sci. v. 36, n. 2, p. 78-95, 2015.
- CHUN, E.; THOMPSON, A. A.; LIU, W.; ROTH, C. B. GRIFFIFTH, M. T. Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. Structure. v. 20, e. 6, p. 967-976, 2012.
- COHEN, N. C. Guidebook on molecular modeling in drug design. San Diego: Academic Press, 1996. 361p.
- COSTA-NETO, L. O., NAKAIE, C. R., SCHREIRER, S. The angiotensin II receptor structureactivity correlations in the light of the rhodopsin structure. **Physiol Rev**. v. 87, p 565-592, 2007.
- DEWIRE S. M.; AHN S.; LEFKOWITZ R. J.; SHENOY S. K. β-arrestin and cell signaling. **Annu Rev Physiol**, v. 69, p. 483-510, 2007.
- DE VIVO, M.; MASETTI, M.; BOTTEGONI, G.; CAVALLI, A. Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. **J Med Chem**. v. 59, p. 4035-4061, 2016.

- DOMAZET, I.; HOLLERAN, B. J.; RICHARD, A.; VANDENBERGHE, C.; LAVIGNE, P. Characterization of Angiotensin II Molecular determinants Involved in AT1 receptor functional selectivity. **Mol Pharmacol.** v. 87, p. 982-985, 2015.
- DROR, R. O.; ARLOW, H. D; MARAGAKIS, P; M.; MILDORF, T.J; PAN, A.C. Activation mechanism of β2-adrenergic receptor. **PNAS**. v. 108, n. 48, 18684-18689, 2011.
- EVANS, D. J.; HOLIAN, B. L. The Nose-Hoover thermostat. J Chem Physics, v. 83, n. 8, p 4069-4074, 1985.
- ESCRIBA, P.V.; WEDEGAERTNER, P. B.; GOÑI, F.M. Lipid-protein interaction in GPCR-Associated signaling. Biochim Biophys Acta. v. 1768 p. 836-852, 2007.
- FILLION, D.; CABANA, J.; GUILLEMETE, G.; LEDUC, R.; LAVIGNE, P.; ESCHER, E. Structure of the human angiotensin II type 1 (AT1) receptor bound to angiotensin II from multiple chemoselective photoprobe contacts reveals a unique peptide binding mode. J Biol Chem., v. 288, n. 12, p. 8187-8197, 2013.
- GODIN, C.M; FERGUSON, S.S.G. Biased agonism of the Angiotensin II type 1 receptor. Mini Rev Med Chem, v. 12, n. 9, p. 812-816, 2012.
- GRANIER, S.; KOBILKA, B. A new era of GPCR structural and chemical biology. Nat Chem Biol, v. 8, p. 670-673, 2012.
- GROBLEWSKI, T; MAIGRET, B; LARGUIER, R; LOMBARD, C; BONNAFOCUS, J.C; Mutation of Asn111 in the third transmembrane domain of the AT1A angiotensin II receptor induces its constitutive activation. J Biol Chem, v. 272, p. 1822–1826, 1997.
- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. ANDRICOPOULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design Technologies. **Curr Med Chem**. v. 15, p37-46, 2008.
- HEINDENREICH, P.A.; ALBERT, N.M.; ALLEN, L.A.; BLUEMKE, D.A.; BUTLER, J. Forecasting the impact of heart failure in the united states a policy statement from the american heart association. **Circ Hear Fail.** v. 6, p. 606-619, 2013.
- HESS, B., BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. 3 LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **J Comp Chem**, v. 18, p 1463-1472, 1997.
- HOLLOWAY, A. C. Side-Chain Substitutions within Angiotensin II Reveal Different Requirements for Signaling, Internalization, and Phosphorylation of Type 1A Angiotensin Receptors. Mol Pharmacol, v. 61, n. 4, p. 768-777, 2002.

- HUANG, J.; MACKERELL, A. D.; CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. J Comput Chem. v. 34, p. 2135-2145, 2013.
- HUANG, N.; SHOICHET, B. K.; IRWIN, J. J. Benchmarking sets for molecular docking.. J Med Chem, v. 49, p. 6789-6801, 2015.
- HULME, E. C.; TREVETHICK, M. A. Ligand binding assay at equilibrium: validation and interpretation. **Br J Pharmacol**. v. 161, p 1219-1237, 2010.
- HUNYADY, L; BOR, M; BAUKAL A.J; BALLA, T; CATT, K.J. A conserved NPLFY sequence contributes to agonist binding and signal transduction but is not an internalization signal for the type 1 angiotensin II receptor. **J Biol Chem**. v. 270, p. 16602–16609, 1995.
- HUNYADY, L; JI, H; JAGADEESH, G; ZHANG, M; GABORIK, Z. Dependence of AT1 angiotensin receptor function on adjacente asparagine residues in the seventh transmembrane helix. **Mol Pharmacol.** v. 54, p. 427–434, 1998.
- INOUE, Y; NAKAMURA. N; INAGAMI, T. A review of mutagenesis studies of angiotensin II type 1 receptor, the three-dimensional receptor model in search of the agonist and antagonist binding site and the hypothesis of a receptor activation mechanism. **J Hypertens**, v. 15, p. 703–714, 1997.
- IRWIN, J. J.; STERLING, T.; MYSINGER, M. M.; BOLSTAD, E. S.; COLEMAN, R. G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. J Chem Info Comp Sci, v. 52, p 1757-1768, 2012.
- JARVIS, R. A.; PATRICK, E. A. Clustering using a similarity measure based on shared near neighbors. IEEE Trans Comput. v. 22, s. 11, p. 1025-1034, 1973.
- JI, H; LEUNG, M; ZHANG, Y; CATT, K. J. Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT1 angiotensin receptor: Identification of amino acid residue that determine binding of the antihypertensive drug losartan. J Bio Chem. v. 269, p16533-16536, 1994.
- JONES, G.; WILLET, P.; GLEN, R. C. LEACH A. R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J Mol Biol**, v 267, v. 3, p. 727-748, 1997.
- JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W., KLEIN, M. L., Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, **J. Chem. Phys**, v. 79, p 926-935, 1983.

- 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.
- KATRITZKY, A.R.; KUANAR, M.; SLAVOV, S.; DOBCHEV, D. A.; FARA, D. C. Correlation of blood-brain penetration using structural descriptors. Bioorg Med Chem. v.14, n.14, p.4888-4917, 2006.
- KELLICI, T. F.; TSAKOS, A. G.; MAVROMOUSTAKOS, T. Rational Drug Design and Synthesis of Molecules Targeting the Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptors. Molecules. v. 20, p. 3687-3897, 2015.
- KENAKIN, T. New Concepts in Drug Discovery. Nat Rev Drug Discov. v.4, p.919-927, 2005.
- KLAUDA, J. B.; VENABLE, R. M.; FREITES, J. A. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. J Phys Chem B, v. 114, n. 23, p. 7830– 7843, 2010.
- KIRKPATRICH, S.; GELATT, C. D.; VECCHI, P. Optimization by simulated annealing. Science. v. 220, p. 671-678, 1983.
- KITCHEN, D. B; DECORNEZ, H.; FURR, J.R; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery. **Nat Rev Drug Disc.** v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
- KOHLHOFF, K.J; SHUKLA, D; LAWRENZ, M; BOWMAN, G. R; KONERDING, D. E; Cloudbased simulations on Google Exacycle reveal ligand-modulation of GPCR activation pathways. Nat Chem, v. 6, p. 15-21, 2013.
- KORB, O.; OLSON, T. S.; HALL, R. J.; VERDONK, M. L. Potencial and limitations of ensemble docking. J Chem Inf Model. v. 52, p. 1262-1274, 2012.
- KUTZNER, C.; PALL, S.; FECHNER, M.; ESZTRMANN, A.; DE GROOT, B. L. Best bang for your bucket: GPU nodesfor GROMACS biomolecular simulations. J Comput Chem. v. 36, p. 1990-2008, 2015.
- LANGE, O. F.; VAN DER SPOEL, D.; DE GROOT, B. L. Scrutinizing molecular mechanics force fields on the submicrosecond timescale with NMR data. **Byophis J.** v. 99, p647-655, 2010.
- LEACH, A. R. Molecular Modelling: Principles and Applications, 2.ed. Londres: Prentice Hall, 2001. 744p.

- LEFKOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K. Transduction of Receptor Signals by β-Arrestins. Science, v. 308, p.512-517, 2005
- LEMACK, A. S.; BALABAEV. N. K. On the Berendsen thermostat. Mol Simulat, v. 13, n. 3, p. 177-187, 1994.
- LIU, J.; LIN, T. H.; COLE, A. G.; WEN, R. ZHAO, L.; BRESCIA, M. Identification and characterization of small-molecule. Inhibitor of Tie2 kinase. **FEBS Lett**, v. 582, p. 785-791, 2008.
- LIU, C. H.; GONG, Z.; LIANG, Z. L.; LIU, Z. X.; SUN, Y.J. Arrestin-biased AT1R agonism induces acute catecholamine secretion through TRPC3 coupling. Nat Commun. v. 8, p. 1-8, 2017
- LYUBARTSEV, A. P.; RABINOVICH, A. L., Force Field Development for lipid membrane simulation. **Biochim BioPhys Acta**, v. 1858, p.2483-2497, 2016
- MAGALHÃES, Juliana Gallottini de. Busca virtual de agonistas enviesados não peptídicos do receptor de angiotensina II do tipo 1. 2014. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos)
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-27052015-102215/. Acesso em: 2016-05-04.
- MARIE, J; MAIGRET, B; JOSEPH, M.P; LARGUIER, R; NOUET, S. Tyr292 in the seventh transmembrane domain of the AT1A angiotensin II receptor is essential for its coupling to phospholipase C. J Biol Chem, v. 269, p. 20815–20818, 1994.
- MARTINEZ, E. Z.; LOUSADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Caderno saúde coletiva**. v. 11, p. 7–31, 2003.
- MATSOUKAS, M. T.; CORDOMI, A.; RIOS, S.; PARDO, L., TSELIOS, T. Ligand binding determinants for angiotensin II type 1 receptor from computer simulations. J Chem Info. Model, v.53, p 2874-2883, 2013.
- METRA, M.; TEERLINK, J. R. Seminar Heart Failure. Lancet. Disponível em: https://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(17)31071-1.pdf> doi:10.1016/S0140-6736(17)31071-1.
- MYSINGER, M. M.; CHARCHIA, M.; IRWIN, J. J.; SHOICHET. B. K. Directory of useful decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and decoys for better benchmarking. **J Med Chem**, v.55, p 6582-6594, 2012.

- MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des**. v.7, p. 146-157, 2011.
- MOZZAFARIAN, D.; BENJAMIN, B. J; GO, A. S.; ARNETT, D. K. CUSHMAN, M. Heart disease and stroke statistics 2016. V. 133, 2016. doi:10.1161/cir.00000000000350
- NAIK, P.; MURUMKAR, P.; GIRIDHAR, R. YADAV, M. R. Angiotensin II receptor type 1 (AT1) selective nonpeptidic antagonists A perspective. **Bioorg Med Chem**, v. 18, p. 8418–8456, 2010.
- NAMKUNG, Y.; LEGOUILL, C.; KUMAR, S.; CAO, Y.; TEIXEIRA, L. B. R. Functional selectivity profiling of the angiotensin II receptor type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors. **Sci Signal.** v. 11, p. eaat1631, 2018.
- NIKIFOROVICH, G.V., MIHALIK, B., CATT, K.J., MARSHALL, G. R. Molecular mechanisms of constitutive activity: mutations at position 111 of the angiotensin AT receptor. J Pept Res. v. 66, p. 236–248, 2006.
- NODA, K.; SAAD, Y.; KARNIK, S. Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation. **J Biol Chem**. v. 270, p. 28511–28514, 1995.
- NOGUEIRA, P. R.; RASSI S.; CORRÊA, K. S. Epidemiological, clinical and therapeutic profile of heart failure in a tertiary hospital. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 3, p. 392-398, 2010.
- OHNO, K; AMANO, Y; KAKUTA, K; NIIMI, T; TAKAKURA, S. Unique "delta lock" structure of telmisartan is involved in its strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 404, p. 434–437, 2011.
- OLIVEIRA, L; COSTA-NETO, C.M; NAKAIE, C.R; SCHEREIR, S; SHIMUTA, S.I. The angiotensin II AT1 receptor structure–activity correlations in he light of rhodopsin structure. **Physiol Rev.** v. 87, p. 565–592, 2007.
- PANG, P. S.; BUTLER, J.; COLLINS, S. P.; COTTER, G.; DAVIDSON, B. A.; EZEKOWITZ, J.
 A. Biased ligand of the angiotensin II type 1 receptor in patients with acute heart failure: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIB, dose ranging trial (BLAST-AHF). Eur Heart J. v. 38, p. 2364-2373, 2017.
- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Strain fluctuations and elastic Constants. **J Chem Phys**, v. 76, p. 2662-2666, 1982.

- PELMAN, S. ; COSTA-NETO, C. M. ; MIYAKAWA, A. A.; SCHAMBY, H. T. ; HJORTH, S. A. Dual agonistic and antagonistic property of nonpeptide angiotensin AT1 ligants: susceptibility to receptor mutations. **Mol Pharmacol**, v. 51, p. 301-311, 1997.
- PORTH, C. M.; MATFIN G. Fisiopatologia. 8ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2011. v.1.
- PRONK, S.; PALL, S.; SCHULZ, L.; LARSSON, P.; BJELKMAR, P. GROMACS 4.5: a highthroughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. Bioinformatics, v. 20, n. 7, p. 845-854, 2013.
- PYMOL versão 1.7.6. Nova York, NY; Schrodinger LCC, 2015.
- RAJAGOPAL, S.; AHN, S.; ROMINGER, D. H.; GOWEN-MACDONALD, W.; LAN, C. M. Quantifying Ligand Bias at Seven-Transmembrane Receptors. Mol Pharmacol, v. 80, p. 367– 377, 2011.
- RYBA, D. M.; LI, J.; COWAN, C. L.; RUSSEL, B.; WOLSKA, B. M.; SOLARO, R. Long-Term Biased β-Arrestin Signaling Improves Cardiac Structure and Function in Dilated Cardiomyopathy. Circulation. v. 135, p. 1056-1070, 2017.
- ROVATI, G. E.; CAPRA, V.; NEUBIG, R. R.; The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. **Mol Pharmacol**, v. 71, p. 959-964, 2007.
- SALLANDER, J.; WALLINDER, C.; HALLBERG, A.; ÅQVIST, J. Structural determinants of subtype selectivity and functional activity of angiotensin II receptors. Bioorganic Med Chem Lett. v. 26, p. 1355–1359, 2016.
- SANTOS, E.L; PESQUERO, J.B; OLIVEIRA L, PAIVA. A.C.M. Mutagenesis of the AT1 receptor reveals different binding modes of angiotensin II and [Sar1]-angiotensin II. Regul Pept, v. 119, p. 183–188, 2003.
- SBC-SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. II Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda Arq Bras Cardiol, v. 111, supl. III, 2018. Disponível: http://publicacoes.cardiol.br/portal/abc/portugues/2018/v11103/pdf/11103021.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2018. DOI: 10.5935/abc.20180190
- SILVUS, J. R. Lipid-Protein Interactions. John Wiley & Sons, Inc., Nova York, 1982.
- SINGH, S.; MALIK, B.K.; SHARMA, D.K. Molecular drug targets and structure based drug design: a holistic approach. **Bioinformation**, v.1, n.8 p.314-320, 2006.

- SINGH, K. D., UNAL, H.; DESNOYER, R.; KARNIK. S. S.; Divergent Spatiotemporal Interaction of Angiotensin Receptor Blocking Drugs with Angiotensin Type 1 Receptor. J Chem Inf Model. v. 58, p. 182-193, 2018.
- SINGH, K. D., UNAL, H.; DESNOYER, R.; KARNIK. S. S.; Mechanism of hormone Peptide Activation of GPCR: Angiotensin II activated state initiated by van der Waal attraction. J Chem Inf Model. v. 59, p. 373-385, 2019.
- SOERGEL, D. G.; SUBACH, R. A.; COWAN, C. L.; VIOLIN, J. D.; LARK, M. W. First Clinical Experience with TRV027: Pharmacokinetics and PharmacodynamicSIn Healthy Volunteers. J Clin Pharmacol. v. 53, p. 892-899, 2013.
- SPYROULIAS G.A.; NIKOLAKOPOULOU P.; TZAKOS A.; GEROTHANASSISI. P.; MAGAFA V. Comparison of the solution structure of angiotensin I & II, implication for structure function relationship. Eur J Biochem, v. 270, p. 2163-2173, 2003.
- ST-PIERRE, D. CABANA, J.; HOLLERAN, B. J.; BESSERER-OFFROY, É.; ESCHER, E.; GUILLEMENTTE, G. Angiotensin II cyclic analogs as tools to investigate AT 1 R biased signaling mechanisms. Biochem Pharmacol. v.154, p. 104–17, 2018.
- STERLING T..; IRWIN, J. J.; ZINC15 Ligand discovery for everyone. J Chem Inf Model, v. 55, p. 2324-2337, 2015.
- TREVENA INC. Study to Evaluate TRV120027 in Patients With Heart Failure. ClinalTrials.gov,

 2012,
 NCT01187836.
 Disponível
 em:

 https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01187836?term=heart+failure+trv&rank=1>.
 Acesso

 em: agosto de 2018.
 Acesso
- TREVENA INC. Study to Evaluate TRV120027 on Renal Pharmacodynamics in Patients With Heart Failure and Renal Dysfunction. ClinalTrials.gov, 2012, NCT01444872. Disponível em: < http://clinicaltrials.gov/ct2/show?term=heart+failure+trv&rank=2>. Acesso em: agosto de 2018.
- TRIPOS. SYBYL® Expert Molecular Modeling Environment. Disponível em: <http://scc.acad.bg/ncsa/articles/library/Library2016_Supercomputers-at-Work/InSilico_DrugDesign /SYBYL_Software.pdf>Acesso em: agosto de 2018
- UNAL, H.; JAGANNATHAN, R.; BHAT.; KARNIK, SS.; Ligand-specific conformation of extracellular loop-2 in the angiotensin II type 1 receptor. **J Biol Chem**. v. 285, 16341-16340, 2010.

- VIOLIN, J. D.; DEWIRE, S. M.; YAMASHITA, D.; ROMINGER, D. H.; NGUYEN, L.; SCHILLER, K.; WHALEN, E. J.; GOWEN, M.; LARK. M. W. Selectively Engaging βArrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. J Pharmacol Exp Ther, v. 335, n. 3, p. 572-279, 2010.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications and Perspectives in Chemistry. Angew Chem Int Ed Engl, v. 29, p. 992-1023, 1990.
- VENKATAKRISHNAM, 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 Pharmacol Sci**, v. 28, n. 8, p. 416-422, 2007.
- VIOLIN, J. D.; DEWIRE, S. M.; YAMASHITA, D.; ROMINGER, D. H.; NGUYEN, L. Selective engaging-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases Cardiac performance. J Pharmacol Exp. v. 335, p. 572-579, 2010.
- VIOLIN, J. D.; CROMBIE, A. L., SOERGEL, D. G., LARK, M. W. Biased ligands at G-proteincoupled receptors: Promise and progress. Trends Pharmacol Sci. v. 35, p. 308-316, 2014.
- WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., v.5 n. 6, p. 1-32, 2014.
- WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In: The Pratice 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, 10782-10787, 2003.
- WINGLER, L. M.; ELGETI, M.; HILGER, D.; KOBILKA, B. K.; HUBBEL, W. L.; LEFKOWITZ,
 R. J. Angiotensin analogs with divergent bias stabilize distinct receptor conformations. CELL.
 v. 176, p. 1-11, 2019.
- WINGLER, L. M.; ELGETI, M.; HILGER, D.; KOBILKA, B. K.; HUBBEL, W. L.; LEFKOWITZ, R. J. Distinctive Activation Mechanism for Angiotensin Receptor Revealed by a Synthetic Nanobody. CELL. v. 176, p. 479-490, 2019.

- WISLER, J. W.; XIAO, K.; THOMSEN A. R. B.; LEFKOWITZ, R. J. Recent Developments in biased agonism. **Curr Opin**. Cell Biol. v. 27, p. 18-24, 2014.
- 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.
- WUTHRICH, K. The Ramachandram plot and the NMR method for protein structure determination. **Curr Sci.** v. 59, n 17-18, p 825-831, 1990.
- XIE, X.Q; CHOWDHURY, A; Advances in Methods to Characterize Ligand-Induced Ionic Lock and Rotamer Toggle Molecular Switch in G Protein-Coupled Receptors. Methods enzymol. v. 520, p. 1530174, 2013.
- YAMANO, Y; OHYAMA, K; KIKYO, M; SANO, T; NAKAGOMI, Y. Mutagenesis and the molecular modeling of the rat angiotensin II receptor (AT1). **J Biol Chem**, v. 270, p. 14024–14030, 1995.
- ZHANG, G.H.; GURTIU, V.; KAIN, S. R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. v. 227, n. 3, p. 707-711, 1996.
- ZHANG, H.; UNAL, H.; GATI, C.; HAN, G.W; LIU, W. Structure of the Angiotensin Receptor Revealed by Serial Femtosecond Crystallography. **CELL**. v. 161, p. 833-844, 2015.
- ZHANG, H.; GYE, W.H; BATYUK, A.; ISHCHENKO, A; KATE, L. Structural basis for ligand recognition and functional selectivity at angiotensin receptor. J Biol Chem. v. 290, n. 49, p.29127-29139, 2015.
- ZHANG, H.; UNAL, H.; DESNOYER, R.; HAN, G. W; PATEL, N. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptor. **Nature**. v. 544, n. 7650, p. 327-332, 2017.
- ZHOU, H.; SKOLNICK, J. FINDSITEX: A structure based, small molecule virtual screening approach with application to all identified human GPCRs. **Mol Pharm**, v. 9, n. 6, p. 17751784, 2012.
- ZIMMERMAN, B. BEAUTRAIT, A.; AGUILA, B, CHARLES, R., ESCHER, E, Differential β-Arrestin-Dependent Conformational Signaling and Cellular Responses Revealed by Angiotensin Analogs. **Sci Signal**, v. 5, n. 221, ra33, 2012.

11. Material Suplementar





Figure S1. Desvio quadrático médio da posição atômica (Root Mean Square Deviation, RMSD) das 10 dinâmicas paralelas do sistema AT1R-*apo*. Quando desconsideramos as porções N e C-terminal (preto) de todos os outros átomos pesados (vermelho) da proteína, a estabilidade do sistema é alcançada em torno de 40 ns.







Figure S2. Desvio quadrático médio da posição atômica (Root Mean Square Deviation, RMSD) das 10 dinâmicas paralelas do sistema AT1R-*apo*. Quando desconsideramos as porções N e C-terminal (preto) de todos os outros átomos pesados da proteína (vermelho) a estabilidade do sistema é alcançada em torno de 40 ns. O valor de RMSD da Angiotensina II (verde) foi calculado tendo como valor de referência o frame inicial de cada trajetória. Cada uma das poses de ancoramento molecular foi utilizada como estrutura inicial para as duplicatas (a e b).



Continuação Figura S3



Figure S3. Desvio quadrático médio da posição atômica (Root Mean Square Deviation, RMSD) das 10 dinâmicas paralelas do sistema AT1R-*apo*. Quando desconsideramos as porções N e C-terminal (preto) de todos os outros átomos pesados da proteína (vermelho) a estabilidade do sistema é alcançada em torno de 40 ns. O valor de RMSD da TRV027 (verde) foi calculado tendo como valor de referência o frame inicial de cada trajetória. Cada uma das poses de ancoramento molecular foi utilizada como estrutura inicial para as duplicatas (a e b).



Figura S4. Distribuição de distância das cadeias laterais dos resíduos participantes do *ionic lock* hipotético. Resultados das 10 dinâmicas do receptor *apo* concatenadas. Reparar na formação de dois valores de distância com alta probabilidade.



Figura S5. Comparação da posição das hélices nas porções intracelular do receptor. (A) Cristal 4YAY (inativo) sobreposto com sistema AngII-AT1R (pose 1 - frame 100 ns). (B) Cristal 6DO1 (ativo) sobreposto com sistema AngII-AT1R (pose 1 - frame 100ns). As viradas na TM1 e TM2 provocam mudança no posicionamento das porções intracelulares que não são observadas nos cristais. Apesar disso, observamos mudanças na posição das TM5 e TM6 que se assemelham mais ao estado ativo do receptor. Representação na forma de cartoon.



Zinc04101526

Figura S6. Conjunto de compostos triados em trabalhos anteriores do nosso grupo. Os compostos C11, C12 e C13 são resultado da dissertação de mestrado da aluna Juliana de Gallotini Magalhães (Magalhães, 2015).



Figura S7. Porcentagem de ligação da ³H-AngII dos compostos triados a 1x10⁻⁵ M da figura S6.



Figura S8. Desvio quadrático médio da posição atômica (Root Mean Square Deviation, RMSD) da dinâmica TRV027-AT1R pose 2b tendo os átomos da cavidade do cristal 6DO1 como referência.