

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**



**ANÁLISE CONFORMACIONAL DO RECEPTOR METABOTRÓPICO DE
GLUTAMATO 5 (mGluR5) NA BUSCA DE CANDIDATOS PARA O TRATAMENTO
DO TRANSTORNO POR USO DE SUBSTÂNCIA (TUS)**

Wítor Ribeiro Ferraz

Trabalho de Conclusão do curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo.

Orientador:

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo

Novembro de 2021

*"For whatever reason you refuse to feel this space we're in,
To know its insanity, really know it,
Whatever your particular anaesthetic is, that you hold onto so desperately,
The thing I mean that makes you think you know who you are,
Whatever that thing is that you allow to keep you sane,
Your ace in your hole,
The psyche that keeps you from trying to guess what your pimp has in store for you,
Whatever keeps you from screaming out at this very moment in absolute and sheer
horror,
Whatever you f**k your brain with, whatever that is,
Whatever that is,
It's a lie,
It's a lie."*

The Watts Prophets/Alabama 3

Dedico este trabalho, principalmente, ao meu núcleo familiar, Marta (*in memoriam*), Mauro, Renato e Hender, que sempre me deram o suporte necessário para produzir ciência, mesmo com minha incurável depressão.

Também dedico humildemente este trabalho ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini por salvar minha carreira acadêmica me impedindo de largar o curso e me mostrando um novo caminho dentro das Ciências Farmacêuticas. Obrigado por todas as lições e amizade.

Agradeço também a todos os que passaram e trabalharam comigo no Laboratório de Integração de Técnicas Experimentais e Computacionais (LITEC-USP), em especial aqueles com quem mais aprendi (em ordem cronológica), Gláucio Monteiro, Evelin Fornari, Renan Gomes e André Penteado (responsável pela otimização das simulações de Dinâmica Molecular em Unidades de Processamento Gráfico).

Um agradecimento especial deve ser feito a minha companheira, Caroline Fasciana, pela correção da versão final deste texto e por me alegrar em meus piores momentos.

Por último, mas não menos importante, dedico este trabalho aos meus amigos, o que inclui todos citados acima, vivos ou mortos, presentes ou não. A se citar, a galera do Parque Selecta, da ETEC Lauro Gomes, do Bloco Central, das Hordas do Caos, do Beco do Macaco Louco, da Mandala Verde, do *Dojo* dos Pandas, do Mirante da Babilônia, da FCF-USP, do IO-USP, da FFLCH-USP, da Octopus Head e da *Finis Hominis*.

Paz entre nós, guerra aos senhores.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	6
1.	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	Adição, Problema Social e Sanitário.....	7
1.2	O Receptor Metabotrópico de Glutamato 5 (mGluR5) e a TUS...	8
1.3	<i>Insights</i> Estruturais do mGluR5.....	10
1.4	A Simulação de Dinâmica Molecular (DM).....	17
2.	OBJETIVOS.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Modelagem por Homologia.....	20
3.2	<i>Docking</i> Molecular.....	20
3.3	Simulações por DM e Análise Conformacional.....	21
4.	RESULTADOS.....	23
4.1	Modelagem por Homologia.....	23
4.2	<i>Docking</i> Molecular.....	24
4.3	Simulação de DM e Análise Conformacional.....	25
5.	DISCUSSÃO.....	28
6.	CONCLUSÃO.....	33
7.	REFERÊNCIAS.....	35

LISTA DE ABREVIações

2LE - Segundo Loop Extracelular

7TM - Sete Domínios Transmembranares

AM - Moduladores Alostéricos

CAPS AD - Centro de Atenção Psicossocial de Álcool e Drogas

CB1 - Receptor Canabinóide 1

CRD - Domínio Cysteine-Rich Domain

Cryo-EM - Crio-microscopia Eletrônica

DA - Dopamina Extracelular intensificada pelo Uso de Cocaína

DFB - 3,3'-difluorobenzaldazina

DM - Dinâmica Molecular

dSTR - Núcleo Dorsolateral Estriado

GPCR - Receptor Acoplado à Proteína G

GPCRBD - Domínio de Ligação do Receptor Acoplado à Proteína G

GPU - Unidade de Processamento Gráfico

IUPAC - União Internacional da QUímica Pura e Aplicada

m-MPEP - 2-metil-6-(3-metoxifenil) etinilpiridina

mGluRs - Receptores Metabotrópicos de Glutamato

mGluR5 - Receptor Metabotrópico de Glutamato 5

MMFF - Merck Molecular Force Field

MPEP - 2-metil-6 (feniletinil) piridina

MTEP - 3-((2-Metil-1,3-tiazol-4-il) etinil) piridina

NA - Núcleo Accumbens

NAM - Modulador Alostérico Negativo

NPT - Mesmo número de partículas, pressão e temperatura

PAM - Modulador Alostérico Positivo

PDB - Protein Data Bank

PME - Partícula de Mesh Ewald

POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina

QSAR - Relação Quantitativa Entre Estrutura e Atividade

RMSD - Root Mean Square deviation

SA - Substância de Abuso

SUS - Sistema Único de Saúde

TM - Porção Transmembranar

TUS - Transtorno por Uso de Substância

VFT - Domínio Venus Fly Trap

RESUMO

FERRAZ, W.R. **Análise Conformacional do Receptor Metabotrópico de Glutamato 5 (mGluR5) na Busca de Candidatos para o Tratamento do Transtorno por Uso de Substância (TUS).** 2021. n° 1153-21. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, novembro de 2021

Palavras-chave: Análise estrutural, Modelagem Molecular, mGluR5, Moduladores Alostéricos, Transtorno por Uso de Substâncias

INTRODUÇÃO: O estigma e a discriminação contra pessoas com transtorno por uso de substâncias (TUS) permaneceu constante nas últimas décadas. Além disso, tal problemática tem sido crescente em centros urbanos e rurais brasileiros e está ligada, principalmente, ao abuso dos produtos derivados da *Erythroxylum coca*, como a cocaína e o *crack*. Neste contexto, o Receptor Metabotrópico de Glutamato 5 (mGluR5) é um importante alvo molecular para o combate deste transtorno e a compreensão do mecanismo de ativação e inibição alostérica de seu domínio transmembranar (7TM) é essencial para o design racional de fármacos mais seletivos e seguros para o tratamento da TUS. **OBJETIVO:** Avaliar as mudanças de conformação do mGluR5 complexado com um modulador alostérico negativo (NAM) e um positivo (PAM) por meio de simulações de dinâmica molecular (DM), verificando mudanças significativas em resíduos e motivos proteicos com objetivo de gerar *insights* estruturais que auxiliarão no desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento do TUS em humanos. **MATERIAL E MÉTODOS:** partindo de uma estrutura obtida por Cryo-EM (PDB:6N52) dos 7TM, construir um modelo por homologia no servidor I-TASSER, desenhar, otimizar e fazer a *dockagem* das moléculas no modelo obtido e colocar as melhores poses do PAM e NAM em uma simulação por DM para avaliar as mudanças conformacionais obtidas. **RESULTADOS:** Após a obtenção de um modelo satisfatório e a *dockagem*, a DM nos mostrou mudanças distintas na estrutura de 7TM, tanto em simulações com o PAM, quanto com o NAM. **CONCLUSÃO:** As mudanças conformacionais aqui observadas confirmam resultados obtidos em outros trabalhos experimentais e teóricos e aumentam a robustez da hipótese do desenvolvimento de NAM's para o tratamento da TUS.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Adição, Problema Social e Sanitário

Apesar dos avanços significativos no tratamento, o estigma e a discriminação contra pessoas com transtorno por uso de substâncias (TUS) permaneceu constante nas últimas décadas, (MCGINTY et al., 2015). Além disso, tal problemática tem sido crescente em centros urbanos e rurais brasileiros (BONADIMAN et al., 2017; CHALUB; TELLES, 2006) e está relacionada, principalmente, ao abuso dos produtos derivados da planta *Erythroxylum coca*, como a cocaína e o *crack*, (DUALIBI; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2008). Dentro deste contexto, nosso país é apontado como um dos territórios onde mais cresceu o consumo destas drogas, sendo considerado o segundo maior mercado dessas substâncias de abuso (SA), realidade que tem gerado grandes impactos sociais e levado dependentes químicos a situações de vulnerabilidade moral, social e material, (ABREU, 2017).

Segundo um estudo de 2010, no território nacional existia a ocorrência de um pensamento hegemônico sobre o fenômeno do TUS e de suas medidas de intervenção. Tal pensamento se focava num modelo moralista e psicopatologizante, que colocava o adicto em confronto direto com metas de abstinência e controle do seu uso de SA, (SCHNEIDER, 2010). Dentro deste nefasto panorama, o Brasil encontrou uma saída mais secular para o TUS com a implementação dos Centros de Atenção Psicossocial de Álcool e Drogas (CAPS AD) por meio da portaria N° 3.088, de 23 de dezembro de 2011, que instituiu: “uma rede de atenção psicossocial para pessoas com sofrimento ou transtorno mental e com necessidades decorrentes do uso de *crack*, álcool e outras drogas, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS)”, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Apesar desta importante conquista, ainda não foram disseminadas ações específicas no tratamento de TUS de produtos da *E. coca* na maioria dos CAPS AD (XAVIER; MONTEIRO, 2013).

Sabe-se que uma parcela dos indivíduos adictos têm desejo de sair dessa situação, mas existem grandes dificuldades devido à fissura (ou *craving*) que se dá ao tentar descontinuar o uso destas SA, o que usualmente leva o usuário a recaídas e subsequente retorno ao vício, (GULLAPALLI et al., 2019). A fissura seria um fator de risco modesto e dependente do tempo, sendo que a frequência de episódios de desejo está ligada intrinsecamente ao tipo de SA e o seu tempo de uso

(CAVICCHIOLI et al., 2020). Tal problema se estende ainda mais para o uso do *crack*, que tem um alto poder dependógeno, além de ser responsável por até 70% das internações por uso de SA provenientes da *E. coca* na década passada, (PULCHERIO et al., 2010).

Dentro deste contexto, faz-se necessário, além do suporte psicoterapêutico, por parte dos CAPS AD, e redes de retaguarda, uma opção farmacológica que possa ser aplicada junto a um esquema de terapia ocupacional (FARIA, 2021) que leve em conta os papéis mediadores e moderadores dos mecanismos de autorregulação do *craving* e do TUS (CAVICCHIOLI et al., 2020), possibilitando aos dependentes químicos que escolherem este tipo de terapia uma nova ferramenta para recuperarem sua dignidade.

1.2 O Receptor Metabotrópico de Glutamato 5 (mGluR5) e a TUS

A neurotransmissão glutamatérgica está envolvida na maioria dos aspectos excitatórios da função cerebral normal e pode ser perturbada em muitas condições neuropatológicas, incluindo a TUS (CHIAMULERA et al., 2001). Foi comprovado o papel fundamental dos Receptores Metabotrópicos de Glutamato (mGluR's) na mediação de comportamentos adictos, bem como na neuroplasticidade de longo prazo associada ao uso crônico de diversas SA (CLEVA; OLIVE, 2012; WANG et al., 2013), sob diversos mecanismos de autorregulação. Os mGluRs pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G (GPCR) da família C (KOEHL et al., 2019) e foram divididos em 3 grupos com base em sua homologia de sequência, mecanismos putativos de transdução de sinal e propriedades farmacológicas. Para o tratamento da TUS o grupo I, que inclui os mGluRs 1 e 5 (mGluR5), é o de maior foco (NISWENDER; CONN, 2010). Existe um interesse particular no mGluR5, que é um receptor excitatório do tipo Gq que ativa a fosfolipase C (CHU; HABLITZ, 2000) e é predominantemente expresso em pós-sinapses de neurônios (SHIGEMOTO et al., 1997).

Uma extensa pesquisa sobre o papel do mGluR5 no TUS foi realizada (BROWN et al., 2012; CLEVA; OLIVE, 2012; WANG et al., 2013) e alguns trabalhos apontam fortemente que o receptor desempenha um papel direto na patogênese da adição, mostrando um envolvimento íntimo no desenvolvimento da sensibilização comportamental, (NISWENDER; CONN, 2010). Por exemplo, camundongos

knockout para mGluR5 demonstraram falta de auto administração de cocaína, independentemente da dose. Isso sugeriu que o receptor pudesse estar intimamente envolvido na integração das propriedades de recompensa da droga (CHIAMULERA et al., 2001).

Posteriormente, outros trabalhos foram realizados, destacando-se o estudo de mGluR5's dos núcleos dorsolateral estriado (dSTR) e *accumbens* (NA) na regulação da busca por cocaína após abstinência e extinção de uso da droga. Neste trabalho, os animais foram submetidos a 2 semanas de autoadministração de cocaína seguida por 3 semanas de abstinência. Os animais foram então, reintroduzidos à autoadministração num teste de recaída induzido pelo contexto (disponibilidade de cocaína), seguido por 7 a 10 dias de extinção do uso do alcalóide. Uma vez que a extinção do uso foi plenamente alcançada, ambos os testes de busca de drogas foram realizados na presença de um antagonista alostérico negativo do mGluR5, a 3-((2-Metil-1,3-tiazol-4-il) etinil) piridina (MTEP), ou veículo infundidos no NA e dSTR. Foi descoberto que a MTEP infundida no NA atenuou a recaída induzida pelo contexto após a abstinência, já o bloqueio de mGluR5's no dSTR não teve efeito sobre a busca de cocaína induzida por contexto. Tomados em conjunto, estes dados indicariam que os mGluR5 do NA desempenharam um papel essencial na aprendizagem da extinção de uso de cocaína enquanto modulariam negativamente a procura de SA após a extinção do uso e a abstinência (KNACKSTEDT; TRANTHAM-DAVIDSON; SCHWENDT, 2014). Estas evidências, consideradas junto com as demais descobertas, mostram que mGluR5 pode ser crucial para a aprendizagem de autoadministração e recaídas no TUS.

Além da evidência citada acima, diversos trabalhos mostram que os antagonistas alostéricos do mGluR5 inibem a auto administração de SA e o restabelecimento do comportamento de busca (GASS et al., 2009; KECK et al., 2014; KOTLINSKA; BOCHENSKI, 2011). Fora isso, ainda existem evidências de que o mecanismo pré-sináptico glutamatérgico/canabinóide poderia estar por trás dessa ação. Essa afirmação se dá, visto que,, a 2-metil-6 (feniletinil) piridina (MPEP) sozinha, quando administrada sistemicamente ou localmente no NA, elevou o glutamato extracelular, mas não a dopamina extracelular intensificada pelo uso de cocaína (DA). Já era sabido que a indução no consumo e na busca do alcalóide foi

associada a uma redução no glutamato extracelular intensificado pela SA, mas não de DA no NA. Da mesma forma, um antagonista do receptor canabinóide 1 (CB1), rimonabanto, elevou o glutamato no NA, não a DA, e o glutamato extracelular intensificado por MPEP foi bloqueado pelo rimonabanto sugerindo que um mecanismo de sinalização endocanabinóide retrógrado estaria relacionado ao acúmulo de glutamato induzido por MPEP (LI et al., 2018). Juntos, esses resultados indicam que os efeitos terapêuticos anti cocaína dos antagonistas alostéricos do mGluR5 são mediados pela elevação do glutamato extracelular no NA, por meio de um mecanismo de desinibição do receptor endocanabinoide CB1.

1.3 Insights Estruturais do mGluR5

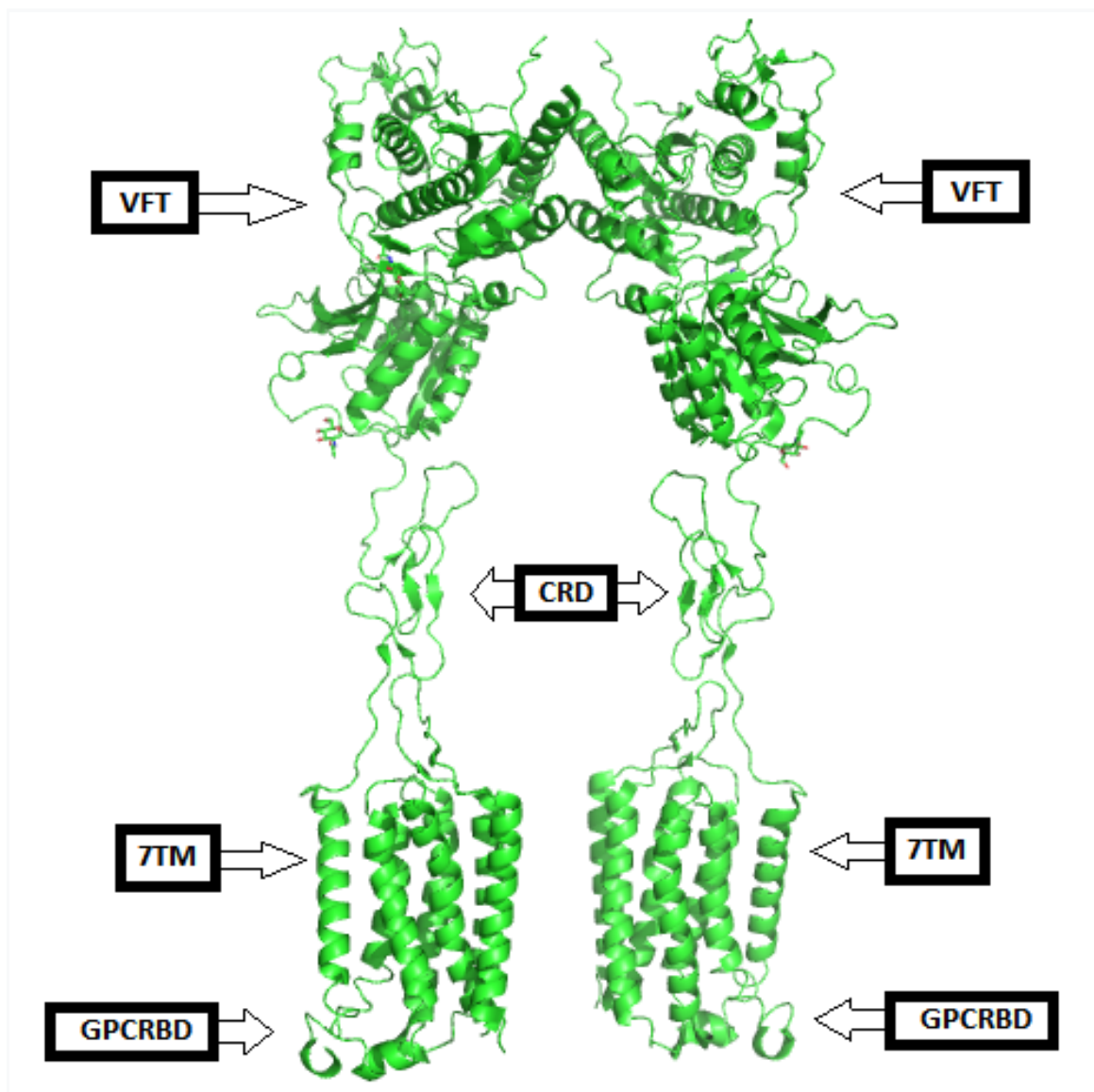


Figura 1: Estrutura do mGluR5 na forma apo (PDB: 6N52) com os domínios protéicos de interesse rotulados. Imagem elaborada pelo autor.

O mGluR5 é formado, obrigatoriamente, por dímeros (com monômeros de 871 aminoácidos) e quatro pontos estruturais de interesse, dois extracelulares, um transmembranar e um intracelular. O primeiro dos extracelulares é o domínio *Venus Fly Trap* (VFT), que contém o sítio ortostérico do receptor, e o segundo é o *Cysteine-Rich Domain* (CRD), um domínio de alta flexibilidade e rico em resíduos de cisteínas que liga VFT aos Sete Domínios Transmembranares (7TM), onde se encontram a maioria dos sítios alostéricos de interesse do alvo. Além disso, uma pequena porção dos 7TM é intracelular (GPCRBD, onde ocorre o acoplamento da proteína G ao mGluR5 quando o mesmo está ativado), (KOEHL et al., 2019).

O processo de sinalização do mGluR5 é dinâmico e envolve mudanças conformacionais em larga escala que são transmitidas de VFT aos 7TM. Fisiologicamente, o processo ocorre com a ligação do agonista endógeno (glutamato) a VFT. Após isso, ocorre o fechamento do lóbulo do domínio, que é essencial para a ativação fisiológica por seu ligante endógeno. É necessário comentar que o fechamento do lóbulo de apenas um monômero já é o suficiente para a ativação parcial do receptor, porém, o fechamento dos dois VFT's é necessário para a ativação total do mesmo. A segunda mudança conformacional importante envolve a reorientação dos CRD's que se aproximam, pois, a ligação de um agonista a VFT permite a compactação da interface do dímero, fazendo com que os CRD's formem uma rede de ligações dissulfeto nessa nova interface. Estas interações entre os CRD's permitem que o mesmos também interajam com o segundo *loop* extracelular (2LE) de cada monômero, permitindo o reposicionamento do "corpo rígido" dos 7TM's, que entram em contato entre si e iniciam a sinalização. Estudos com o mGluR5 em neurônios vivos demonstraram que a ativação fisiológica do receptor provavelmente depende de mudanças conformacionais sequenciais intra e inter subunidades, (KOEHL et al., 2019).

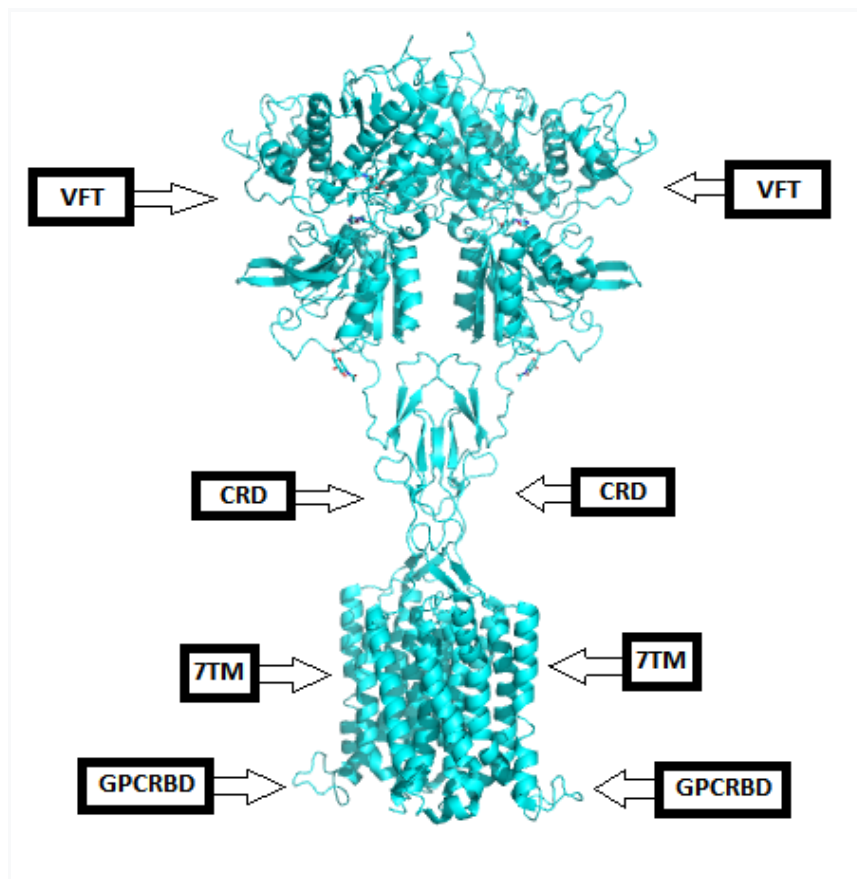


Figura 2: Estrutura do mGluR5 na forma holo, ativado com glutamato (PDB: 6N51), com os domínios protéicos de interesse rotulados. Imagem elaborada pelo autor.

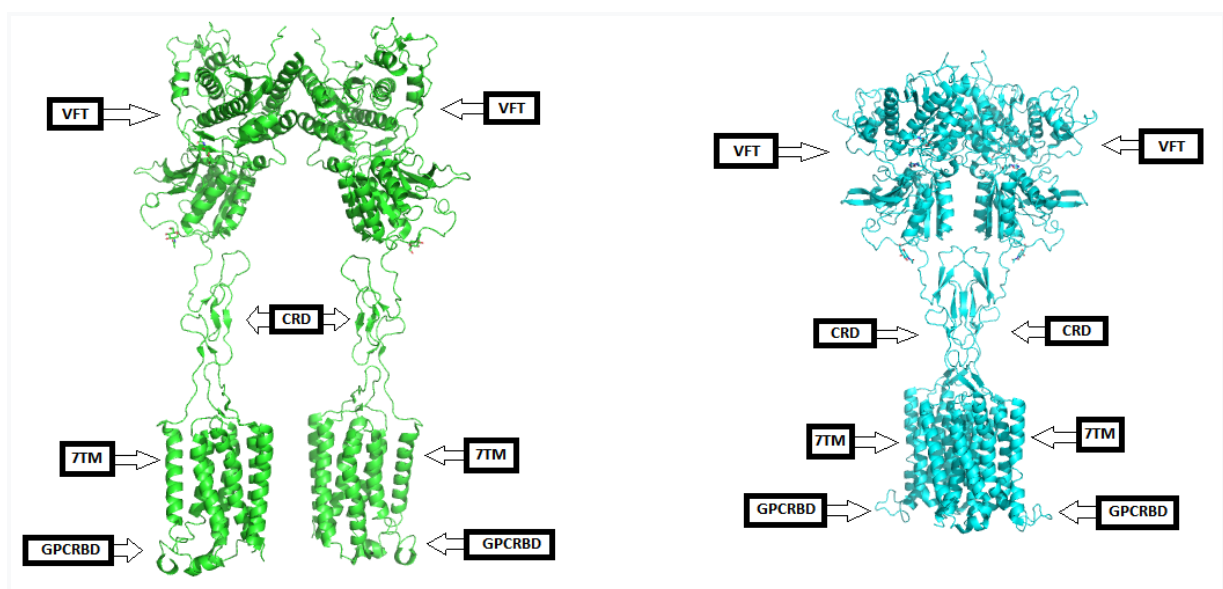


Figura 3: Comparação entre a forma inativa (PDB:6N52) e ativa (PDB 6N51) do mGluR5. imagem elaborada pelo autor.

Um ligante ortostérico induz proteína Gq a acoplar em 7TM, o que em última instância leva à liberação de cálcio intracelular (KOEHL et al., 2019). Além disso, sabe-se que os 7TM são o domínio de ligação de vários ligantes não endógenos que são moduladores alostéricos (AM), sejam eles positivos ou negativos. Tais bolsos de ligação se sobrepõem a diversos sítios ortostéricos de receptores da família A das GPCRs (GOUDET et al., 2004). Por exemplo, os 7TM do mGluR5, isoladamente, funcionam de maneira similar às rodopsinas do tipo GPCR, com certos AM positivos (PAM) agindo como agonistas ortostéricos, (GOUDET et al., 2004; KOEHL et al., 2019). O que é mais importante desta situação é que PAM's que agem nos 7TM que não apresentam respostas no mGluR5 inteiro agem como agonistas totais, o que sugere que as conformações dos domínios extracelulares são fatores críticos para regular a ativação e a sinalização, mas não são ligados intrinsecamente à ativação propriamente dita do receptor (CONG et al., 2019; GOUDET et al., 2004).

Individualmente, em modelos do mGluR5 disponíveis que mostram toda sua estrutura, os 7TM's da forma *apo* e *holo* apresentam alinhamentos quase idênticos, ou seja, ligantes ortostéricos não são capazes de estabilizar a conformação ativa dos 7TM. Tal informação não é inesperada, pois GPCRs da família A não adotam uma conformação ativa sem um estabilizador, como a própria proteína G (KOEHL et al., 2019). Ou seja, ligantes ortostéricos e alostéricos não são capazes de estabilizar sozinhos a conformação ativa dos 7TM em estruturas cristalográficas ou obtidas por Cryo-EM (KOEHL et al., 2019). Pelo fato dos sítios alostéricos serem menos conservados que os ortostéricos na família dos mGluRs, AM's possuem melhor seletividade e ajuste funcional que ligantes ortostéricos (CONG et al., 2019). Por conta destas informações, este trabalho se focou apenas no estudo dos 7TM, pois considerou-se que eles eram a chave para um projeto racional de modulação alostérica do mGluR5 via 7TM, emergindo como um campo promissor para o design e desenvolvimento racional de fármacos para o tratamento da TUS (CONG et al., 2019). Outro fator importante para o estudo dos AM's nos 7TM isolados foi que o estudo de VFT+CRD+7TM requer a observação de dímeros para visualizarmos sua cooperatividade e os monômeros do mGluR5 não são ativados por agonistas ortostéricos (MOUSTAINÉ et al., 2012), ou seja, seria impossível termos observações robustas entre as diferenças conformacionais de sua ativação ou inibição, além do altíssimo custo computacional que estas simulações de dinâmica

molecular (DM) acarretariam. No entanto, mGluR5 monoméricos também podem ser encontrados em amostras do cérebro humano sob certas condições patológicas, (FATEMI; FOLSOM, 2014) e estes monômeros podem ser ativados diretamente por PAM's agindo nos 7TM (MOUSTAINÉ et al., 2012). Sendo assim, a modulação alostérica dos 7TM do mGluR5 não requer VFT ou CRD para ser concretizada, porque, mediante a ligação de PAM's, os 7TM de monômeros ativam o receptor. Além disso, de forma análoga, os AM's negativos (NAM) também exibem atividades constitutivas nos 7TM promovendo seu efeito farmacológico em monômeros sem a participação do domínio extracelular do mGluR5 (GOUDET et al., 2004; MOUSTAINÉ et al., 2012). Portanto, os 7TM do mGluR5 truncados comportam-se como GPCRs de classe A, como as rodopsinas, e podem servir como modelos excelentes para a investigação do mecanismo de modulação alostérica da porção transmembranar do mGluR5 (CONG et al., 2019; GOUDET et al., 2004).

Estruturas obtidas por cristalografia de raios-X estão disponíveis para os 7TM do mGluR5 com NAM's complexados (CHRISTOPHER et al., 2015, 2019; DORÉ et al., 2014) e mostraram que existem dois sítios de ligação de NAM's, o primeiro é um sub-bolso raso que corresponde ao bolso ortostérico em GPCRs classe A e o segundo é um sub-bolso mais profundo que se sobrepõe ao sítio alostérico do cátion Na^+ presente nas GPCR's classe A (CONG et al., 2019; GOUDET et al., 2004). Abaixo dos sítios de NAM existem três resíduos (Tyr 659, Thr 781 e Ser 809) (PIN; GALVEZ; PRÉZEAU, 2003) que coordenam uma molécula de água por meio de ligações de hidrogênio, esta tríade é conservada na família dos mGluRs e pode desempenhar funções semelhantes ao chamado "interruptor de transmissão" nos GPCRs classe A, que conecta o bolso do ligante à metade intracelular do receptor (CONG; TOPIN; GOLEBIOWSKI, 2017).

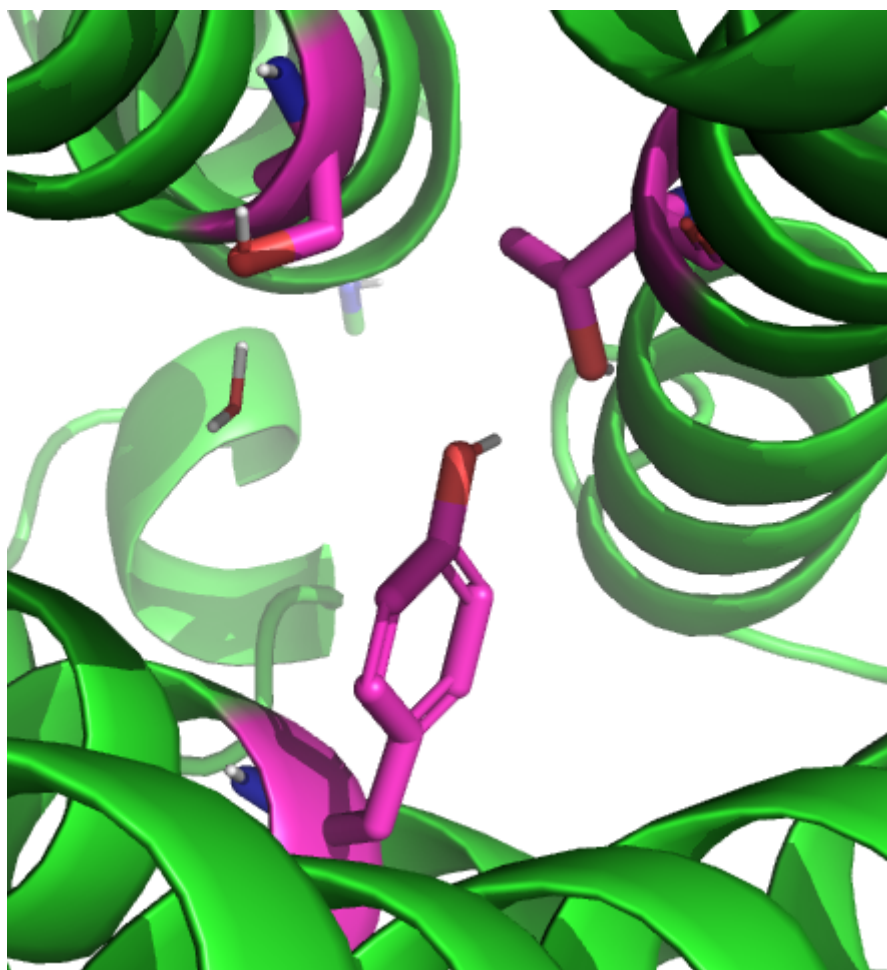


Figura 4: Tríade conservada (Tyr 659, Thr 781 e Ser 809, em ordem anti-horária de baixo para cima), com molécula de água coordenada à esquerda, no modelo gerado pelo I-TASSER. Imagem elaborada pelo autor.

Na porção intracelular dos 7TM do mGluR5 são encontrados dois bloqueios iônicos entre resíduos Lys 665, Glu 770 e Lys 821, que são conservados tanto em mGluRs, quanto em receptores do ácido gama amino butírico do tipo b (GABAB) homólogos a GPCRs classe C (BINET et al., 2007). O bloqueio iônico Lys 665 – Glu 770, em particular, foi sugerido como estabilizador dos 7TM em seu estado inativo, como o bloqueio da porção transmembranar (TM)3 - TM6 conservada em muitos GPCRs classe A (BINET et al., 2007; MÜHLEMANN et al., 2006).

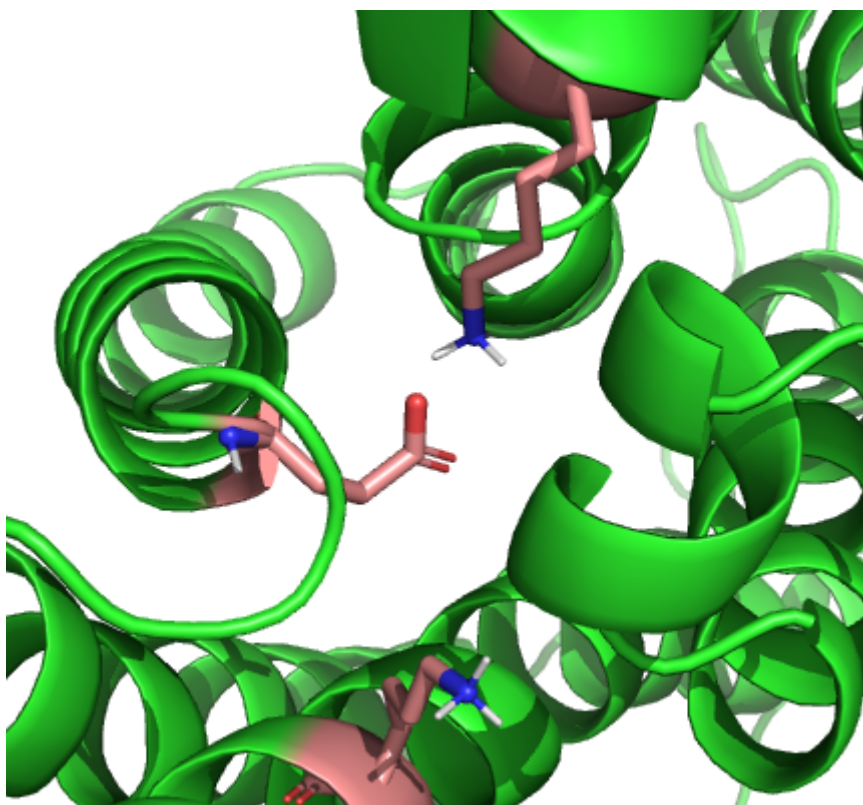


Figura 5: Bloqueio iônico (Lys 665, Glu 770 e Lys 821, em sentido horário a partir de baixo) no modelo gerado pelo I-TASSER. Imagem gerada pelo autor.

O modo como os PAM's se ligam aos 7TM e promovem a ativação de mGluR5 ainda é desconhecido, porém dados de mutagênese dirigida ao local sugerem dois possíveis modos de ligação para PAM's de mGluR4, correspondendo aos dois sub-bolsões sobrepostos ocupados pelos NAM's (ROVIRA et al., 2015). Teorizou-se para o mGluR5 que o bolso mais raso é provavelmente responsável pelo agonismo alostérico, enquanto o mais profundo, possivelmente, está envolvido na cooperatividade com o VFT+CRD (CONG et al., 2019; CONG; TOPIN; GOLEBIEWSKI, 2017).

Como citado anteriormente, evidências robustas garantem que o agonismo alostérico dos 7TM não requer a participação de ligantes ortostéricos ou do domínio extracelular do receptor, podendo inclusive ativá-la na forma monomérica (CONG et al., 2019; KOEHL et al., 2019). Além disso, estruturas do mGLUR5 com NAM's tanto completas (NASRALLAH et al., 2021), quanto apenas com o 7TM (CHRISTOPHER et al., 2015, 2019; DORÉ et al., 2014; NASRALLAH et al., 2021), demonstraram que o grupo de ligantes mantém a conformação do receptor na forma *apo*, ou seja,

inativada. Portanto, o 7TM truncado pode ser usado, até este ponto, como um bom modelo para investigações dos mecanismos alostéricos de PAM's e NAM's, podendo auxiliar no design racional de moléculas para o tratamento da TUS.

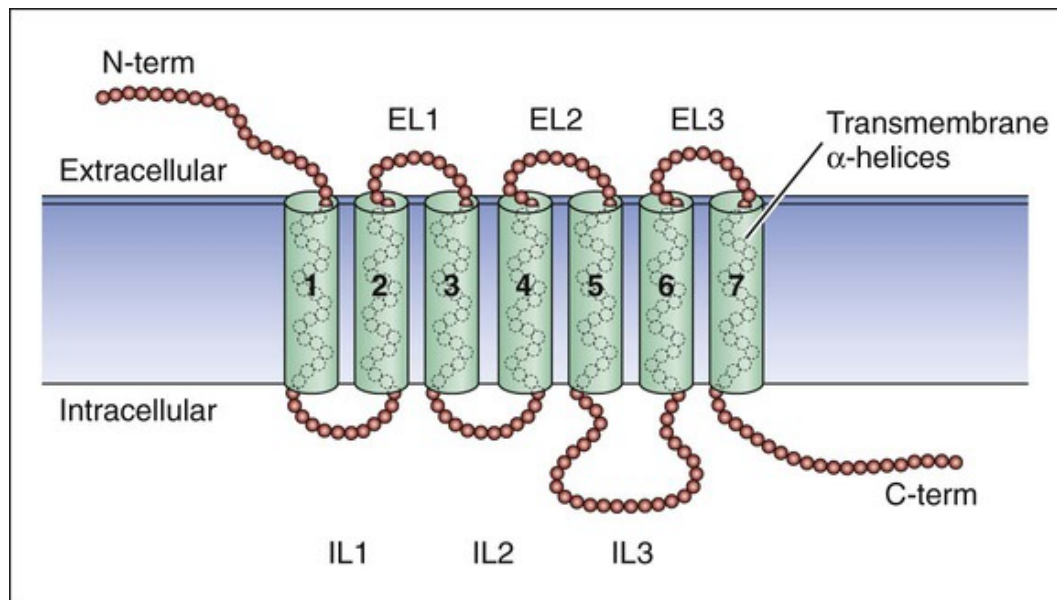


Figura 6: Estrutura geral dos 7TM de GPCRs mostrada em uma visão bidimensional para maior clareza. Fonte: <https://basicmedicalkey.com/pharmacodynamics-2/>

1.4 A Simulação de Dinâmica Molecular (DM)

Segundo a União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC), a “DM é um procedimento de simulação que consiste no cálculo do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis do movimento de Newton. As forças que agem sobre os átomos, necessárias para simular seus movimentos, são geralmente calculadas usando campos de força da mecânica molecular” (CHEMISTRY (IUPAC)). Simplificando, a DM descreve a variação do comportamento de uma molécula como função do tempo, baseando-se na Segunda Lei de Newton. Por ser baseada na mecânica molecular, a DM nos auxilia a obter modelos de moléculas próximos da realidade biológica que incluam diretamente características como a flexibilidade molecular e temperatura. Porém, como não se trata de um método quântico, não podemos inferir propriedades eletrônicas como orbitais moleculares ou prever reações (VERLI, 2014).

$$F_{x_i} = \frac{d^2 x_i}{dt^2} m_i = \frac{\Delta v_i}{\Delta t} m_i = a_i m_i$$

Figura 7: Representação da Segunda Lei de Newton adaptada para a DM. onde F_{x_i} é a força aplicada ao átomo i na posição x , t é o tempo, v a velocidade e a_i a aceleração do átomo i . Fonte: (VERLI, 2014)

O impacto das simulações de DM na descoberta de medicamentos se expandiu drasticamente nas últimas décadas, pois possibilita o estudo do comportamento de proteínas e outras biomoléculas em detalhes atômicos completos e em diversas resoluções temporais. Grandes melhorias na velocidade, precisão e acessibilidade das simulações de DM, juntamente com a proliferação de dados estruturais experimentais de alta resolução como a crio-microscopia eletrônica (Cryo-EM), aumentaram o apelo da simulação biomolecular para os cientistas, uma tendência particularmente perceptível, embora certamente não limitada à neurociência e suas diversas vertentes. Talvez a aplicação da DM mais básica e intuitiva seja avaliar a mobilidade ou flexibilidade de várias regiões de uma biomolécula, por isso, essas simulações têm se mostrado valiosas na decifração de mecanismos funcionais de proteínas e outras biomoléculas, bem como no projeto e otimização de pequenas moléculas (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018).

Os cristais e estruturas disponíveis do mGluR5 apresentam apenas ligantes ortostéricos e alostéricos ligados à VFT e NAM's ligados aos 7TM (CHRISTOPHER et al., 2015, 2019; DORÉ et al., 2014; KOEHL et al., 2019; NASRALLAH et al., 2021), porém como citado por Koehl e colaboradores, não foi possível estabilizar a estrutura dos 7TM com agonistas ortostéricos e nem com PAM's. Por isso, é essencial estudarmos as mudanças conformacionais dentro do domínio transmembranar do mGluR5 sob influência de AM's, principalmente usando simulações de DM em que todos seus átomos sejam expressos, para obtermos *insights* estruturais sobre a conformação ativa dos 7TM. Pois, compreender o mecanismo de ativação e inibição alostérica é essencial para o design racional de AM's do mGluR5 mais seletivos e seguros para o tratamento do TUS.

2. OBJETIVOS

Avaliar as mudanças de conformação do mGluR5 com um modulador alostérico negativo (NAM) e um modulador alostérico positivo (PAM) já bem documentados (CHRISTOPHER et al., 2015, 2019), a 2-metil-6-(3-metoxifenil)etnil piridina (m-MPEP) e a 3,3'-difluorobenzaldazina (DFB), respectivamente, por meio de simulações de **DM**, verificando mudanças significativas em resíduos e motivos proteicos com objetivo de gerar *insights* estruturais que auxiliarão no desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento do **TUS** em humanos.

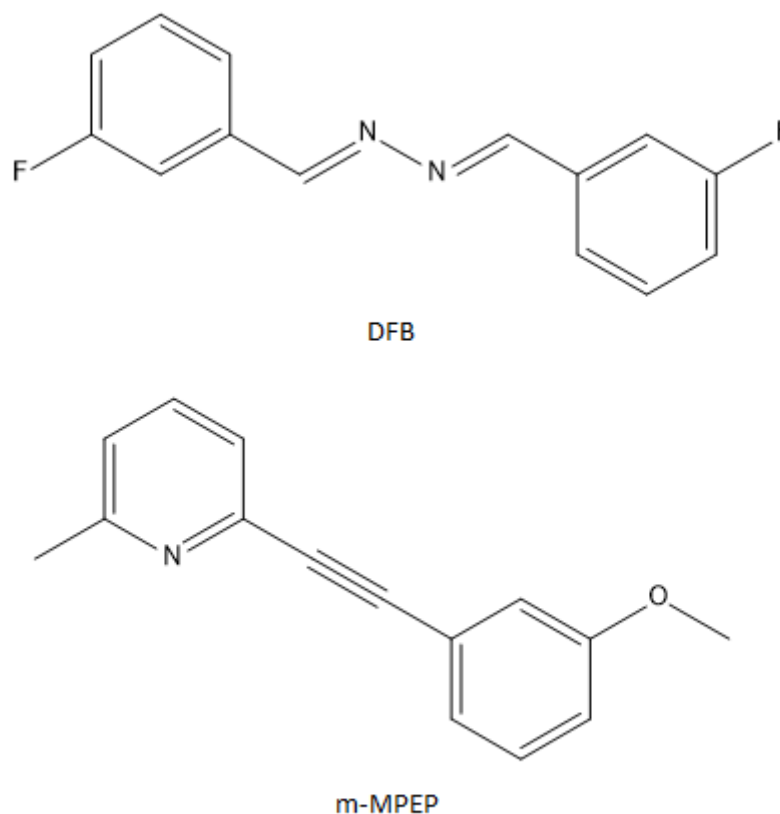


Figura 8: Estruturas 2D do PAM (DFB) e do NAM (m-MPEP) utilizados neste trabalho. Imagem elaborada pelo autor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelagem por Homologia

A *priori*, a estrutura dos **7TM do mGluR5** utilizada foi extraída do *Protein Data Bank* (PDB) (BURLEY et al., 2021) sob o código PDB 6N52 (BURLEY et al., 2021; KOEHL et al., 2019), que é a representação da forma *apo* do mGluR5 completo, ou seja, sem nenhum ligante. Por conta de uma lacuna pertencente à um *loop* intracelular dos 7TM, construiu-se um modelo deste domínio, que foi obtido por modelagem por homologia (VERLI, 2014) utilizando a plataforma I-TASSER (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; YANG et al., 2015; ZHANG, 2008). Como molde para este modelo de 7TM, foram utilizadas a sequência FASTA e a estrutura da porção transmembranar e intracelular do receptor provenientes de 6N52. Posteriormente, a estrutura obtida teve sua qualidade estrutural e energética avaliada via os servidores *Procheck* (COLOVOS; YEATES, 1993), *Molprobit* (CHEN et al., 2010; DAVIS et al., 2007), *ProSA* (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) e *QMEAN* (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011) e pelo gráfico de Ramachandran (ANDERSON et al., 2005). Após estas avaliações o modelo foi otimizado usando o GROMACS 2021.3 (ABRAHAM et al., 2015; CHRISTOPHER et al., 2019; CONG et al., 2019; VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018), conforme o protocolo presente na subseção 3.3, e reavaliado nos mesmos servidores.

3.2 Docking Molecular

Após a otimização do modelo, realizaram-se estudos de *docking* na plataforma DockThor (DE MAGALHÃES et al., 2014; FERRAZ et al., 2020). Tal procedimento foi necessário para posicionar m-MPEP e DFB em locais condizentes com o sítio alostérico estudado (FERRAZ et al., 2020) antes da simulação por DM. A validação do *docking* foi feita pelo método de *cross docking* (LIU; KOKUBO, 2017; SUTHERLAND et al., 2007), onde o ligante (m-MPEP) e as coordenadas de seu ancoramento foram retiradas da estrutura de código PDB 6FFI (CHRISTOPHER et al., 2019). Tanto o m-MPEP extraído de 6FFI, sob o formato de um arquivo .pdb, quanto DFB e m-MPEP usados no docking, desenhados no *ChemDraw* V. 12.1.1 (MILLS, 2006) e salvos na extensão .mol, foram transformados no *software* Spartan 14.1.1.2 (VASCONCELOS et al., 2019; “Wavefunction, Inc.”) em suas versões 3D.

Ainda no Spartan, elas foram minimizadas ao seu confôrmero equilíbrio, otimizadas para sua geometria de equilíbrio e, por fim, tiveram suas cargas eletrostáticas calculadas (FERRAZ et al., 2020) por meio do método de mecânica molecular usando o *Merck Molecular Force Field* (MMFF), (HALGREN, 1996; HALGREN; NACHBAR, 1996). Após a validação do ancoramento molecular via *cross docking*, DFB e m-MPEP foram *docadas*, segundo as metodologias validadas, em seus respectivos sítios alostéricos (CHRISTOPHER et al., 2019; CONG et al., 2019), com as melhores poses, posteriormente, sendo selecionadas por seu *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *score* e análise visual (FERRAZ et al., 2020).

3.3 Simulações por DM e Análise Conformacional.

As melhores poses tanto de DFB, quanto de m-MPEP foram então selecionadas para que passassem por uma simulação de DM (CONG et al., 2019; NASRALLAH et al., 2021) no *software* GROMACS 2021.3 (ABRAHAM et al., 2015; CONG et al., 2019; “GROMACS Reference Manual”, [s.d.]; LINDAHL et al., 2021; MODESTIA et al., 2019; VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018), utilizando o campo de força GROMOS 11 sob os parâmetros 45A3 (SCHULER; DAURA; VAN GUNSTEREN, 2001), que possibilitam a aplicação do campo de força a agregados lipídicos como membranas e micelas, e sistemas mistos com moléculas alifáticas com ou sem água, para que sistemas apolares que possam interagir com diferentes biomoléculas. Dois modelos do 7TM, um com m-MPEP e outro com DFB, passaram por simulações distintas e em triplicata incorporados em uma bicamada de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), uma fosfatidilcolina. O sistema foi solvatado em uma caixa periódica cúbica de $94 \times 96 \times 110$ Å (ANDERSEN, 1980; CONG et al., 2019) com água explícita (modelo SPC/E) (RAMI REDDY; BERKOWITZ, 1989) e neutralizado com íons Cl⁻. Dois ciclos de minimização de energia (5.000 degraus de steepest descent e 5.000 degraus de gradiente conjugado) foram realizados, com restrições posicionais de $200 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ aplicadas à proteína e ao ligante de cada simulação durante o primeiro ciclo. O sistema foi então, gradualmente aquecido a 310 K durante 1 ns, com restrições de $200 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-1}$ para os átomos do alvo e do ligante (VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018). Ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas usando o algoritmo LINCS (HESS, 2008) e as forças de Van der Waals e interações

eletrostáticas de curto alcance tiveram cut-off de 8 Å (CONG et al., 2019). As interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas usando a somatória de Partícula de Mesh Ewald (PME) e duas fases de equilíbrio de 5 ns foram realizadas em um esquema NPT (Pressão = 1 bar, Temperatura = 310 K), condição na qual o número de partículas, a pressão e a temperatura do sistema se mantêm as mesmas, agora sem restrições de 15 kcal · mol⁻¹ · Å⁻¹ na proteína (CONG et al., 2019; VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018). O acoplamento de pressão semi-isotrópica foi aplicado usando o barostato de Andersen-Parrinello-Rahman (ANDERSEN, 1980; M. PARRINELLO, 1980), permitindo que a caixa de simulação no eixo z (perpendicular à bicamada lipídica) variasse independentemente do plano x-y e o acoplamento de temperatura foi realizado usando o termostato Nose-Hoover (NOSÉ; KLEIN, 1983). No total, as simulações foram feitas em triplicatas de 170 ns para cada sistema com suas trajetórias salvas a cada 20 ps.

Após análise da trajetória, avaliamos se as conformações obtidas foram semelhantes ao cristal na forma *apo* realizando um alinhamento das estruturas, simuladas e os 7TM da estrutura 6N52, calculando o RMSD atômico e demais análises que foram consideradas relevantes (CONG et al., 2019; MODESTIA et al., 2019; NASRALLAH et al., 2021; VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018), utilizando o *software* PyMOL 2.5 (MOOERS, 2020; “PyMOL | pymol.org”; YUI; UTO, 2021) para alinhamentos moleculares e geração de imagens. Os scripts para o GROMACS 2021.3 foram desenvolvidos, implementados e paralelizados para otimizar o desempenho das simulações e análises em unidades de processamento gráfico (GPU) GeForce RTX™ 2060 da NVIDIA (ABRAHAM et al., 2015; KOHNKE; KUTZNER; GRUBMÜLLER, 2020)

4. RESULTADOS

4.1 Modelagem por Homologia

A estrutura de código PDB 6N52 (KOEHL et al., 2019) foi selecionada para realizar os estudos, visto que, apresenta uma boa resolução para uma estrutura protéica de mais de 1000 aminoácidos (4.00 Å), um ótimo número de *outliers* segundo o gráfico de Ramachandram (0%) e uma boa porcentagem de *outliers* de cadeias laterais (0,6%). Porém, a estrutura 6N52 apresentava uma lacuna, região não identificada no modelo, entre Ile 670 e Ala 690, totalizando um *gap* de 20 aminoácidos que estruturalmente compõem uma alça intracelular dos 7TM de mGluR5. Como o objetivo final deste trabalho são simulações por DM, foi necessário que um modelo por homologia fosse construído a fim de garantir toda a integridade dos 7TM, mantendo máxima verossimilhança com o domínio transmembranar do mGluR5. Desta maneira, a estrutura dos 7TM e a sequência FASTA de 6N52 foram usadas como moldes para a produção de um modelo por homologia na plataforma I-TASSER. A plataforma retornou os 5 melhores modelos previstos e com a ajuda de um alinhamento estrutural com 6N52 pelo PyMOL e os dados gerados pelo próprio servidor, foi selecionado o modelo nº1, que apresentava C-Score de -0.38, TM-Score de 0.66+-0.13, RMSD atômico de 6.9+-4.1 e densidade de *cluster* 0.1455. Ao analisarmos o modelo dos 7TM obtido nas plataformas *Procheck*, *Molprobit*, *QMEAN*, *ProSA* e pelo gráfico de Ramachandram, foram encontrados, além de 6 resíduos como *outliers* de Ramachandram, 9.8% dos resíduos com erros de planaridade, 5 contatos moleculares ruins, *QMEANDisCo Global* de 0,59 e Z-score de -3.34. Tais dados demonstram que o modelo tem qualidade mediana, porém, os resíduos *outliers*, 2,7% do total, e os erros de planaridade, estavam demasiadamente altos, o que nos obrigou a fazer uma otimização do modelo via DM.

Para a otimização do modelo, usamos o GROMACS 2021.3, segundo o protocolo citado na subseção 3.3. O sistema de simulação final consistiu em aproximadamente 63.000 átomos, incluindo cerca de 12.800 moléculas de água, 154 POPC e 15 ânions cloro. O sistema estabilizou-se entre 90 e 120 ns e a estrutura correspondente a 105 ns foi a escolhida para ser usada como o modelo dos 7TM para os próximos experimentos. Ela apresentou, pelo gráfico de Ramachandram, 0

resíduos como *outliers*, 0% dos resíduos com erros de planaridade, 0 contatos moleculares ruins, *QMEANDisCo Global* de 0,68 e *Z-score* de -1.25. Desta maneira, o modelo estava pronto para ser usado nas próximas etapas.



Figura 9: Modelo dos 7TM gerado pelo I-TASSER e otimizado por DM com o GROMACS 2021.3. Imagem elaborada pelo autor.

4.2 Docking Molecular

As estruturas dos 7TM de 6N52 e 6FFI foram alinhadas ao modelo de 7TM refinado. Após isso, verificou-se que o ligante m-MPEP de 6FFI estava exatamente alinhado com o bolso do modelo e a molécula foi extraída no formato .pdb de seu cristal de origem. Após, os átomos foram identificados no PyMOL e o .pdb do m-MPEP de 6FFI foi aberto num editor de texto para visualizarmos as coordenadas X,Y e Z de seu átomo mais “central”, o carbono 8, e as usarmos como o centro da caixa de *docking* (FERRAZ et al., 2020). As coordenadas escolhidas para o centro da caixa foram $x = 115.604$, $y = 128.203$ e $z = 90.682$; e após serem anotadas, o m-MPEP proveniente de 6FFI foi otimizado no *software* Spartan (VASCONCELOS et

al., 2019; “Wavefunction, Inc.”) pelo método de mecânica molecular com o campo de força MMFF (HALGREN, 1996; HALGREN; NACHBAR, 1996).

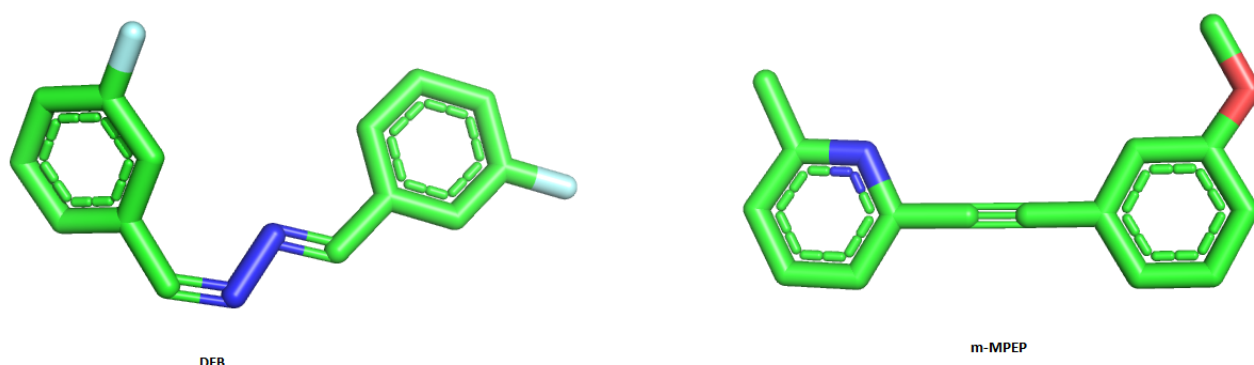


Figura 10: Conformações de equilíbrio de DFB e m-MPEP após cálculo no Spartan. Imagem elaborada pelo autor.

Os estudos/cálculos de *docking* foram efetuados na plataforma DockThor (DE MAGALHÃES et al., 2014; FERRAZ et al., 2020) e a validação por *cross docking* foi performeda para a robustez da análise. Como o m-MPEP possui no máximo 9,7 Å de “largura” e 4,3 Å de “altura”, o tamanho mínimo da caixa de *docking* para a validação foi de 13 Å por aresta para permitir uma maior labilidade do ligante. Como o método pede uma triplicata (FERRAZ et al., 2020), a caixa mediana foi de 15 Å por aresta e a maior de 17 Å por aresta. Todas as três caixas geraram 20 poses. O método de *docking* foi validado para a caixa de 15 Å com 20 poses e os ligantes DFB e m-MPEP em 2D passaram pelo mesmo processo de otimização que o ligante de 6FFI. As melhores poses de DFB e m-MPEP obtidas por docking foram muito semelhantes à do m-MPEP na estrutura 6FFI. Tais modos de ligação foram selecionadas segundo um critério triplo, que envolvia a análise conjunta do *score* da plataforma + RMSD baseado na pose cristalizada do m-MPEP de 6FFI + análise visual e foram encaminhadas para a análise conformacional via DM, complexadas à estrutura do modelo de 7TM.

A melhor pose de DFB teve RMSD de 0,69, um *score* de 91,7 e uma análise visual ótima, enquanto que a de m-MPEP teve RMSD de 0,93, um *score* de 87,4 e uma análise visual ótima.

4.3 Simulação de DM e Análise Conformacional

Para os estudos de DM, o GROMACS 2021.3 foi utilizado segundo o protocolo da subseção 3.3, porém desta vez dois modelos do 7TM, um com m-MPEP e outro com DFB, passaram por simulações distintas e em triplicatas. Os sistemas de simulação final consistiam em aproximadamente 63.000 átomos, incluindo cerca de 12.800 moléculas de água, 154 POPC, 15 ânions cloreto e os átomos dos ligantes (30 átomos do m-MPEP e 28 de DFB). O sistema estabilizou-se entre 100 e 120 ns com a estrutura complexada com m-MPEP e entre 90 e 110 ns para o alvo em conjunto com DFB.

O 7TM ligado a DFB exibiu mudanças conformacionais que se assemelhavam a características típicas de ativação de GPCR's classe A (TEHAN et al., 2014), nomeadamente, o bloqueio iônico TM3-TM6 foi desestabilizado e o TM6 moveu-se para fora do feixe dos 7TM, enquanto o sistema em que o NAM estava presente permaneceu em estado inativo durante o mesmo curso de simulação. Durante as simulações, DFB exibiu dois modos de ligação, cada um associado a um *cluster* distinto do bolso de ligação alostérica já confirmado por estruturas cristalográficas com NAM's (CHRISTOPHER et al., 2015, 2019; DORÉ et al., 2014), o sub-bolso alostérico raso (mais próximo à porção extracelular de mGluR5) e o sub-bolso alostérico profundo (mais próximo à porção intracelular do receptor). Em contrapartida, a simulação de DM com o m-MPEP demonstrou apenas um modo de ligação, restringindo a conformação do bolso alostérico de 7TM a uma próxima da estrutura do início da simulação. Em contraste, a estrutura na forma *apo* exibiu mudanças notáveis do formato de bolso durante o mesmo curso de simulação, com as mudanças se devendo principalmente a movimentos combinados de TM6 e TM7.

O modo de ligação de DFB no sub-bolso alostérico mais profundo do PAM assemelhou-se ao de m-MPEP, onde o anel superior dos ligantes formou uma interação do tipo $\pi - \pi$ *stacking* e interações do tipo *edge-to-face* (MUEHLDOERF et al., 1988) com Trp 785 e Phe 788, respectivamente. No entanto, DFB posicionou-se mais próximo de TM5 do que o m-MPEP, o que alterou notavelmente a conformação do bolso, pois TM6 inclinou-se para fora e TM7 moveu-se para dentro. Além disso, a ligação de hidrogênio mediada pela água presente na tríade conservada foi enfraquecida com o anel inferior de DFB, se inserindo entre Tyr 659 e Ser 809.

Já o modo de ligação de DFB no sub-bolso alostérico mais raso, 3 Å acima do mais profundo, foi o mais “populado” durante a simulação com o PAM. Este posicionamento de DFB demonstrou várias características distintas, como a Phe 788 se inserida entre DFB e TM7, formando uma ligação do tipo $\pi - \pi$ *stacking* (MUEHLDOERF et al., 1988) com o primeiro, enquanto o último se moveu para fora; Trp 785 adotou um estado rotamérico "oscilante", permitindo a entrada de moléculas de água que formaram ligações de hidrogênio com o próprio aminoácido e DFB; e a rede de ligações de hidrogênio da tríade foi alterada conforme Thr 781 se movia para longe de Ser 809 para formar novas ligações de hidrogênio com Tyr 659 por meio de seu *backbone*.

Os *loops* extra e intracelulares (ECL1, ECL2 e ECL3; e ICL1, ICL2, e ICL3 respectivamente) também apresentaram movimentações diferenciadas nos dois sistemas simulados. Por exemplo, na simulação com DFB, os loops eram altamente flexíveis; enquanto que com MPEP, eles exibiram mais interação com os 7TM, provavelmente devido à estabilidade do receptor.

5. DISCUSSÃO

A repetição de algumas informações presentes nos resultados será necessária para a melhor discussão à luz da literatura apropriada para os fenômenos descritos.

Como já dito, os 7TM ligados DFB exibiram mudanças conformacionais semelhantes às da ativação de GPCRs classe A (TEHAN et al., 2014), como a desestabilização do bloqueio iônico TM3-TM6 e a movimentação de TM6 para fora do feixe dos 7TM. Isso, claramente, diferenciou o receptor ligado ao PAM do sistema em que o NAM estava presente, o qual permaneceu em estado inativo durante o mesmo curso de simulação. A desestabilização do bloqueio iônico de TM3 - TM6 também foi observada por estudos anteriores sobre a ligação de PAM's ao mGluR4 e mGluR5 (CONG et al., 2019, 2019; DALTON; PIN; GIRALDO, 2017; VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018). Nos GPCRs classe A, a ligação do agonista é conhecida por gerar um estado ativo movimentando TM6 para o lado intracelular, isso levaria ao acoplamento de proteínas G que induziriam e estabilizariam mais drasticamente o TM6 na citada posição, (CONG et al., 2019; SUŠAC et al., 2018; TEHAN et al., 2014). Tais dados colaboram com as informações de que não foi possível obter a estrutura completa do mGluR5 com um agonista ortostérico sem o acoplamento da proteína G (KOEHL et al., 2019), além da eficácia intrínseca de PAM's para ativarem o mGluR5, independentemente da presença de ligantes ortostéricos ou do receptor estar em sua forma dimérica e monomérica (CHRISTOPHER et al., 2019; CONG et al., 2019; CONG; TOPIN; GOLEBIEWSKI, 2017; KOEHL et al., 2019; VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018).

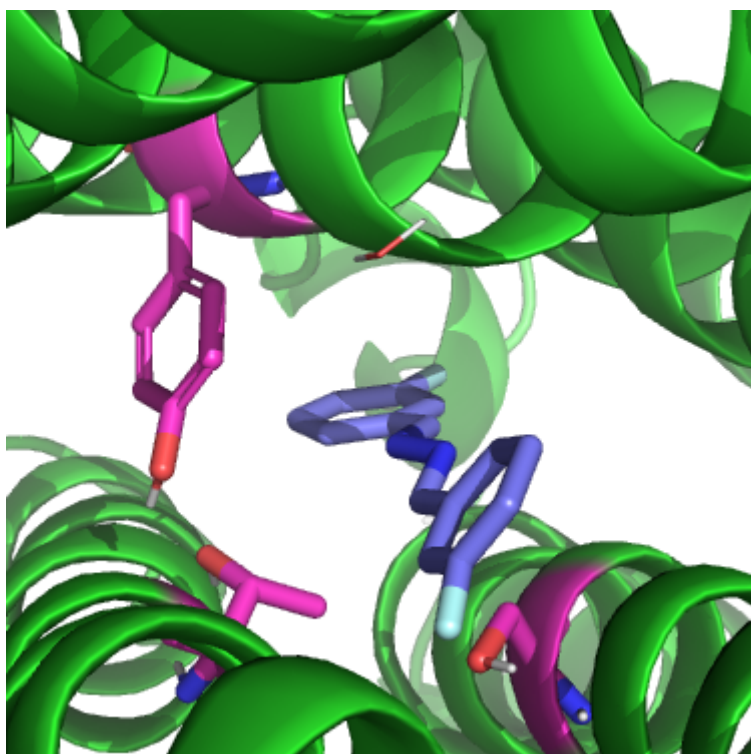


Figura 12: DFB (em roxo) ocupando o sub-bolso profundo após simulação por DM do modelo dos 7TM do mGluR5 com os resíduos da tríade conservada em magenta. Imagem elaborada pelo autor

O modo de ligação de DFB obtido por docking foi muito semelhante ao do m-MPEP na estrutura cristalina, porém, durante o simulações, DFB exibiu dois modos de ligação, cada um associado a um *cluster* distinto dos bolsos de ligação já confirmados por estruturas cristalográficas com NAM's. Em contrapartida, a simulação de DM com o m-MPEP demonstrou apenas um modo de ligação, restringindo a conformação do bolsão próxima a da estrutura do início da simulação. Em contraste, a estrutura na forma *apo* exibiu mudanças notáveis do formato de bolso durante o mesmo curso de simulação. Essas mudanças se devem principalmente a movimentos combinados de TM6 e TM7. Comparando as conformações do bolsão em questão nas estruturas dos 7TM em sua forma *apo*, com DFB e com m-MPEP, sugere-se que a presença dos ligantes envolva uma certa seleção conformacional e ajuste induzido. Isso ocorreu, pois as conformações na presença dos ligantes sobrepõem-se significativamente às conformações preexistentes no receptor sem ligantes, o que já foi sugerido para outros GPCRs, onde a ligação do ligante e a ativação do receptor poderiam exigir um equilíbrio

dinâmico da seleção conformacional e do ajuste induzido (GIRALDO, 2004; HUNYADY; VAUQUELIN; VANDERHEYDEN, 2003).

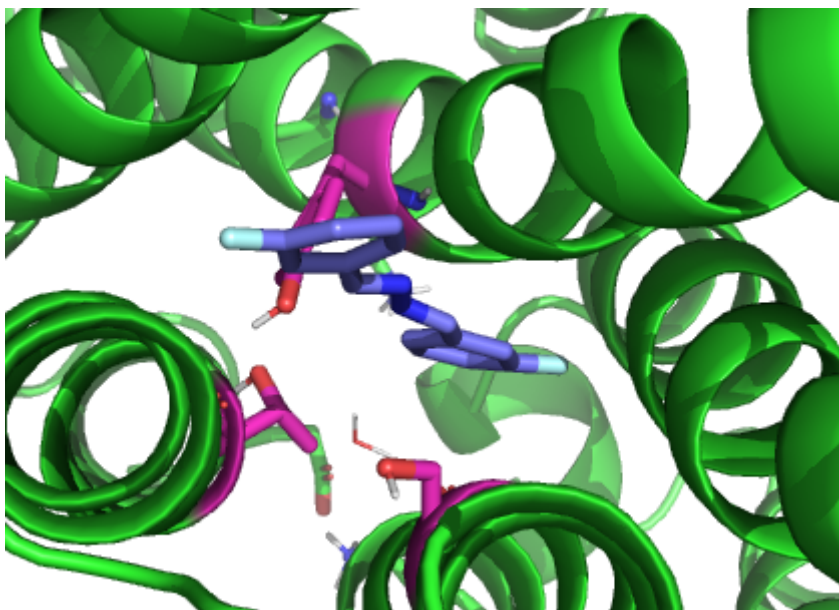


Figura 13: Modelo dos 7TM do mGluR5 durante simulação por DM no momento em que DFB ocupava o sub-bolso raso. Os resíduos da tríade conservados estão marcados em magenta. Imagem elaborada pelo autor

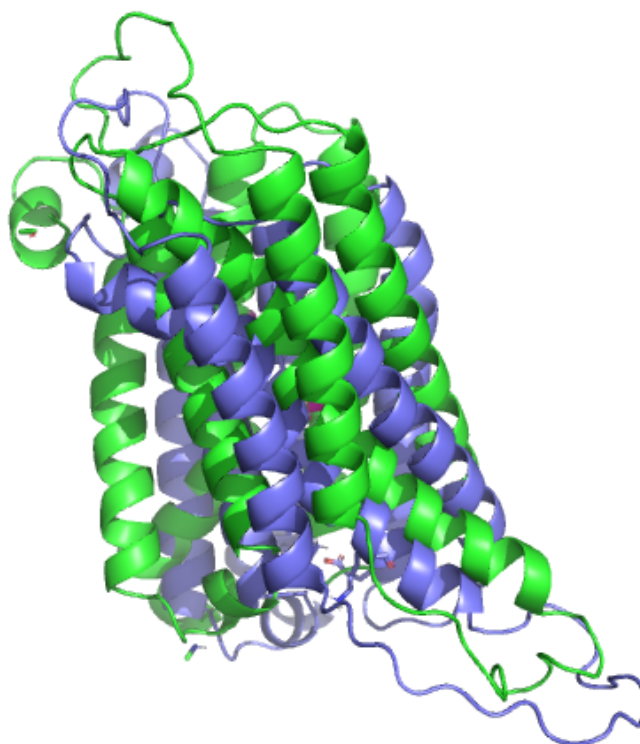


Figura 14: Sobreposição da forma inativa dos 7TM (roxo) com a ativada alostericamente por DFB no sub-bolso profundo. Note a hélice de TM6 mais a direita posicionada para fora do feixe dos 7TM e o não alinhamento das estruturas.

O modo de ligação de DFB no sub-bolso alostérico mais profundo do PAM assemelhou-se ao de m-MPEP, na qual o anel superior dos ligantes formou uma interação do tipo $\pi - \pi$ *stacking* e interações do tipo *edge-to-face* (MUEHLDOERF et al., 1988) com o Trp 785 e a Phe 788, respectivamente. No entanto, DFB posicionou-se mais próximo do TM5 do que o m-MPEP, o que alterou notavelmente a conformação do bolso, pois TM6 inclinou-se para fora e TM7 moveu-se para dentro. Além disso, a ligação de hidrogênio mediada pela água presente na tríade conservada foi enfraquecida com o anel inferior de DFB, se inserindo entre a Tyr 659 e a Ser 809.

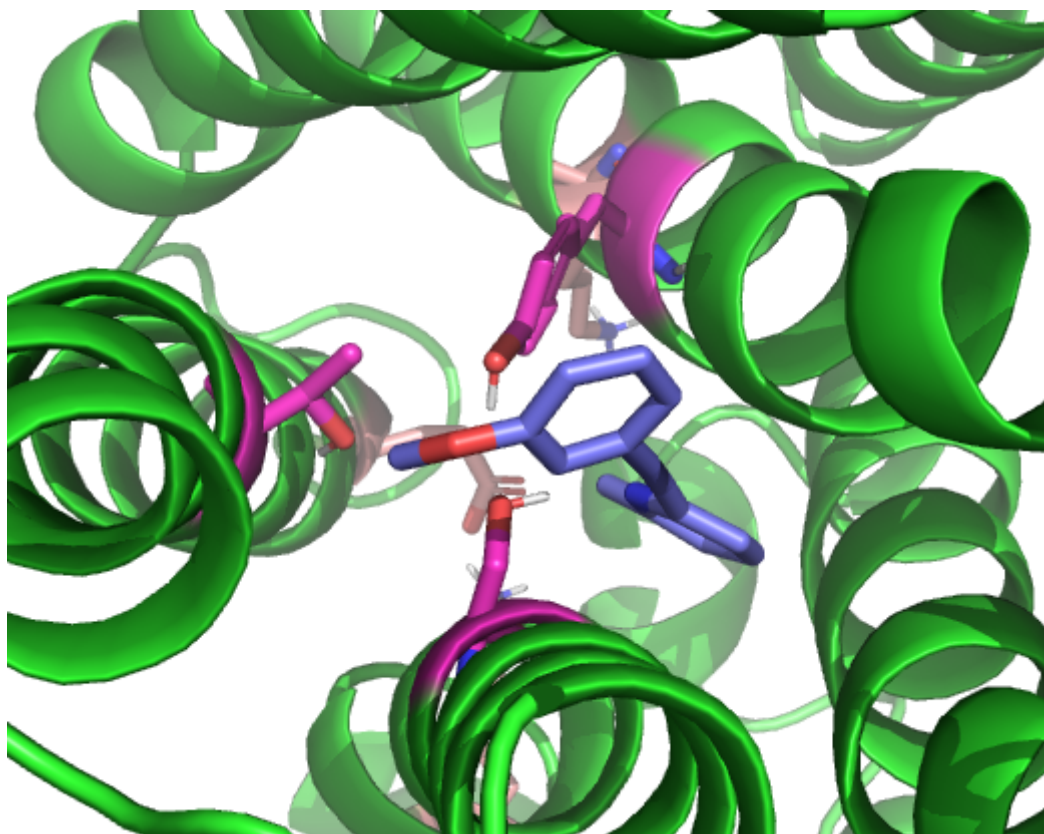


Figura 15: m-MPEP (em roxo) ocupando o sub-bolso alostérico profundo (Resíduos em magenta) após simulação por DM. Imagem elaborada pelo autor.

O modo de ligação de DFB no sub-bolso alostérico mais raso foi observado com mais frequência durante a simulação. Este posicionamento de DFB demonstrou várias características distintas, como a Phe 788 que foi inserida entre DFB e TM7, formando uma ligação do tipo $\pi - \pi$ *stacking* (MUEHLDOERF et al., 1988) com o PAM, enquanto o TM7 se moveu para fora; o Trp 785 adotou um estado rotamérico "oscilante", permitindo a entrada de moléculas de água, sugerem ligações de hidrogênio com o próprio aminoácido e DFB; e a rede de ligações de hidrogênio da tríade foi alterada conforme a Thr 781 se movia para longe da Ser 809 para formar novas ligações de hidrogênio com a Tyr 659 por meio de seu *backbone*. A alternância do modo de ligação DFB foi consistente com a noção de que PAM's de mGluRs podem se ligar em dois modos distintos dentro do 7TM: o mais profundo estaria possivelmente envolvido na cooperação com o VFT+ECD e o mais raso seria o provável responsável pela eficácia intrínseca do PAM (CONG et al., 2019; CONG; TOPIN; GOLEBIEWSKI, 2017; ROVIRA et al., 2015).

Os resultados acima vão ao encontro do que foi observado anteriormente (CHRISTOPHER et al., 2015, 2019; CONG; TOPIN; GOLEBIEWSKI, 2017; VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018) e fortalecem a ideia dos papéis centrais dos resíduos conservados no agonismo/antagonismo alostérico do mGluR5. Além disso, os *loops* extra e intracelulares (ECL1, ECL2 e ECL3; e ICL1, ICL2, e ICL3, respectivamente) também apresentaram movimentações diferenciadas nos dois sistemas simulados. Por exemplo, na simulação com DFB, os *loops* eram altamente flexíveis; enquanto que com MPEP, eles exibiram maior acoplamento com os 7TM, provavelmente devido à estabilidade do receptor. No entanto, não conseguiu-se identificar quaisquer contribuições dos *loops* na ativação dos 7TM com as simulações de DM realizadas.

Por fim, a molécula de água presente na tríade conservada foi novamente demonstrada como importante por mediar interações de NAMs no 7TM do mGluR5, tanto em estruturas cristalográficas (CHRISTOPHER et al., 2015, 2019; DORÉ et al., 2014) como em simulações por DM do 7TM (CONG et al., 2019; VIJAYA PRABHU; SINGH, 2018).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou mudanças conformacionais provocadas por AM's no mGluR5, um alvo promissor para o tratamento do TUS, se trabalhado junto a um esquema de terapia ocupacional. Sendo o mGluR5 um alvo complexo cuja ativação requer uma série de mudanças conformacionais únicas entre os mGluRs, optou-se por estudar apenas seus 7TM, onde encontram-se dois sub-bolsos alostéricos que se mostraram extremamente importantes para o estudo de fármacos no receptor, pois promovem o agonismo e o antagonismo do alvo mesmo em sua forma monomérica.

Este estudo colaborou com os resultados obtidos por trabalhos anteriores, teóricos e práticos, quanto aos modos de ligação dupla de DFB ao mGluR5 e do modo de ligação único de m-MPEP ao alvo. No seu modo de ligação mais superficial, o DFB poderia ativar o mGluR5 através de um mecanismo semelhante aos dos GPCRs de classe A, com tal mecanismo sendo conservado em GPCRs de classe C, visto que envolve vários resíduos de aminoácidos altamente conservados. Já o modo de ligação mais profundo do DFB poderia estar envolvido na cooperatividade com as conformações assumidas por VFT+ECD por conta de ligantes ortostéricos.

Além disso, nossos resultados fortalecem as inferências sobre as diferentes conformações assumidas pelo 7TM do mGluR5 sob influência de PAM's e NAM's já reportadas, podendo orientar com maior robustez o design racional de AM's seletivos para o mGluR5, podendo ser referência para futuros estudos que desejem fazer uso da DM na observação de protótipos de AM's e sua ação em mudanças conformacionais aqui indicadas. Como o foco desse trabalho é o tratamento do TUS, os dados que mais merecem foco são os detalhes e mudanças provocados pelos NAM's na estrutura dos 7TM.

Para pesquisas futuras, sugerimos o uso do *benchmark* presente neste trabalho para aumentar a robustez de pesquisas como as de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR) de PAM's e NAM's que têm como alvo o 7TM do mGluR5 ou de triagens virtuais focadas nos sub-bolsos do receptor estudado neste trabalho. Além disso, reforçamos a necessidade de estruturas dos 7TM ou do

mGluR5 integrais com a porção transmembranar na forma ativa e com a proteína Gq acoplada ao alvo.

7.REFERÊNCIAS

- 1 - ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, v. 1–2, p. 19–25, 1 set. 2015.
- 2 - ABREU, E. M. Cristolândia: narrativas religiosas sobre o combate às drogas. 2017.
- 3 - ANDERSEN, H. C. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *The Journal of Chemical Physics*, v. 72, n. 4, p. 2384–2393, 15 fev. 1980.
- 4 - ANDERSON, R. J. et al. Main-chain conformational tendencies of amino acids. *Proteins*, v. 60, n. 4, p. 679–689, 1 set. 2005.
- 5 - BANK, R. P. D. RCSB PDB - 6FFI: Crystal Structure of mGluR5 in complex with MMPEP at 2.2 Å. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/6FFI>>. Acesso em: 1 nov. 2021.
- 6 - BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 27, n. 3, p. 343–350, 1 fev. 2011.
- 7 - BINET, V. et al. Common Structural Requirements for Heptahelical Domain Function in Class A and Class C G Protein-coupled Receptors *. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 16, p. 12154–12163, 20 abr. 2007.
- 8 - BONADIMAN, C. S. C. et al. The Burden of disease attributable to mental and substance use disorders in Brazil: Global Burden of Disease Study, 1990 and 2015. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 20, p. 191–204, 2017.
- 9 - BROWN, R. M. et al. mGlu5 Receptor Functional Interactions and Addiction. *Frontiers in Pharmacology*, v. 3, p. 84, 7 maio 2012.
- 10 - BURLEY, S. K. et al. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D437–D451, 2021.
- 11 - CAVICCHIOLI, M. et al. Is craving a risk factor for substance use among treatment-seeking individuals with alcohol and other drugs use disorders? A meta-analytic review. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 212, p. 108002, 1 jul. 2020.
- 12 - CHALUB, M.; TELLES, L. E. DE B. Álcool, drogas e crime. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 28, p. s69–s73, 2006.

- 13** - CHEMISTRY (IUPAC), T. I. U. OF P. AND A. IUPAC - molecular dynamics (MT06969). Disponível em: <<https://goldbook.iupac.org/terms/view/MT06969>>. Acesso em: 1 nov. 2021.
- 14** - CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, v. 66, n. Pt 1, p. 12–21, jan. 2010.
- 15** - CHIAMULERA, C. et al. Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nature Neuroscience*, v. 4, n. 9, p. 873–874, set. 2001.
- 16** - CHRISTOPHER, J. A. et al. Fragment and Structure-Based Drug Discovery for a Class C GPCR: Discovery of the mGlu5 Negative Allosteric Modulator HTL14242 (3-Chloro-5-[6-(5-fluoropyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzonitrile). *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 16, p. 6653–6664, 27 ago. 2015.
- 17** - CHRISTOPHER, J. A. et al. Structure-Based Optimization Strategies for G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Allosteric Modulators: A Case Study from Analyses of New Metabotropic Glutamate Receptor 5 (mGlu5) X-ray Structures. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, n. 1, p. 207–222, 10 jan. 2019.
- 18** - CHU, Z.; HABLITZ, J. J. Quisqualate induces an inward current via mGluR activation in neocortical pyramidal neurons. *Brain Research*, v. 879, n. 1, p. 88–92, 6 out. 2000.
- 19** - CLEVA, R. M.; OLIVE, M. F. mGlu receptors and drug addiction. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Membrane Transport and Signaling*, v. 1, n. 3, p. 281–295, 2012.
- 20** - COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, set. 1993.
- 21** - CONG, X. et al. Allosteric Modulation Mechanism of the mGluR5 Transmembrane Domain. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 59, n. 6, p. 2871–2878, 24 jun. 2019.
- 22** - CONG, X.; TOPIN, J.; GOLEBIOWSKI, J. Class A GPCRs: Structure, Function, Modeling and Structure-based Ligand Design. *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, n. 29, p. 4390–4409, 1 ago. 2017.
- 23** - DALTON, J. A.; PIN, J.-P.; GIRALDO, J. Analysis of positive and negative allosteric modulation in metabotropic glutamate receptors 4 and 5 with a dual ligand.

Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

24 - DAVIS, I. W. et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Web Server issue, p. W375-383, jul. 2007.

25 - DE MAGALHÃES, C. S. et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Information Sciences*, v. 289, p. 206–224, 2014.

26 - DORÉ, A. S. et al. Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature*, v. 511, n. 7511, p. 557–562, 31 jul. 2014.

27 - DUAİLÍBI, L. B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. s545–s557, 2008.

28 - FARIA, P. DE F. O. O cotidiano de pessoas em uso problemático de álcool e outras drogas e a terapia ocupacional. 28 jun. 2021.

29 - FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D. Existence of monomer and dimer forms of mGluR5, under reducing conditions in studies of postmortem brain in various psychiatric disorders. *Schizophrenia Research*, v. 158, n. 1–3, p. 270–271, set. 2014.

30 - FERRAZ, W. R. et al. Ligand and structure-based virtual screening applied to the SARS-CoV-2 main protease: an in silico repurposing study. *Future Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 20, p. 1815–1828, 13 ago. 2020.

31 - GASS, J. T. et al. mGluR5 antagonism attenuates methamphetamine reinforcement and prevents reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 34, n. 4, p. 820–833, 2009.

32 - GIRALDO, J. Agonist induction, conformational selection, and mutant receptors. *FEBS letters*, v. 556, n. 1–3, p. 13–18, 2004.

33 - GOUDET, C. et al. Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 1, p. 378–383, 6 jan. 2004.

34 - GROMACS Reference Manual. p. 257, [s.d.].

35 - GULLAPALLI, B. T. et al. On-body Sensing of Cocaine Craving, Euphoria and Drug-Seeking Behavior Using Cardiac and Respiratory Signals. *Proceedings of the ACM on Interactive, Mobile, Wearable and Ubiquitous Technologies*, v. 3, n. 2, p. 46:1-46:31, 2019.

36 - HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*,

v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1996.

37 - HALGREN, T. A.; NACHBAR, R. B. Merck molecular force field. IV. conformational energies and geometries for MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, v. 17, n. 5–6, p. 587–615, 1996.

38 - HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 19 set. 2018.

39 - HUGO VERLI,. *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade MolecularesBioinfo*, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/bioinfo/ebook/>>. Acesso em: 1 nov. 2021

40 - HUNYADY, L.; VAUQUELIN, G.; VANDERHEYDEN, P. Agonist induction and conformational selection during activation of a G-protein-coupled receptor. *Trends in pharmacological sciences*, v. 24, n. 2, p. 81–86, 2003.

41 - JEAN-PHILIPPE PIN, THIERRY GALVEZ, LAURENT PRÉZEAU. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors - ScienceDirect. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016372580300038X?casa_token=q9kc7UwQoc4AAAAA:bMNy_m9bpNlaXe8-qlAV4YZsPVo_0zH3SIJex5SPbYonz8IGpZuaR2-UuyVglQW4JiP3e0uEBw>. Acesso em: 3 nov. 2021.

42 - KECK, T. M. et al. A novel mGluR5 antagonist, MFZ 10-7, inhibits cocaine-taking and cocaine-seeking behavior in rats. *Addiction Biology*, v. 19, n. 2, p. 195–209, mar. 2014.

43 - KNACKSTEDT, L. A.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. L.; SCHWENDT, M. The role of ventral and dorsal striatum mGluR5 in relapse to cocaine-seeking and extinction learning. *Addiction Biology*, v. 19, n. 1, p. 87–101, jan. 2014.

44 - KOEHL, A. et al. Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature*, v. 566, n. 7742, p. 79–84, 2019.

45 - KOHNKE, B.; KUTZNER, C.; GRUBMÜLLER, H. A GPU-Accelerated Fast Multipole Method for GROMACS: Performance and Accuracy. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 16, n. 11, p. 6938–6949, 10 nov. 2020.

46 - KOTLINSKA, J.; BOCHENSKI, M. Pretreatment with group I metabotropic glutamate receptors antagonists attenuates lethality induced by acute cocaine overdose and expression of sensitization to hyperlocomotor effect of cocaine in mice. *Neurotoxicity Research*, v. 19, n. 1, p. 23–30, jan. 2011.

47 - LI, X. et al. mGluR5 antagonism inhibits cocaine reinforcement and relapse by elevation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens via a CB1 receptor

mechanism. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 3686, 27 fev. 2018.

48 - LINDAHL et al. GROMACS 2021.3 Manual. 18 ago. 2021.

49 - LIU, K.; KOKUBO, H. Exploring the Stability of Ligand Binding Modes to Proteins by Molecular Dynamics Simulations: A Cross-docking Study. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 57, n. 10, p. 2514–2522, 23 out. 2017.

50 - MCGINTY, E. E. et al. Portraying mental illness and drug addiction as treatable health conditions: effects of a randomized experiment on stigma and discrimination. *Social Science & Medicine* (1982), v. 126, p. 73–85, fev. 2015.

51 - MILLS, N. ChemDraw Ultra 10.0 CambridgeSoft, 100 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140. www.cambridgesoft.com. Commercial Price: \$1910 for download, \$2150 for CD-ROM; Academic Price: \$710 for download, \$800 for CD-ROM. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 41, p. 13649–13650, 1 out. 2006.

52 - MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 3.088, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2011. Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt3088_23_12_2011_rep.html>. Acesso em: 28 out. 2021.

53 - MODESTIA, S. M. et al. Biased Agonist TRV027 Determinants in AT1R by Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 59, n. 2, p. 797–808, 2019.

54 - MOOERS, B. H. M. Shortcuts for faster image creation in PyMOL. *Protein Science*, v. 29, n. 1, p. 268–276, 2020.

55 - MOUSTAINE, D. E. et al. Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 40, p. 16342–16347, 2 out. 2012.

56 - MUEHLDOERF, A. V. et al. Aromatic-aromatic interactions in molecular recognition: a family of artificial receptors for thymine that shows both face-to-face and edge-to-face orientations. *Journal of the American Chemical Society*, v. 110, n. 19, p. 6561–6562, 1 set. 1988.

57 - MÜHLEMANN, A. et al. Determination of key amino acids implicated in the actions of allosteric modulation by 3, 3'-difluorobenzaldazine on rat mGlu5 receptors. *European journal of pharmacology*, v. 529, n. 1–3, p. 95–104, 2006.

58 - NASRALLAH, C. et al. Agonists and allosteric modulators promote signaling from different metabotropic glutamate receptor 5 conformations. *Cell Reports*, v. 36,

n. 9, p. 109648, 31 ago. 2021.

59 - NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 50, p. 295–322, 2010.

60 - PULCHERIO, G. et al. Crack - from stone to treatment. *AMRIGS MAGAZINE*, v. 54, p. 337–343, 1 jan. 2010.

62 - PyMOL | pymol.org. Disponível em: <<https://pymol.org/2/>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

63 - RAMI REDDY, M.; BERKOWITZ, M. The dielectric constant of SPC/E water. *Chemical Physics Letters*, v. 155, n. 2, p. 173–176, 24 fev. 1989.

64 - ROVIRA, X. et al. Overlapping binding sites drive allosteric agonism and positive cooperativity in type 4 metabotropic glutamate receptors. *The FASEB Journal*, v. 29, n. 1, p. 116–130, 2015.

65 - ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, v. 5, n. 4, p. 725–738, abr. 2010.

66 - SCHNEIDER, D. R. Horizonte de racionalidade acerca da dependência de drogas nos serviços de saúde: implicações para o tratamento. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 15, p. 687–698, maio 2010.

67 - SCHULER, L. D.; DAURA, X.; VAN GUNSTEREN, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *Journal of Computational Chemistry*, v. 22, n. 11, p. 1205–1218, 2001.

68 - SHIGEMOTO, R. et al. Differential Presynaptic Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes in the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 19, p. 7503–7522, 1 out. 1997.

69 - SUŠAC, L. et al. A2A adenosine receptor functional states characterized by 19F-NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, n. 50, p. 12733–12738, 2018.

70 - SUTHERLAND, J. J. et al. Lessons in Molecular Recognition. 2. Assessing and Improving Cross-Docking Accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 47, n. 6, p. 2293–2302, 1 nov. 2007.

71 - TEHAN, B. G. et al. Unifying family A GPCR theories of activation. *Pharmacology & therapeutics*, v. 143, n. 1, p. 51–60, 2014.

VASCONCELOS, S. N. et al. Indole-3-glyoxyl tyrosine: synthesis and antimalarial

activity against *Plasmodium falciparum*. *Future Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 6, p. 525–538, 1 mar. 2019.

72 - VIJAYA PRABHU, S.; SINGH, S. K. Atom-based 3D-QSAR, induced fit docking, and molecular dynamics simulations study of thieno[2,3-b]pyridines negative allosteric modulators of mGluR5. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, v. 38, n. 3, p. 225–239, 4 maio 2018.

73 - WANG, X. et al. Role of mGluR5 neurotransmission in reinstated cocaine-seeking. *Addiction Biology*, v. 18, n. 1, p. 40–49, 2013.

Wavefunction, Inc. Disponível em: <<https://www.wavefun.com>>. Acesso em: 1 nov. 2021.


74 - WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Web Server issue, p. W407–410, jul. 2007.

75 - XAVIER, R. T.; MONTEIRO, J. K. Tratamento de Pacientes Usuários de crack e outras drogas nos CAPS AD. *Psicologia Revista*, v. 22, n. 1, p. 61–82, 17 set. 2013.

76 - YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, v. 12, n. 1, p. 7–8, jan. 2015.

77 - YUI, T.; UTO, T. Extended ensemble molecular dynamics study of cellulose I–ethylenediamine complex crystal models: atomistic picture of desorption behaviors of ethylenediamine. *Cellulose*, 23 ago. 2021.

78 - ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 40, 23 jan. 2008.



Witor Ribeiro Ferraz - Aluno
05/11/2021



Prof. Dr. Gustavo H. G. Trossini - Orientador
05/11/2021