



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ANA CLARA NEGREIROS PARENTE CAPELA SAMPAIO

**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE *VIRTUAL SCREENING* NO BANCO DE
DADOS ZINC PARA OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS ANTAGONISTAS DE
INTEGRINAS DA FAMÍLIA β 1 VISANDO AO DESENHO DE NOVOS FÁRMACOS
ANTIINFLAMATÓRIOS**

FORTALEZA

2014

ANA CLARA NEGREIROS PARENTE CAPELA SAMPAIO

PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE *VIRTUAL SCREENING* NO BANCO DE
DADOS ZINC PARA OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS ANTAGONISTAS DE
INTEGRINAS DA FAMÍLIA β 1 VISANDO AO DESENHO DE NOVOS FÁRMACOS
ANTIINFLAMATÓRIOS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biofísica Molecular.

Orientador: Dr. João Hermínio Martins da Silva

FORTALEZA

2014

ANA CLARA NEGREIROS PARENTE CAPELA SAMPAIO

PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE *VIRTUAL SCREENING* NO BANCO DE
DADOS ZINC PARA OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS ANTAGONISTAS DE
INTEGRINAS DA FAMÍLIA β 1 VISANDO AO DESENHO DE NOVOS FÁRMACOS
ANTIINFLAMATÓRIOS

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biofísica Molecular.

Aprovada em 21/ 11/ 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr. João Hermínio Martins da Silva (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Marcos Roberto Lourenzoni
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

A Deus.

Aos meus pais, Acácia e José. Aos meus irmãos, Fábio e Leonardo. Ao meu noivo, Adailton.

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz, pelo apoio financeiro e manutenção da bolsa de auxílio.

Ao meu orientador, João Hermínio Martins da Silva, pela excelente orientação, pela paciência e amizade.

Aos membros da banca avaliadora, pelo tempo dedicado, pelas valiosas sugestões e críticas.

Aos professores da Universidade Federal do Ceará, por todos os conhecimentos transmitidos.

À minha família, pelo apoio emocional, amor e carinho.

Aos colegas de trabalho, pelo incentivo e palavras de encorajamento.

Aos colegas de faculdade, pelo apoio, conselhos, críticas e sugestões, em especial aos meus grandes amigos Alison Rebouças, Disraeli Vasconcelos, Thaís Brito e Karine Thiers.

À Aline Madeira, minha amiga e irmã de coração, pela força transmitida mesmo à distância e pelas palavras de carinho.

RESUMO

Integrinas são proteínas transmembranares da superfície celular que possuem propriedades de adesão, migração e proliferação de células imunológicas pelo reconhecimento, principalmente, de sítios de ligação de proteínas da matriz extracelular. As integrinas são moléculas heterodiméricas compostas de subunidades α e β , formando 24 proteínas compostas por 18 cadeias α diferentes e 8 cadeias β diferentes. As integrinas são importantes mediadores de processos inflamatórios, devido as suas propriedades de adesão e migração. Inibidores de integrinas são estudados com o objetivo de desenvolver novos fármacos. Três integrinas ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha V\beta 1$) são estudadas como receptores de diferentes inibidores pelas técnicas de *Docking Molecular* e *Virtual screening*. Tais integrinas foram escolhidas pelas suas interações com fibronectina. As estruturas dos cristais de $\alpha 4$, $\alpha 5$, αV e $\beta 1$ foram obtidas no banco de dados PDB (Id dos cristais: 3V4P, 3VI3, 1JV2 e 3VI3 respectivamente). Os complexos $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha V\beta 1$ foram criados pelo alinhamento dos monômeros a suas respectivas subunidades. As moléculas utilizadas como ligantes foram obtidas no banco de dados Zinc que possui, aproximadamente, 22 milhões de moléculas. Por causa desse número elevado, apenas ligantes que seguem as regras de Lipinski no subgrupo Clean Lead foram utilizados para executar o *Virtual screening*. As integrinas foram submetidas ao *Virtual screening* no software Sybyl-X com as configurações necessárias. O centro da “caixa” foi definido no íon MIDAS Ca^{+2} . O tamanho do grid foi de 35Å, compreendendo toda a região de ligação. A caracterização do sítio de ligação mostrou que a região ao redor do íon MIDAS é altamente eletronegativa, favorecendo a interação de ligantes predominantemente positivos, mas não necessariamente. O resultado da técnica de *Virtual screening* mostrou moléculas de escore alto, o que significa que tais moléculas são bons ligantes para cada receptor. Além disso, algumas dessas moléculas apresentam relação com outras doenças como parasitoses e câncer. Esses resultados podem ser úteis no design de novos e potentes inibidores de integrinas, mimetizando ligantes peptídicos com maior afinidade e estabilidade.

Palavras-chave: Integrinas. *Docking Molecular*. Triagem Virtual.

ABSTRACT

Integrins are transmembrane cell surface proteins, which have the properties of adhesion, migrations and proliferation of immune cells by recognizing, mainly, binding sites in extracellular matrix proteins. The integrins are heterodimeric molecules composed of α and β subunits, which comprise so far 24 subtypes formed out of 18 different α and 8 different β chains. The integrins are important mediators of inflammatory processes, due to their properties of adhesion and migration. Inhibitors have been searched to develop new drugs with pharmacological potential. Three integrins ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 1$) have been studied as receptors of different inhibitors by Molecular *Docking* and *Virtual screening* techniques. These integrins were chosen because of their fibronectin interactions. The crystal structure of $\alpha 4$, $\alpha 5$, αV and $\beta 1$ were obtained on PDB database (Crystal id: 3V4P, 3VI3, 1JV2 and 3VI3 respectively). The complexes $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 1$ were created by aligning the monomers to their respective partner. The molecules used as ligands were taken from Zinc Database, which has approximately 22 million molecules. Because of this great number, only the ligands that follow Lipinski's rules on the Clean Leads subset were used to perform *Virtual screening*. The integrins were submitted to *Virtual screening* using Sybyl-X software with the default configurations. The center of the grid was defined in the MIDAS Ca^{+2} ion. The size of the grid was 35Å, comprising the whole binding site. The binding site characterization showed that the region around the MIDAS ion is highly electronegative, favoring the interaction of predominantly positive ligands, but not necessarily. The output of *Virtual Screening* technique showed molecules with high score, which means that these molecules are good ligands to each receptor. Also, some molecules are related to another diseases, such as cancer. These results may be helpful in the design of new and potent inhibitors of integrins, mimicking other peptide ligands with increased affinity and stability.

Keywords: Integrins. Molecular *Docking*. *Virtual screening*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura geral das integrinas | 12 |
| Figura 2 – Integrina $\alpha 4\beta 1$ e seus íons Ca^{2+} | 13 |
| Figura 3 – Classificação das integrinas..... | 14 |
| Figura 4 – Ativação das integrinas..... | 16 |
| Figura 5 – <i>Docking</i> molecular receptor-ligante..... | 17 |
| Figura 6 – Interações entre anéis aromáticos..... | 19 |
| Figura 7 - Fluxograma do funcionamento de um algoritmo genético..... | 21 |
| Figura 8 – Conjuntos e subconjuntos de banco de dados de moléculas do Zinc DataBase..... | 24 |
| Figura 9 – Esquema geral da metodologia utilizada para o desenvolvimento do trabalho..... | 25 |
| Figura 10 – Estruturas dos monômeros $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv e $\beta 1$ geradas pelo programa Pymol a partir de sequências obtidas do PDB..... | 26 |
| Figura 11 – Estrutura dos dímeros $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 1$ | 27 |
| Figura 12 – Área de ligação do inibidor (Protomol) calculado pelo programa Sybyl–X..... | 30 |
| Figura 13 – Validações das estruturas dos monômeros $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv e $\beta 1$ pelos gráficos do Verify 3D e de Ramachandran..... | 31 |
| Figura 14 – Perfil eletrostático da região de ancoragem do ligante..... | 33 |
| Figura 15 – Estrutura dos ligantes mais favoráveis para cada receptor..... | 37 |
| Figura 16 – Resíduos dos receptores que formam interações hidrofóbicas com os ligantes mais favoráveis de cada integrina..... | 38 |
| Figura 17 - Resíduos das integrinas que formam ligações de hidrogênio com os seus respectivos melhores ligantes..... | 40 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Vinte melhores ligantes obtidos para cada receptor como resultado do <i>virtual screening</i> no programa Sybyl-X..... | 34 |
| Quadro 2 - Resíduos dos receptores que formam ligações de hidrogênio com os melhores ligantes de cada integrina, com especificação da cadeia..... | 40 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1 | Estrutura das integrinas..... | 12 |
| 1.2 | Integrinas e patologia | 14 |
| 1.2.1 | Integrinas e inflamação. | 15 |
| 1.3 | Integrinas e sinalização | 15 |
| 1.4 | O <i>Docking</i> molecular..... | 17 |
| 1.5 | O <i>Virtual screening</i> | 18 |
| 1.6 | Potencial eletrotático..... | 18 |
| 1.7 | Interações entre anéis aromáticos..... | 19 |
| 1.8 | Algoritmos..... | 20 |
| 1.9 | Dinâmica Molecular..... | 22 |
| 1.10 | Regras de Cinco de Lipinski..... | 22 |
| 1.11 | Banco de Dados Zinc..... | 23 |
| 2 | Objetivos | 24 |
| 2.1 | Objetivos .específicos..... | 24 |
| 3 | METODOLOGIA..... | 24 |
| 3.1 | Obtenção das estruturas e junção das subunidades..... | 26 |
| 3.2 | Filtragem do banco de dados Zinc | 27 |
| 3.2.1 | O gráfico de Ramachandran..... | 27 |
| 3.3 | Metodologia de <i>Virtual screening</i> | 28 |
| 3.3.1 | <i>Virtual screening</i> por padrão farmacofórico | 28 |
| 3.3.2 | <i>Virtual screening</i> por similaridade | 28 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Metodologia do Docking molecular..... | 29 |
| 4 RESULTADOS..... | 30 |
| 4.1 Validação das estruturas..... | 30 |
| 4.1.1 Verify 3D..... | 33 |
| 4.2 Cálculos eletrostáticos de Poisson-Boltzmann..... | 33 |
| 4.3 Resultados do <i>Virtual screening</i> | 34 |
| 4.3.1 Os melhores ligantes | 36 |
| 4.4 Interações hidrofóbicas..... | 38 |
| 4.5 Ligações de hidrogênio..... | 40 |
| 5 DISCUSSÕES..... | 42 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 43 |
| REFERÊNCIAS..... | 44 |

1. Introdução

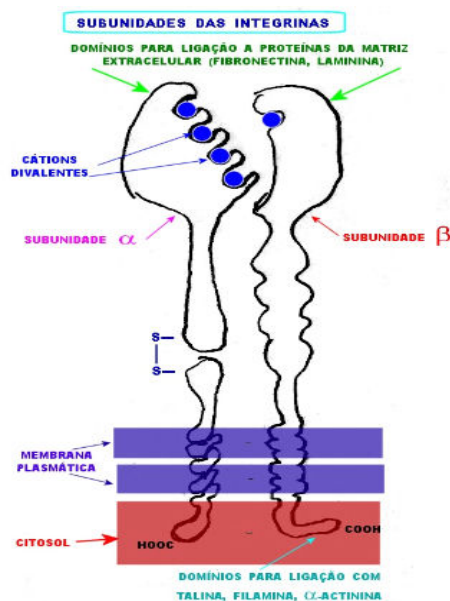
O termo “integrina” é utilizado para caracterizar um complexo proteico transmembranar que associa a matriz extracelular e o citoesqueleto (Tamkun *et al.*, 1986). Duas décadas após a primeira caracterização, diversos trabalhos foram realizados, e o entendimento sobre essa classe de proteínas aumentou consideravelmente. Conhece-se, portanto, a participação das integrinas em funções como o desenvolvimento celular e seus mecanismos de transdução de sinal (Campbell e Humphries, 2011).

1.1. Estrutura das integrinas

Integrinas são proteínas transmembranares, receptoras da superfície da célula. São heterodímeros compostos por 2 subunidades, uma α e uma β . A família das integrinas é formada por 24 subtipos, sendo 18 subunidades α e 8 β diferentes.

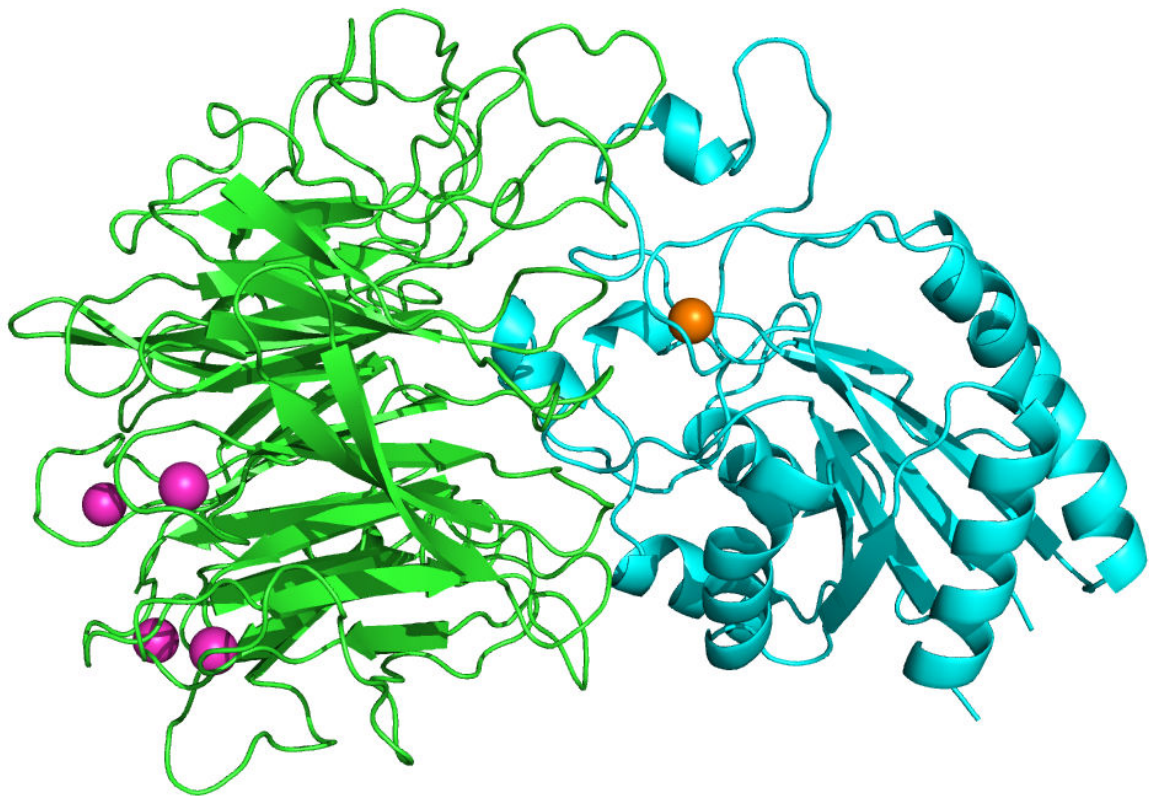
Tais subunidades α e β são unidas não covalentemente por ligações flexíveis, formando três domínios: um domínio extracelular, um transmembranar e um pequeno domínio citoplasmático, como ilustrado na Figura 1 (Kapp *et al.*, 2013).

Figura 1 – Estrutura geral das integrinas. A figura especifica as subunidades α e β das integrinas, os íons (em azul) presentes em cada subunidade, sendo o íon inserido na subunidade β chamado íon da região MIDAS. Ressalta-se, também, o ponto de ancoragem da proteína na membrana plasmática.



A ligação das cadeias α e β depende da presença de cátions como Mg^{2+} e Ca^{2+} . A presença do íon também determina o ponto de ancoragem do ligante, ou seja, o ligante irá se ligar, preferencialmente, ao receptor na região MIDAS, “metal-ion-dependent adhesion site”. (Iain D. Campbell and Martin J. Humphries, 2011).

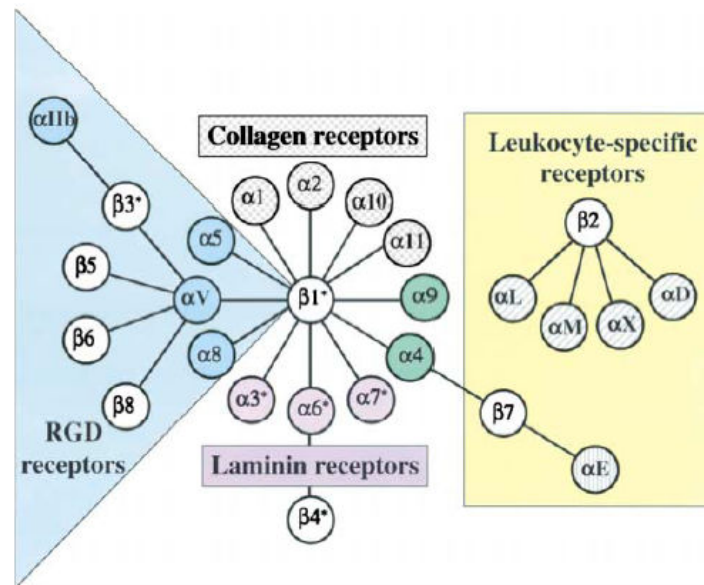
Figura 2 - Integrina $\alpha4\beta1$ e seus íons Ca^{2+} . Em verde, a cadeia α ; em azul, a cadeia β ; em rosa, os íons Ca^{2+} ; em laranja, o íon Ca^{2+} da região MIDAS.



Fonte: Autora. Figura elaborada no software Pymol

Uma das formas de classificar as integrinas é de acordo com seus ligantes, podendo, assim, haver quatro classes: os receptores RGD (arginina-glicina-aspartato); os receptores de colágeno; os receptores específicos de leucócitos e os receptores de laminina.

Figura 3 – Classificação das integrinas de acordo com seus ligantes e possíveis complexos formados pela junção de subunidades.



Fonte: (Kapp *et al.*, 2013).

1.2. Integrinas e patologia

As integrinas são expressas em quase todos os tipos celulares em diferentes padrões de distribuição. Apesar da sua importância fisiológica, tais proteínas estão envolvidas em processos patológicos, como o câncer e doenças autoimunes, alvo da indústria farmacêutica (Kapp *et al.*, 2013).

O processo de adesão de células epiteliais a membrana basal depende das integrinas. Tal processo é necessário para o funcionamento e homeostase dos órgãos, como rins, pulmões e pele. Estudos mostraram que mutações no gene da integrina $\alpha 3$ estão associadas a doenças como distrofia muscular congênita e deficiência de adesão de leucócitos. Pacientes que não possuíam integrinas $\alpha 3$ apresentaram grandes anormalidades na membrana basal de rins, pulmões e pele, como uma membrana basal desorganizada e descoloração dos rins e pulmões (Has *et al.*, 2012).

Integrinas participam, também, de alguns aspectos de doenças cardiovasculares. Tais doenças envolvem interações célula-célula anormais que podem levar à formação de trombos e, conseqüentemente, ao bloqueio da

circulação. A inibição das integrinas relacionadas a doenças cardiovasculares pode, portanto, ser um alvo da indústria farmacêutica para o tratamento de pacientes e a diminuição da taxa de mortalidade dos portadores da doença (Clemetson e Clemetson, 1998).

Existem medicamentos inibidores de integrinas já desenvolvidos e aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*). O Natalizumab é um anticorpo monoclonal recombinante IgG4 humanizado que atua inibindo as integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$, mais precisamente a subunidade $\alpha 4$, presentes em todos os leucócitos, exceto nos neutrófilos. O anticorpo monoclonal em questão foi desenvolvido, inicialmente, para o tratamento da esclerose múltipla, mas já foi estudado, também, no tratamento de doenças inflamatórias do intestino, incluindo a doença de Crohn, que afeta principalmente o íleo e o cólon. Experimentos mostraram que 61% dos pacientes com doença de Crohn tratados com Natalizumab apresentaram melhora significativa e persistente após 36 semanas de tratamento (Danese e Panes, 2014).

1.2.1. Integrinas e inflamação

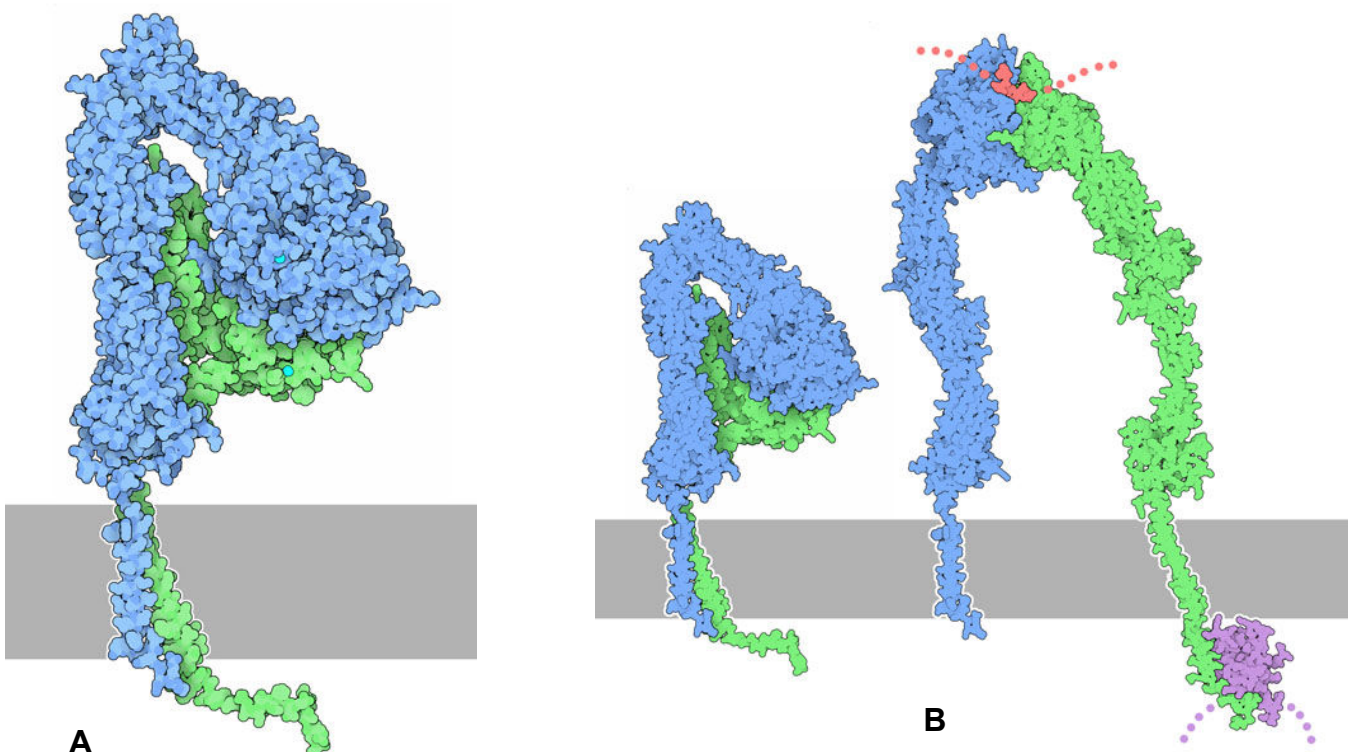
Os linfócitos são um tipo de leucócito presente no sangue. São responsáveis pela imunidade celular, agindo tanto na forma de estimulação da produção de anticorpos pelos linfócitos B, quanto diretamente sobre os antígenos ou células do hospedeiro infectadas, eliminando todo o complexo. Os linfócitos são encontrados migrando em pequenos números nos espaços extravasculares. O aumento desse número indica possíveis infecções ou inflamações. As células de superfície vascular, por sua vez, apresentam ligantes para as moléculas de adesão dos linfócitos circulantes. Ao deparar-se com uma grande densidade de ligantes, os linfócitos que antes rolavam pela superfície vascular, aderem-se firmemente às integrinas, diminuindo sua velocidade de rolamento, mudam de forma e migram ao local da inflamação ou infecção. Os processos inflamatórios e infecciosos são importantes para a defesa do organismo, mas a chegada a uma condição crônica pode levar a destruição do tecido. Tal condição crônica é dada devido a um grande extravasamento dos linfócitos, levando à exacerbação da condição inflamatória (Yang e Hagmann, 2003).

1.3. Integrinas e sinalização

As integrinas são importantes mediadores da adesão célula-célula e da adesão célula-matriz extracelular. As integrinas da família $\beta 1$ são responsáveis pelas interações da célula com a matriz extracelular. Tais proteínas estão envolvidas em respostas biológicas como o desenvolvimento embrionário e a manutenção de tecidos maduros (Moisés E. Bauer, *Avanços em Biologia Celular*).

Em seu estado inativo, a “cabeça” da integrina encontra-se dobrada, apontando para a membrana, como mostra a figura 4A, havendo baixa afinidade por ligantes. A figura 4B mostra a ligação de proteínas ao domínio intracelular na cadeia β , que pode induzir a uma mudança conformacional no domínio extracelular, “ativando” a integrina, ou seja, aumentando sua afinidade por ligantes. Esse processo chamado de “sinalização de dentro para fora” é responsável por controlar migração e adesão celular. No processo contrário de “sinalização de fora para dentro”, a ligação de um ligante causa o agrupamento da integrina, levando a uma cascata de sinalizações intracelulares que regulam a polaridade celular, a estrutura do citoesqueleto e a sobrevivência da célula (Kapp *et al.*, 2013).

Figura 4 – Ativação das integrinas. A: proteína inativa. B: Processo de ativação da integrina. Em azul, cadeia α ; em verde, cadeia β .

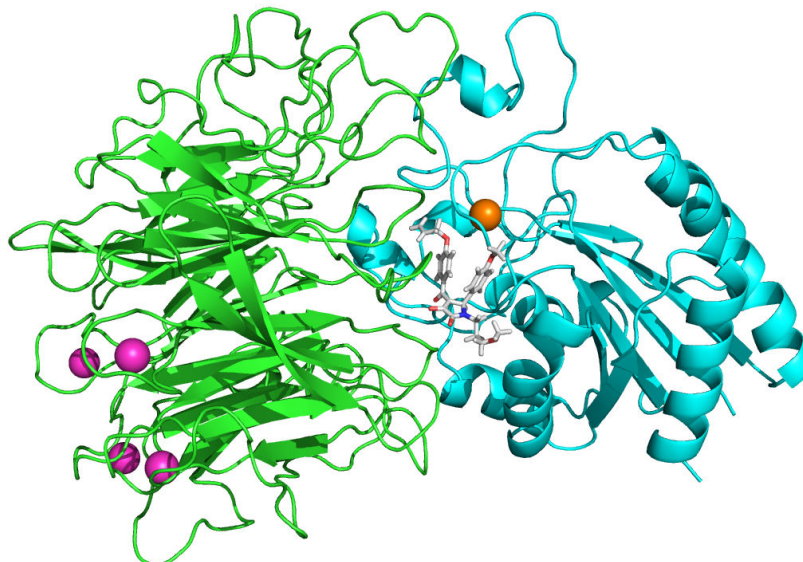


1.4. O *Docking* molecular

O *Docking* molecular é uma técnica que simula o encaixe de um ligante ao receptor, formando um complexo estável. Tal simulação pode ser usada na predição afinidade de ligação e na força da ligação entre as duas moléculas. Geralmente, uma molécula pequena é utilizada como possível ligante que vai se ligar ao sítio de ligação do receptor, atuando como inibidor. O *Docking* molecular é usado para limitar a área de ligação quando não se pode considerar a estrutura inteira da proteína como ponto de ancoragem do ligante. (Trott e Olson, 2010).

A estrutura do alvo molecular é mantida rígida, enquanto várias posições do ligante são identificadas computacionalmente. São, então, geradas várias posições de encaixe do ligante na proteína. A predição do ligante mais adequado pode ser feita a partir de funções “escores”, ferramentas empíricas que analisam a interação receptor-ligante. As funções escores tem como objetivo prever a afinidade de uma disposição do ligante no sítio do receptor, ordenando as melhores moléculas ligantes e eliminando as moléculas não ligantes. (Rodrigues R. P., 2012).

Figura 5 – *Docking* molecular receptor-ligante. Em verde, cadeia α ; em azul, cadeia β , em rosa, íons Ca^{2+} ; em laranja, íon Ca^{2+} da região MIDAS; em branco, ligante. Ligante (id Zinc: 8440606) encaixado na integrina $\alpha 4\beta 1$. *Docking* receptor-ligante realizado pelo software Sybyl-X. Observa-se que o ligante se encaixa na região intercadeias, próximo ao íon da região MIDAS.



Fonte: Autora. Figura elaborada no programa Pymol.

1.5. O *Virtual screening*

O termo "*Virtual screening*" foi criado na década de 1990 para se referir a algoritmos e métodos computacionais utilizados na descoberta de fármacos a partir de buscas em bancos de dados virtuais para identificar quais estruturas de inibidores se adequam ao sítio de ligação do receptor (Schneider, 2010). A descoberta de novos fármacos é um processo demorado e envolve custos altos. Para diminuir o tempo e os gastos, ferramentas computacionais são utilizadas nas fases iniciais de pesquisas de novos fármacos. A partir de ferramentas computacionais como o *Docking* molecular é possível realizar uma triagem *in silico* em bancos de dados de compostos químicos, avaliando afinidade e especificidade a partir de propriedades estruturais e químicas como polaridade, ligações de hidrogênio, geometria, distribuição de cargas, dentre outros. A metodologia conhecida como *Virtual screening* Baseado na Estrutura do Alvo Molecular, portanto, faz buscas em bibliotecas virtuais de moléculas, a fim de identificar compostos ativos que se encaixem, apropriadamente, ao receptor, considerando a estrutura 3D. A finalidade do método é encontrar compostos que interajam com o sítio de ligação da molécula receptora e ordenar tais moléculas de acordo com a sua afinidade ao sítio de ligação do receptor, indicando possíveis moléculas-alvo para a indústria farmacêutica (Rodrigues R. P., 2012).

Há diversos bancos de dados com uma variedade enorme de moléculas. O ZINC *database* é uma biblioteca virtual de compostos químicos disponíveis publicamente. Tal ferramenta é amplamente utilizada no auxílio da descoberta de medicamentos (Kruger *et al.*, 2014).

1.6. Potencial eletrostático

As interações eletrostáticas são indispensáveis em proteínas, visto que possuem relação com a sua função e com a estabilidade da estrutura. As proteínas são compostas por aminoácidos ionizáveis, cujo estado de ionização depende de suas propriedades físico-químicas, além das mesmas propriedades do ambiente que os cerca.

A distribuição das cargas parciais pela estrutura tridimensional de uma proteína determina suas propriedades eletrostáticas e regula o modo como a proteína interagirá com ligantes. Forças intermoleculares como van der Waals,

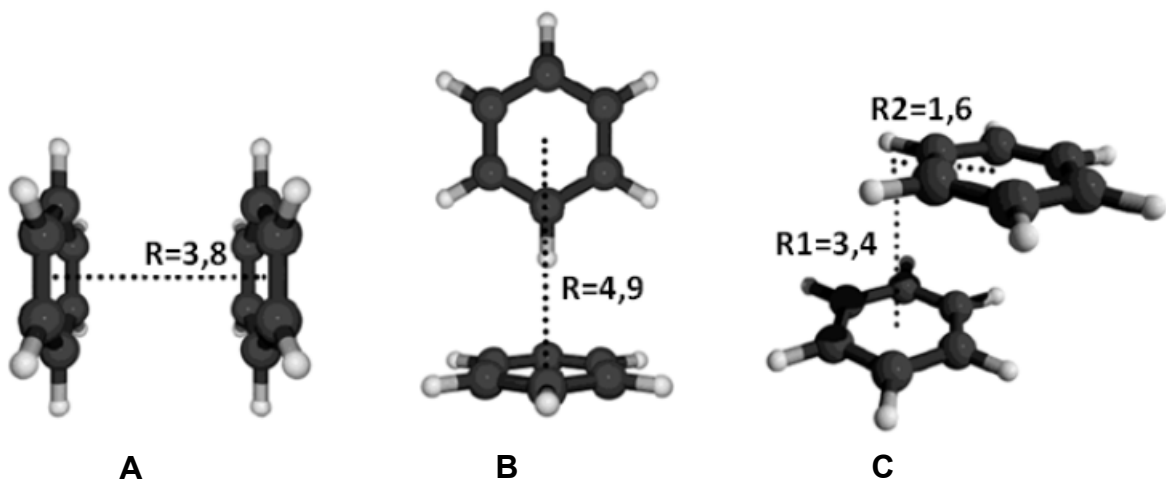
interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas contribuem na formação e estabilização de complexos proteicos.

Métodos computacionais têm sido amplamente utilizados na análise das interações de proteínas. Dependendo da eficiência do algoritmo e da parametrização, as técnicas computacionais podem ser um excelente complemento aos métodos experimentais, poupando tempo e recursos financeiros (Gorham *et al.*, 2011).

1.7. Interações entre anéis aromáticos

As interações entre anéis aromáticos também são chamadas interações π - π . São ligações não covalentes importantes em diversos meios biológicos como no enovelamento de proteínas, na estabilização da estrutura do DNA e no empacotamento de moléculas aromáticas em cristais. Há três principais tipos de interações entre anéis aromáticos: a Sanduíche, a Interação em T e a Paralelo deslocado (Figura 6). A Interação em T é a mais favorável eletrostaticamente, entretanto, a interação mais recorrente em proteínas é a Paralelo deslocado. (Guimarães, C. R. W., 2012).

Figura 6 – Tipos de interações π - π e as respectivas distâncias entre os anéis aromáticos. Em A, ilustra-se a interação Sanduíche com distância entre os anéis de 3,8Å; em B, a interação em T, com distância entre os anéis de 4,9Å; e em C, a interação Paralelo Deslocado com distância de 3,4Å.



As interações π - π são, conhecidamente, fortes e dirigem diversos fenômenos biológicos. A geometria de tais interações é controlada, basicamente, por forças eletrostáticas, não por uma atração eletrônica entre dois sistemas π , mas quando a atração entre ligações π e σ prevalecem sobre interações desfavoráveis, como a repulsão de ligações π . Em geral, a energia de ligação entre duas moléculas é calculada pela equação:

$$E_{total} = E_{eletrostática} + E_{indução} + E_{dispersão} + E_{indução}$$

Esse cálculo mostrou-se condizente com a realidade, de acordo com experimentos (Hunter e Sanders, 1990).

Segundo cálculos realizados por Guimarães, C. R. W., 2012, as energias de interação do Sanduíche, Interação em T e Paralelo Deslocado são, respectivamente, -1,8 kcal/mol, -2,7 kcal/mol e -2,8 kcal/mol.

1.8. Algoritmos

Há três principais algoritmos utilizados nos programas de *Docking*: o *Genetic Algorithm* (GA), o *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) e o *Generalized Simulated Annealing* (GSA).

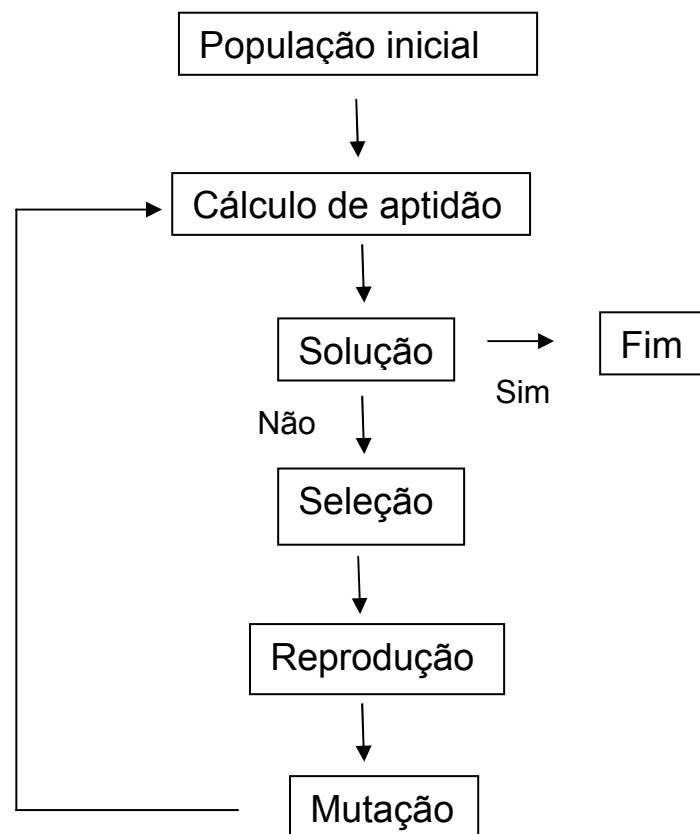
O *Genetic Algorithm* (GA) é baseado no princípio Darwiniano, ou seja, na evolução e na genética, podendo simular eventos como mutações e *crossover*. É um algoritmo estocástico, bastante utilizado em diversas metodologias. O termo “estocástico” se refere à aleatoriedade do método, por ser baseado em eventos genéticos, ou seja, cada rodada de *Docking* levará a um resultado diferente, não sendo, então prudente a comparação de dados entre rodadas distintas.

Do ponto de vista computacional, o funcionamento de um GA acontece da seguinte forma: é gerada, primeiramente, uma população de indivíduos chamada de geração. No segundo passo, todos os indivíduos de cada geração são avaliados pela função objetivo e recebem uma nota de acordo com a sua adequação ao ambiente. Quanto melhor for a adequação do indivíduo, mais chances ele tem de ser selecionado. Se for encontrada uma solução ótima nessa geração, então o problema está resolvido. Alguns indivíduos são selecionados, de acordo com a nota de adequação adquirida no passo dois, para fazer o cruzamento e assim gerar a próxima geração. Após o cruzamento é aplicada a mutação. O processo do segundo

passo em diante é repetido até que a solução ótima seja encontrada (Pacheco, Marco A. C., 1999).

O GA possui características próprias como o fato de utilizarem uma população e não um único indivíduo e utilizam regras de transição probabilísticas e não determinísticas.

Figura 7 - Fluxograma do funcionamento de um algoritmo genético.



Fonte: (Pacheco, Marco A. C., 1999).

O *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA), por sua vez, se baseia nos princípios de Lamarck de evolução, que falam sobre as alterações genéticas causadas por fatores ambientais, e tais características poderiam, ainda, ser transmitidas pelas gerações (Morris *et al.*, 1998).

O GSA é baseado no processo físico de anelamento. A posição dos átomos no anelamento representa os parâmetros a serem otimizados e a energia dos sólidos representam o custo da função a ser otimizado. Como em um anelamento, a função de menor custo energético é obtido pela diminuição lenta da temperatura, diminuindo o número de passos e, assim, convergindo para um mínimo global (Sutter *et al.*, 1994).

1.9. Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular (MD) consiste na simulação *in silico* de eventos biológicos, ou seja, como a molécula estudada se comportaria em um meio biológico. Os estudos cristalográficos são precisos quanto a estrutura e a flexibilidade da ligação proteína-ligante, entretanto, em sistemas biológicos naturais, tais moléculas não se encontram estáticas, mas em movimento.

Baseada na física Newtoniana, o movimento de átomos e moléculas pode ser simulado. Primeiramente, a estrutura da molécula é submetida ao programa que estima as forças atuantes em cada átomo e as que são geradas a partir de suas interações. Para reproduzir o comportamento das moléculas *in vivo*, a energia calculada é parametrizada segundo os cálculos mecânicos-quânticos. Esses parâmetros são chamados de “campo de força”. Vários campos de força são utilizados como o AMBER, GROMOS e CHARMM. Uma vez calculados os campos de força, a posição dos átomos são determinados de acordo com as Leis de Movimento de Newton (Durrant e Mccammon, 2011).

1.10. Regras de Cinco de Lipinski

Fármacos são desenvolvidos pela otimização de moléculas “líder” (lead-like) encontradas em bancos de dados biológicos. Após o processo de otimização, a molécula ativa farmacologicamente deve passar por testes intensos de toxicidade e eficácia.

Fármacos ingeridas por via oral devem possuir propriedades físico-químicas que decaem em faixas de valores, definindo, assim, parâmetros para que um medicamento seja seguro ao consumo humano. Dessa forma, as regras de cinco de Lipinski foram criadas, descrevendo as propriedades moleculares importantes na farmacocinética de um medicamento: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (parâmetros ADMETOX).

As regras de Lipinski avaliam os seguintes parâmetros: peso molecular menor que 500 daltons, logaritmo do coeficiente de partição (logP) menor que 5, número de átomos doadores de hidrogênio menor que 5 e número de aceptores de hidrogênio menor que 10. Com o objetivo de melhorar as predições dos candidatos a fármacos, novas regras foram estabelecidas: coeficiente de partição entre -0,4 e 5,6; refratividade molar de 40 a 130; peso molecular de 160 a 480; área superficial polar

menor que 140 Å²; 10 ou menos ligações rotacionáveis. A área superficial polar e número de ligações rotacionáveis são parâmetros que podem indicar se o medicamento é próprio para consumo oral (Veber *et al.*, 2002).

1.11. Banco de Dados Zinc

Uma grande quantidade de moléculas está disponível em diversas bibliotecas virtuais. O ZINC é um banco de dados de compostos químicos amplamente utilizado em metodologias de *virtual screening*. O banco de dados Zinc possui mais de vinte milhões de moléculas com seus respectivos valores de peso molecular, coeficiente de partição, número de ligações rotacionáveis, estrutura 3D.

Por possuir um número elevado de moléculas, o ZINC dispõe de ferramentas de seleção que restringem o número de moléculas na busca. O banco de dados tem suas moléculas organizadas em conjuntos e subconjuntos. O conjunto “Clean” é composto por moléculas que não causam efeitos colaterais em humanos, ou seja, as moléculas que, conhecidamente, causam problemas à saúde foram removidas.

Há quatro subconjuntos: *Lead-like*, *Fragment-like*, *Drug-like* e *All Purchasable* (Quadro 1). Os compostos *Lead-like* são moléculas grandes que podem ser detectadas em técnicas espectrofotométricas, mas, ainda assim, são menores que a maioria dos fármacos. São mais solúveis que as grandes moléculas *Drug-like*, sendo, portanto, mais utilizadas em ensaios biológicos. Os compostos *Fragment-like* são menores que os *Leads*, portanto, são difíceis de serem detectados com técnicas pouco sofisticadas, sendo necessárias NMR ou difração de raio-X, que são mais dispendiosas. Os compostos *Drug-like* seguem, parcialmente, as regras de Lipinski, havendo muitas exceções, por isso, é um subconjunto utilizado para posterior comparação, quando já há resultados obtidos a partir de outros subconjuntos. O subconjunto *All Purchasable* é composto por todas as moléculas dos demais subconjuntos reunidas. Sua principal vantagem é que as moléculas podem ser compradas, entretanto, para ensaios de *virtual screening*, onde é necessária uma precisão das características físico-químicas, muitas das moléculas não seriam apropriadas, apenas aumentando o tempo necessário para a conclusão do trabalho (Irwin e Shoichet, 2005).

Figura 8 – Conjuntos e subconjuntos de banco de dados de moléculas do Zinc Data Base

| | Lead-Like | Fragment-Like | Drug-Like | All | Shards |
|---------------------------------|--|---|--|--|--|
| Standard Size Updated | <u>Lead-Like</u> 6,053,287 2014-09-29 | <u>Fragment-Like</u> 1,389,525 2013-10-25 | <u>Drug-Like</u> 15,798,630 2013-02-08 | <u>All Purchasable</u> 22,724,825 2013-12-18 | <u>Shards</u> 635,159 2014-05-16 |
| Clean Size Updated | <u>Clean Leads</u> 4,591,276 2014-09-25 | <u>Clean Fragments</u> 1,611,889 2014-09-24 | <u>Clean Drug-Like</u> 13,195,609 2013-11-05 | <u>All Clean</u> 16,403,865 2013-12-18 | <u>Clean Shards</u> 60,021 2013-11-05 |
| In Stock Size Updated | <u>Leads Now</u> 3,687,621 2014-06-25 | <u>Fragms Now</u> 1,768,827 2014-09-17 | <u>Drugs Now</u> 7,377,031 2014-06-17 | <u>All Now</u> 12,782,590 2014-05-01 | <u>Shards Now</u> 424,775 2014-09-24 |
| Boutique Size Updated | <u>Boutique Leads</u> 5,114,169 2012-12-24 | <u>Boutique Frags</u> 2,755,555 2013-11-08 | <u>Boutique Drugs</u> 10,292,210 2012-11-27 | <u>All Boutique</u> 12,217,845 2012-11-27 | <u>Boutique Shards</u> 80,698 2013-11-08 |

Fonte: Banco de Dados Zinc. Dados de 11/11/2014.

2. Objetivos

Identificar ligantes específicos para a inibição de integrinas da família $\beta 1$ utilizando metodologias teóricas e computacionais, tais como modelagem computacional e *Docking* molecular.

2.1. Objetivos específicos

Determinar computacionalmente a estrutura tridimensional dos complexos $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 1$.

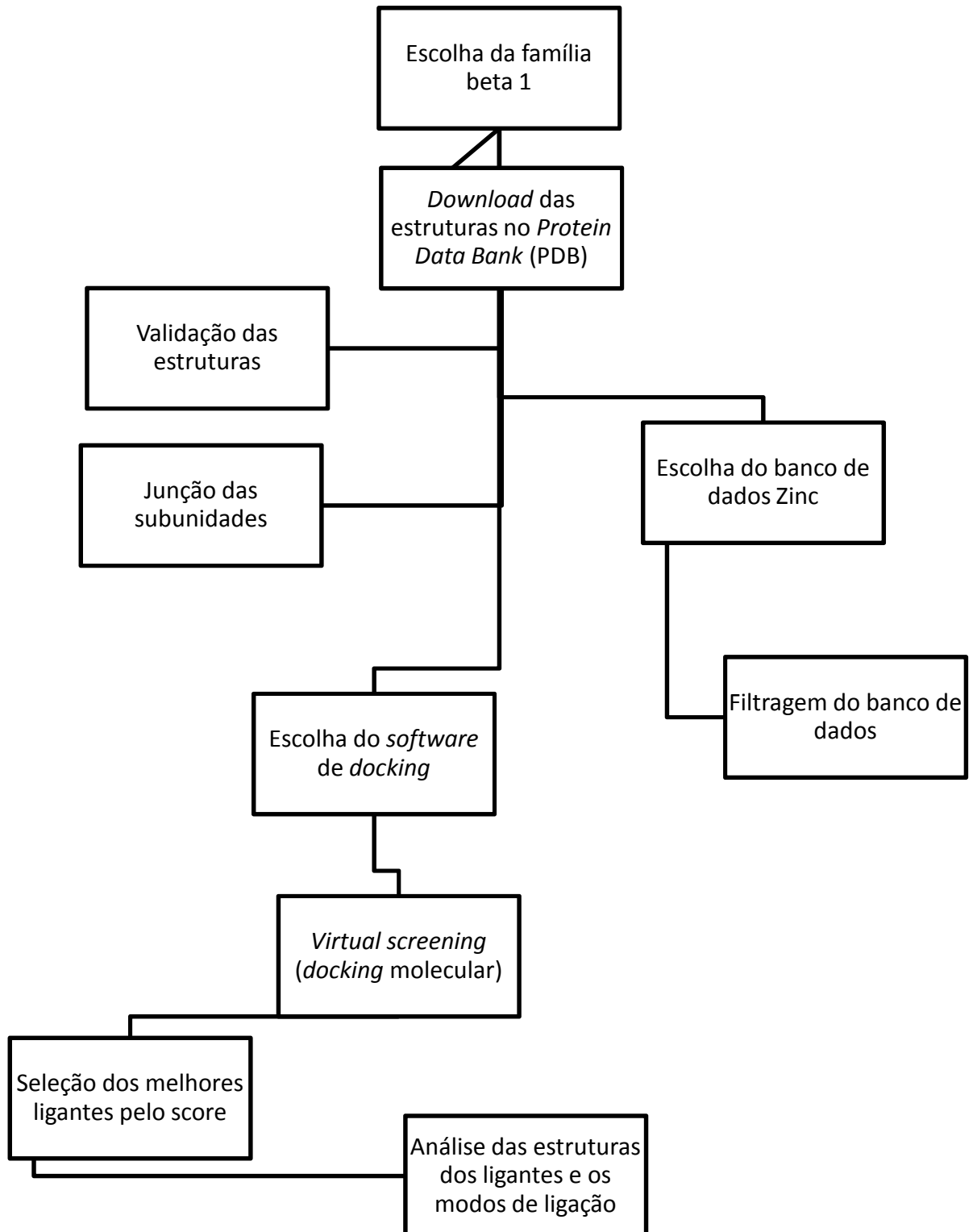
Encontrar os melhores ligantes para cada receptor utilizando a técnica do *Virtual screening*.

Caracterizar o sítio de ligação das integrinas da família $\beta 1$ com uma série de ligantes conhecidos, visando ao desenvolvimento de novos e melhores inibidores capazes de se ligar especificamente a essas proteínas.

3. Metodologia

Apresenta-se, a seguir, um quadro geral da metodologia utilizada no presente trabalho (Figura 9).

Figura 9 – Esquema geral da metodologia utilizada para o desenvolvimento do trabalho

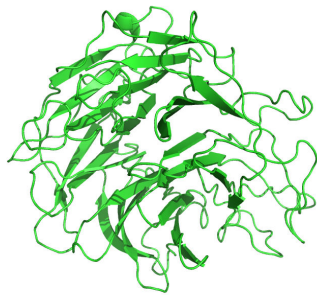
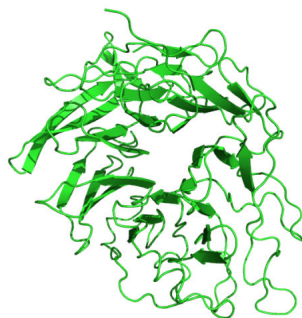


Fonte: Autora.

3.1. Obtenção das estruturas e junção das subunidades

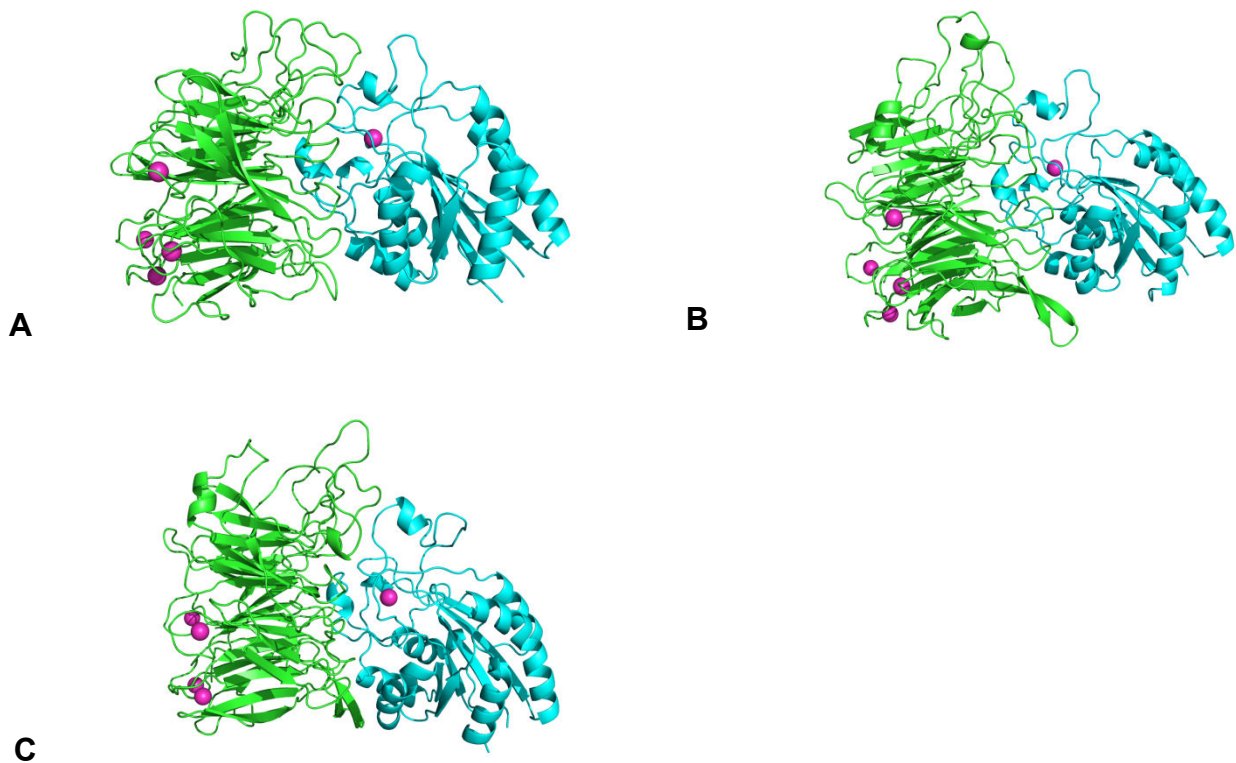
Buscou-se no PDB as estruturas cristalizadas das integrinas da família $\beta 1$, exceto a integrina $\alpha 8\beta 1$ devido a ausência na literatura de relatos de sua participação em processos patológicos relevantes. As estruturas dos monômeros $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv e $\beta 1$ correspondem aos ids 3V4P, 3VI3, 1JV2 e 3VI3 respectivamente (Figura 10). Os complexos $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 1$ foram criados pelo alinhamento dos monômeros ao seu respectivo complemento no software Pymol (Figura11).

Figura 10 – Estruturas dos monômeros $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv e $\beta 1$ geradas pelo programa Pymol a partir de sequências obtidas do PDB. A: estrutura da subunidade $\alpha 4$; B: estrutura do monômero $\alpha 5$; C: estrutura da subunidade αv ; D: estrutura do monômero $\beta 1$.

A**B****C****D**

Fonte: Autora (elaborada pelo programa Pymol).

Figura 11 – Estruturas dos dímeros $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha\nu\beta_1$. Formação dos dímeros por alinhamento das subunidades e criação das figuras no software Pymol. A: $\alpha_4\beta_1$; B: $\alpha_5\beta_1$; C: $\alpha\nu\beta_1$. Em verde, cadeia α ; em azul, cadeia β ; em rosa, íons Ca^{2+} .



Fonte: Autora (elaborada pelo programa Pymol).

3.2. Filtragem do banco de dados Zinc

O *virtual screening* e o *Docking* das moléculas disponíveis no banco de dados Zinc em um receptor seriam processos extremamente demorados que requereriam um computador de alto desempenho. Para reduzir esse tempo e otimizar o trabalho, foi feita uma filtragem das moléculas de interesse presentes no Zinc dB. Prospectou-se o conjunto “Clean”, pois é sabido que contém moléculas que não produzem efeitos colaterais em humanos. Dentro desse conjunto, utilizou-se o subconjunto “Lead-like”, pois é composto de moléculas grandes, muito utilizadas em docagem, e podem atuar como inibidores de estruturas de grande porte como as integrinas. Utilizou-se, então, a função “Property” do Zinc, onde se determina as características físico-químicas das possíveis moléculas de interesse. Restringiu-se tal pesquisa de acordo com as regras de Lipinski.

3.2.1. O gráfico de Ramachandran

O gráfico de Ramachandran foi desenvolvido em 1963, ao ser introduzido um sistema de análise e parametrização das estruturas de proteínas, baseado na plotagem dos ângulos ψ - ϕ (psi-phi).

Esse modelo tornou-se uma ótima ferramenta de determinação da estrutura de proteínas e para a avaliação da qualidade estereoquímica. Criou-se, então um mapa estérico que prevê as regiões favoráveis α_R , α_L e regiões- β energeticamente (Ho *et al.*, 2003). A distribuição dos ângulos torcionais psi e phi da cadeia principal é um importante indicador para a validação de um modelo. O ângulo torcional phi refere-se ao ângulo de torção da ligação C α -N (carbono α - nitrogênio), enquanto o ângulo psi refere-se ao ângulo de torção da ligação C α – CO (carbono da carbonila). (Abreu, Paula A., 2008).

3.3. Metodologia de *Virtual screening*

Outra abordagem da técnica de *Virtual screening* é a triagem baseada em Ligantes. Tal estratégia utiliza moléculas com atividade biológica já conhecida, identificando semelhanças estruturais entre si, levando a crer que podem compartilhar atividade biológica, sem considerar a estrutura do receptor. A triagem baseada em ligantes é utilizada quando há pouca ou nenhuma informação sobre a estrutura 3D do receptor. Duas abordagens principais pertencentes ou grupo da triagem em ligantes são descritas a seguir.

3.3.1. *Virtual screening* por padrão farmacofórico

A metodologia de busca baseada no padrão farmacofórico é utilizada quando se conhece um conjunto de ligantes ativos e suas ligações ao receptor são analisadas. Um ligante ativo possui características químicas específicas como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, grupamentos químicos que interagem com o receptor e podem ser utilizadas como base de busca e seleção de novas moléculas que atendam as principais características responsáveis pela ligação ativa receptor-ligante.

3.3.2. *Virtual screening* por similaridade

Outra metodologia utilizada no *virtual screening* em ligantes se baseia no princípio de que moléculas com estruturas similares tem alta probabilidade de possuírem características físico-químicas e atividades biológicas semelhantes. No

entanto, a relação entre similaridade estrutural e propriedades físico-químicas não é direta, há a possibilidade de compostos com estruturas químicas semelhantes não compartilharem da mesma atividade biológica.

A triagem por similaridade é um processo simples que consiste na seleção de uma molécula com conhecida atividade biológica (ponto de referência) e a busca em bibliotecas virtuais de compostos químicos de moléculas com características estruturais similares. As moléculas assim selecionadas são possíveis alvos de estudos farmacológicos e testes biológicos (Rodrigues R. P. *et al*, 2012).

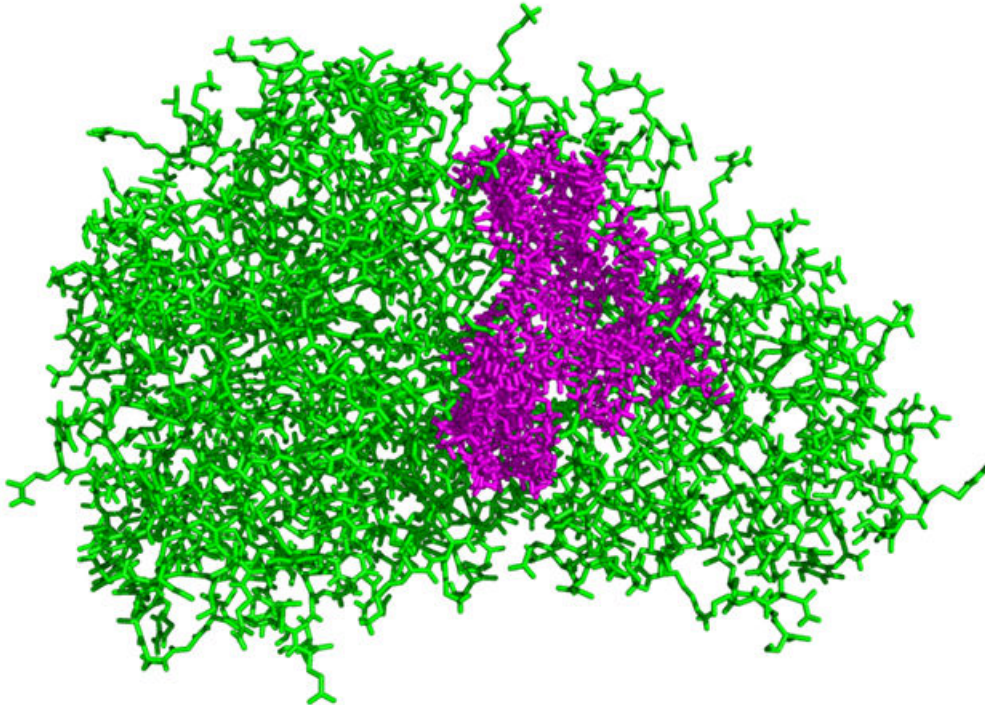
3.4. Metodologia do *Docking* Molecular

Há diversas metodologias descritas na literatura utilizadas para realizar o *Docking* molecular, as quais podem variar pelos algoritmos de busca utilizados, tipo de campo de força, pelo modo de cálculo da energia e por implementar o *Docking* rígido ou flexível.

O software Autodock Vina é um programa de *Docking* molecular com interface gráfica que utiliza a função “escore” para predizer, de acordo com a diferença entre sua energia e energia livre, quais moléculas possuem maior potencial de se ligarem ao receptor (Trott e Olson, 2010).

O software Sybyl-X, por sua vez, é um programa que também realiza *Docking* molecular e possui interface gráfica. Pode-se determinar a área de ligação do inibidor, chamado de “protomol” de acordo com dados conhecidos a partir da realização de experimentos prévios.

Figura 12 – Área de ligação do inibidor (Protomol) calculado pelo programa Sybyl-X. Em verde, a integrina $\alpha 4\beta 1$ e em roxo, a área do Protomol.



Fonte: Autora. (Desenvolvida no software Pymol).

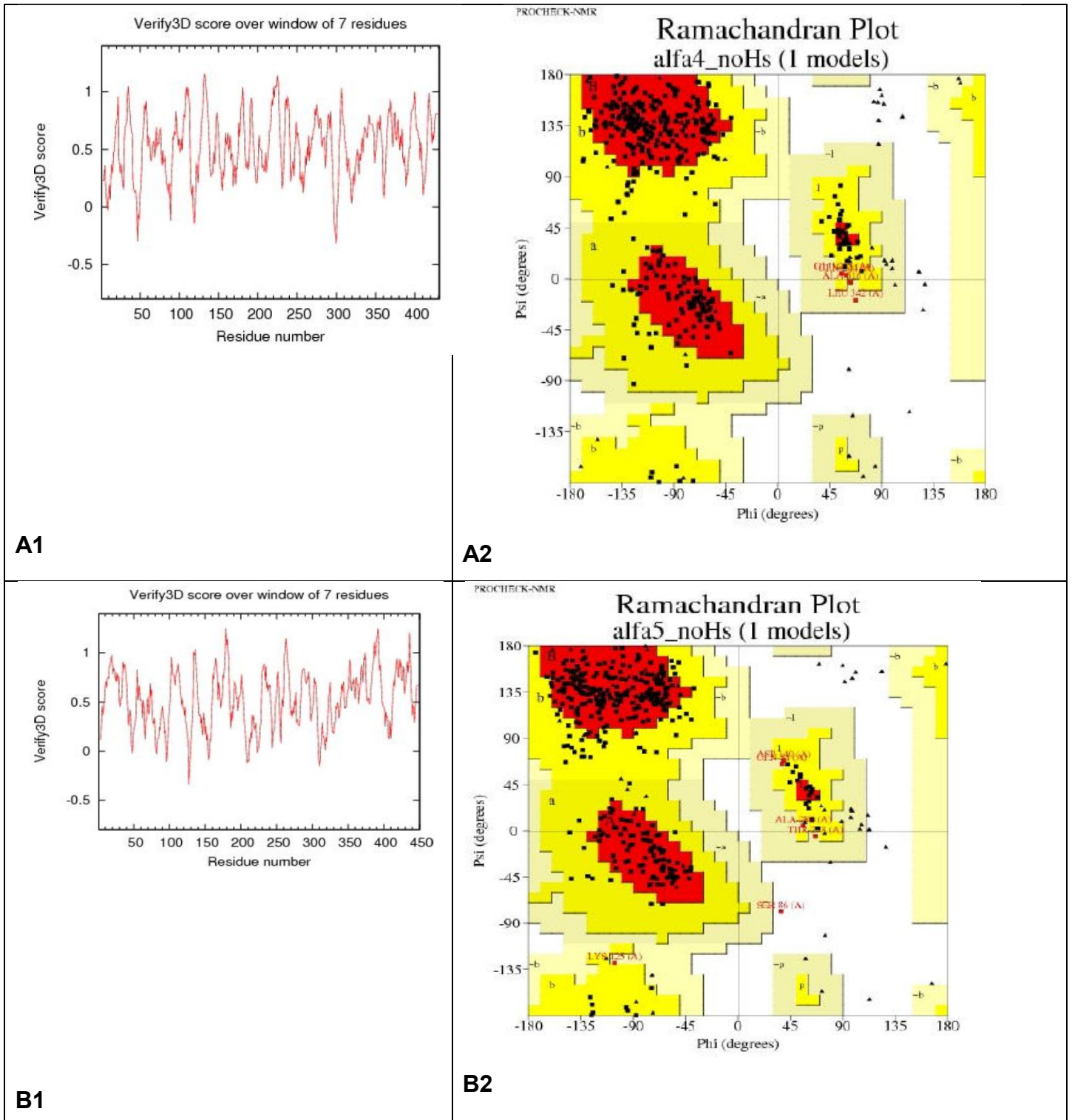
Por ser uma proteína dependente de íons divalentes, nesse caso, Ca^{2+} , a região MIDAS que compreende tal íon foi utilizada como base para a restrição da área de ligação dos ligantes aos receptores para a realização do *Docking* molecular. Tal área é, preferencialmente, restrita devido à praticidade, pois a realização do *Docking* de cada ligante a toda a região da integrina demandaria tempo desnecessariamente, já que é sabido que o ligante se acopla na área próxima ao íon MIDAS. Portanto, a área do sítio de ligação foi delimitada em um cubo com dimensões de 35 Å de aresta, sendo o íon do motivo MIDAS Ca^{2+} o centro do cubo. O grid compreende a região de interesse, onde os ligantes se acoplarão aos seus receptores nas melhores poses possíveis. Optamos trabalhar com *Docking* rígido devido às inúmeras possibilidades do *Docking* flexível, o que demandaria tempo e máquinas mais potentes.

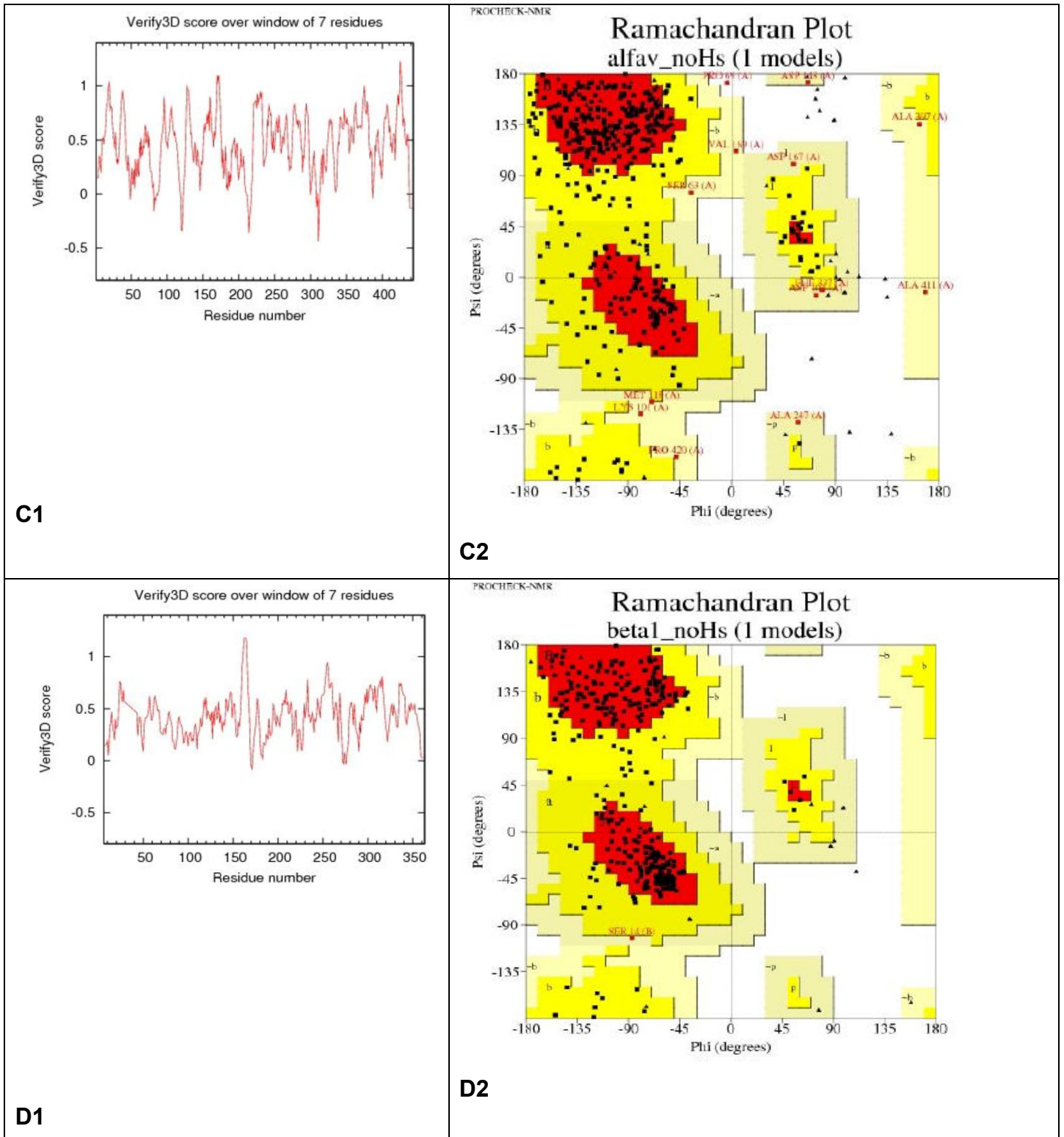
4. Resultados

4.1. Validação das estruturas

As estruturas dos monômeros das integrinas obtidas foram submetidas a validação no software SaVES. Analisou-se os parâmetros do Verify-3D e do gráfico de Ramachandran (Figura 13).

Figura 13 – Validações das estruturas dos monômeros $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv e $\beta 1$ pelos gráficos do Verify 3D e de Ramachandran.





Fonte: Autora. (Elaborada pelo *Software SaVes*). A1: Verify-3D para $\alpha 4$. A2: Gráfico de Ramachandran para $\alpha 4$. Resíduos nas regiões mais favoráveis [A,B,L]: 78.2%; Resíduos nas regiões permitidas [a,b,l,p]: 20.7%; Resíduos nas regiões generosamente permitidas [-a, -b, -l, -p]: 1.1%; Resíduos nas regiões não permitidas: 0.0%. B1: Verify 3D para $\alpha 5$. B2: Gráfico de Ramachandran para $\alpha 5$. Resíduos nas regiões mais favoráveis [A,B,L]: 79.1%; Resíduos nas regiões permitidas [a,b,l,p]: 19.2%; Resíduos nas regiões generosamente permitidas [-a, -b, -l, -p]: 1.4%; Resíduos nas regiões não permitidas: 0.3%. C1: Verify-3D para αv . C2: Gráfico de Ramachandran para αv . Resíduos nas regiões mais favoráveis [A,B,L]: 69.5%; Resíduos nas regiões permitidas [a,b,l,p]: 27.6%; Resíduos nas regiões generosamente permitidas [-a, -b, -l, -p]: 3.0%; Resíduos nas regiões não permitidas: 0.0%. D1: Verify-3D para $\beta 1$. D2: Gráfico de Ramachandran para $\beta 1$. Resíduos nas regiões mais favoráveis [A,B,L]: 81.3%; Resíduos nas regiões permitidas [a,b,l,p]: 18.4%; Resíduos nas regiões generosamente permitidas [-a, -b, -l, -p]: 0.3%; Resíduos nas regiões não permitidas: 0.0%.

Os resultados obtidos no gráfico de Ramachandran foram satisfatórios, devido à presença da maioria dos resíduos na região vermelha e amarela do gráfico que correspondem às regiões “favorável” e “permitida”, respectivamente, somando-se um percentual de mais de 95%, que é um resultado confiável. Apenas um resíduo no gráfico de $\alpha 5$ está localizado em região não permitida, alcançando um percentual excessivamente baixo que pode ser desconsiderado. Portanto, os monômeros podem ser utilizados na criação dos dímeros e posteriores experimentos *in silico*.

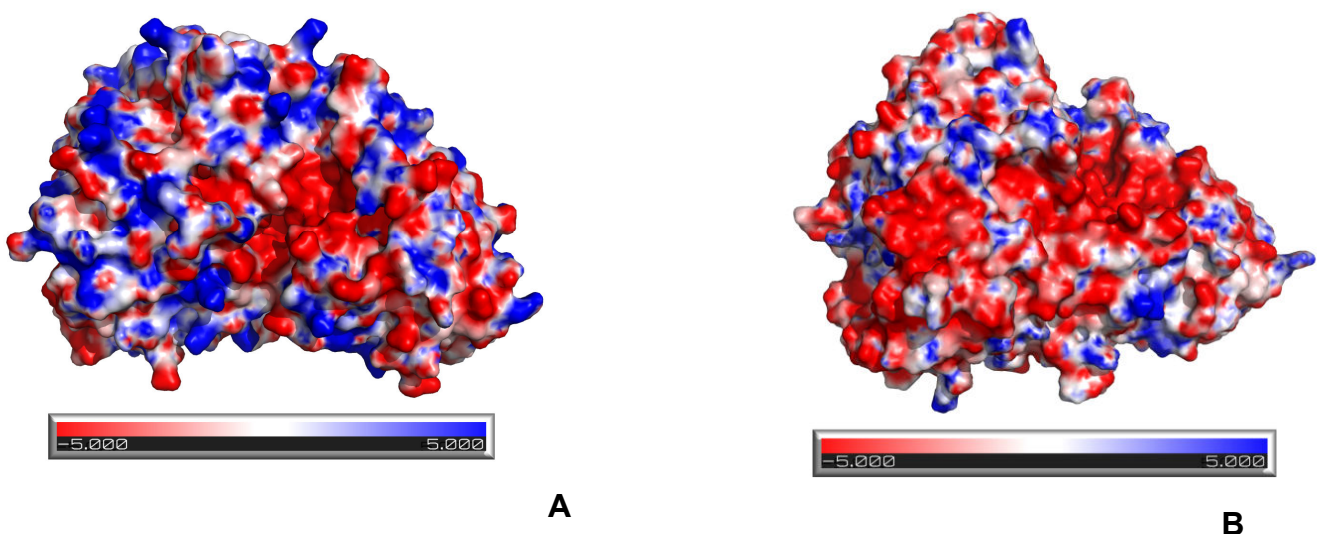
4.1.1. Verify 3D score

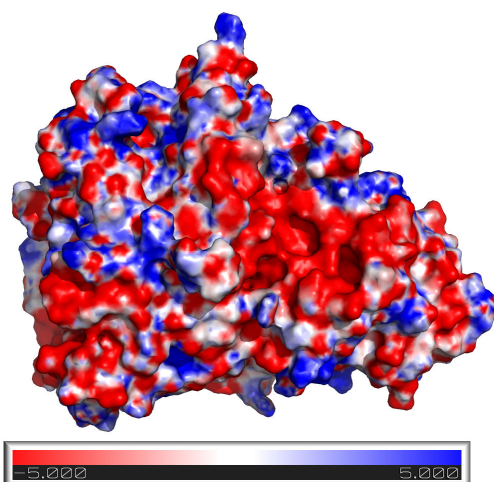
O Verify 3D analisa o perfil tridimensional da estrutura de uma proteína. A tabela gerada é computada a partir de coordenadas atômicas da estrutura que pode ser usada para calcular a compatibilidade do modelo de estrutura 3D com qualquer sequência de aminoácidos (Eisenberg, David, 2003).

4.2. Cálculos eletrostáticos de Poisson-Boltzmann

Os cálculos de Poisson-Boltzmann (PB) representam as análises eletrostáticas, utilizando solvatação implícita em proteínas. Os cálculos PB são altamente sensíveis à seleção de parâmetros. Os valores de energia livre obtidos pelos cálculos eletrostáticos de PB variam de acordo com a escolha do limite dielétrico (Gorham *et al.*, 2011).

Figura 14 – Perfil eletrostático da região de ancoragem do ligante desenvolvido no programa Pymol, utilizando-se o plugin APBS).





C

Fonte: Autora. A: integrina $\alpha 4\beta 1$; B: integrina $\alpha 5\beta 1$; C: integrina $\alpha v\beta 1$. Em vermelho: área com potencial predominantemente negativo; em azul: área com potencial predominantemente positivo; em branco, área com potencial eletrostático predominantemente neutro. Observa-se, portanto, que a região de ligação do receptor é predominantemente vermelha, ou seja, eletronegativa, devido a uma alta concentração de resíduos negativamente carregados nessa região, podendo favorecer a ancoragem de ligantes com características positivas.

4.3. Resultados do *Virtual screening*

O *Virtual screening* foi realizado utilizando-se o software Sybyl-X. As moléculas do banco de dados Zinc que passaram pela filtragem foram docadas pelo programa nos três receptores $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 1$ e os melhores resultados foram obtidos em ordem decrescente de “escore”, sendo o maior número correspondente ao resultado mais favorável (Quadro 1).

Quadro 1 – Vinte melhores ligantes obtidos para cada receptor como resultado do *virtual screening* no programa Sybyl-X.

| $\alpha 4\beta 1$ | ID do ZINC | Nome | Score |
|-------------------|------------|--|-------|
| | 8440606 | 4-[4-(allyloxy)benzoyl]-3-hydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-1-(3-methoxypropyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 9.36 |
| | 8437899 | 2-[4-[(2-[4-(aminosulfonyl)phenyl]ethyl)amino)methyl]-2-ethoxyphenoxy]-N-(tert-butyl)acetamide | 9.34 |
| | 8440573 | 5-[4-(benzyloxy)phenyl]-1-[2-(dimethylamino)ethyl]-3-hydroxy-4-(4-methoxybenzoyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 8.72 |
| | 8440615 | 1-[2-(diethylamino)ethyl]-4-(3-fluoro-4-methoxybenzoyl)-3-hydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 8.63 |
| | 1413505 | 5-(4-ethylphenyl)-3-hydroxy-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 8.53 |
| | 9045647 | (E)-(4-methoxy-3-methylphenyl)[2-(4-methylphenyl)-4,5-dioxo-1-(pyridinium-3-ylmethyl)pyrrolidin-3-ylidene]methanolate | 8.18 |
| | 0702440 | 4-[(2,5-dimethylphenyl)carbonyl]-5-(3-ethoxy-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-(2-phenylethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 8.11 |
| | 8437906 | N-[3-bromo-4-[(4-fluorobenzyl)oxy]-5-methoxybenzyl]-N-[2-[(1-methyl-1H-tetraazol-5-yl)sulfanyl]ethyl]amine | 8.05 |
| | 9122179 | 1-[3-(dimethylamino)propyl]-5-(4-ethoxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxy-4-(4-methoxy-2-methylbenzoyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 8.03 |
| | 0702370 | 4-[(4-ethoxyphenyl)carbonyl]-3-hydroxy-1-(2-phenylethyl)-5-(pyridin-4-yl)-1,5- | 7.97 |

| | | | |
|-------------------|---------|--|------|
| | | dihydro-2H-pyrrol-2-one | |
| | 8432222 | N,N'-(benzene-1,4-diyl dimethanediyl)bis[3-(4-methoxyphenyl)propanamide] | 7.95 |
| | 1413496 | 5-(4-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 6.84 |
| | 1413498 | 5-(3-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 6.45 |
| | 5918675 | 4-(4-butoxybenzoyl)-5-(4-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 6.02 |
| | 8433244 | 4-[4-(allyloxy)-3-methylbenzoyl]-5-(2-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-(2-morpholin-4-ylethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 5.67 |
| | 8438764 | 3-hydroxy-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-5-(2-methoxyphenyl)-4-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 5.45 |
| | 0702696 | 3-hydroxy-4-[(5-methylfuran-2-yl)carbonyl]-5-(3-phenoxyphenyl)-1-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 5.42 |
| | 0625531 | 5-(2,5-dimethoxyphenyl)-1-(4-ethoxyphenyl)-3-hydroxy-4-(4-methylbenzoyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 5.25 |
| | 9184849 | 1-[3-(dimethylamino)propyl]-5-(4-ethoxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxy-4-(4-methoxy-2-methylbenzoyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 4.65 |
| | 1413516 | 3-hydroxy-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 3.08 |
| $\alpha 5\beta 1$ | 8438979 | 2-methoxyethyl 5-[[4-(ethylphenyl)sulfonyl]amino]-2-methylnaphtho[1,2-b]furan-3-carboxylate | 9.57 |
| | 8430718 | 3-{1-[3-(1-azepanyl)-2-hydroxypropyl]-1H-indol-3-yl}-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propen-1-one | 8.12 |
| | 8439309 | 2-methoxyethyl 2-methyl-5-[(8-quinolinylsulfonyl)amino]naphtho[1,2-b]furan-3-carboxylate | 8.05 |
| | 8438548 | 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-4-(4-methylbenzoyl)-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 7.98 |
| | 5920825 | 4-(4-ethoxy-3-methylbenzoyl)-1-(3-ethoxypropyl)-3-hydroxy-5-(4-methylphenyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 7.96 |
| | 0702716 | 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-4-[(5-methylfuran-2-yl)carbonyl]-1-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 7.90 |
| | 8438658 | 3-hydroxy-4-(4-methoxybenzoyl)-1-[3-(4-morpholinyl)propyl]-5-(3-pyridinyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 7.86 |
| | 8439971 | 1-[3-(diethylamino)propyl]-4-(4-ethoxybenzoyl)-3-hydroxy-5-(4-isopropylphenyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 7.79 |
| | 8437889 | 4-[2-({3-methoxy-4-[2-oxo-2-(1-piperidinyl)ethoxy]benzyl}amino)ethyl]benzenesulfonamide | 7.79 |
| | 8440526 | 4-[(4-ethoxy-3-methylphenyl)carbonyl]-3-hydroxy-1-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-5-(4-methylphenyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 7.77 |
| | 0623995 | 1-(4-{4-[(3-bromo-4-ethoxy-5-methoxybenzyl)amino]phenyl}piperazin-1-yl)ethanone | 7.74 |
| | 1413504 | 5-(4-ethylphenyl)-3-hydroxy-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 6.63 |
| | 8435579 | 4-benzoyl-5-[4-(dimethylamino)phenyl]-3-hydroxy-1-(2-morpholin-4-ylethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 6.55 |
| | 2753344 | 2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-(4-ethoxybenzyl)-N-(2,4,5-trimethoxybenzyl)ethanamine | 6.06 |
| | 0626276 | 1-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-3-hydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-4-(2-thienylcarbonyl)-3-pyrrolin-2-one | 5.63 |
| | 6144549 | 7-[4-(benzyloxy)phenyl]-2-(3-hydroxypropyl)-5-methyl-N-(3-pyridinyl)-4,7-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide | 5.48 |
| | 8441292 | 4-(1-benzofuran-2-ylcarbonyl)-3-hydroxy-1-[3-(1H-imidazol-1-yl)propyl]-5-[4-(prop-2-en-1-yloxy)phenyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 5.45 |

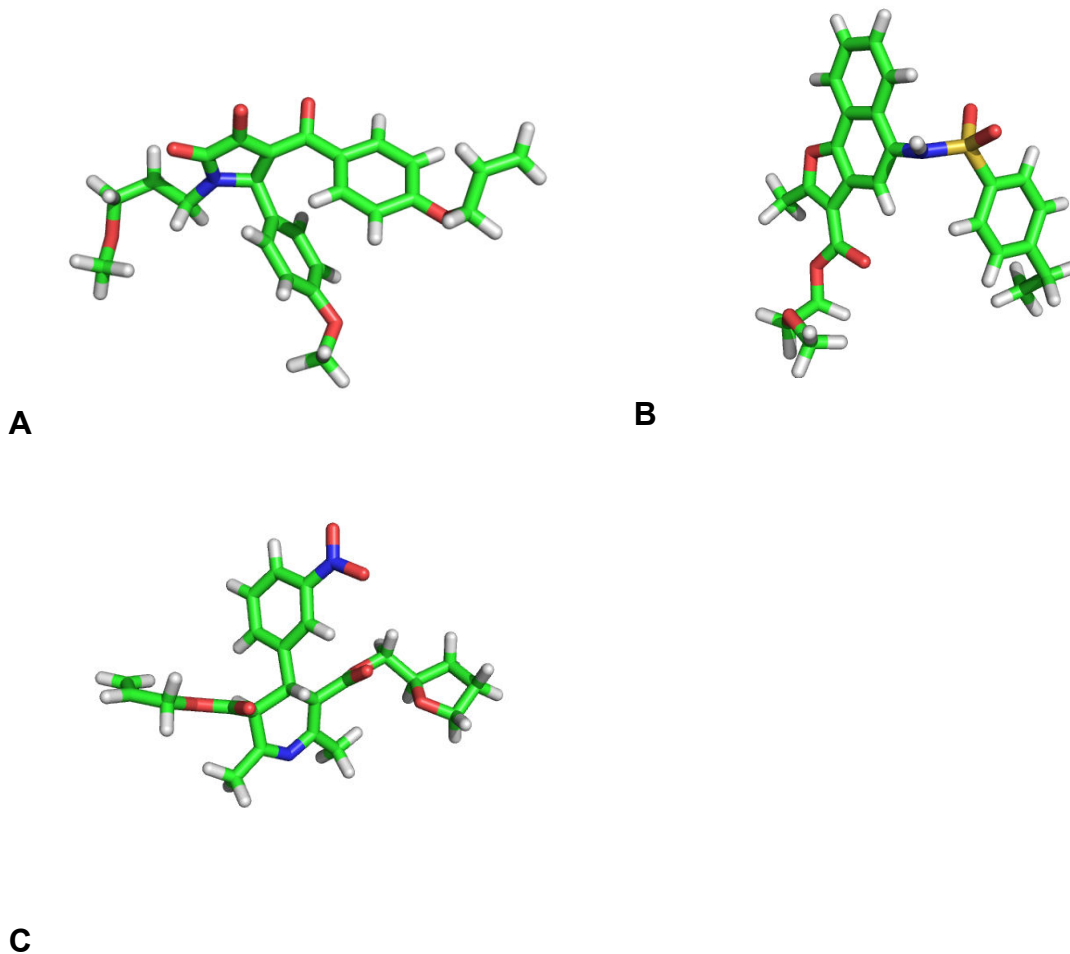
| | | | |
|------|----------|---|-------|
| | 8439669 | 2-propoxyethyl 4-[4-(methoxycarbonyl)phenyl]-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylate | 5.18 |
| | 8435041 | 1-methyl-3-nonyl-6,7-dihydro[1,3]thiazolo[2,3-f]purine-2,4(1H,3H)-dione | 4.67 |
| | 0702710 | 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(furan-2-ylmethyl)-3-hydroxy-4-[(5-methylfuran-2-yl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 4.63 |
| αvβ1 | 8439426 | 3-allyl 5-(tetrahydro-2-furanylmethyl) 4-{3-nitrophenyl}-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-3,5-pyridinedicarboxylate | 10.61 |
| | 17124157 | (4E)-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-{hydroxy[3-methyl-4-(2-methylpropoxy)phenyl]methylidene}-1-(3-methoxypropyl)pyrrolidine-2,3-dione | 9.50 |
| | 15952848 | 3-hydroxy-5-(3-methoxyphenyl)-4-[(2-methyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl)carbonyl]-1-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 9.13 |
| | 8430745 | 3-{1-[3-(2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)-2-hydroxypropyl]-1H-indol-3-yl}-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propen-1-one | 8.74 |
| | 8440490 | 1-[3-(dimethylamino)propyl]-4-(2-furoyl)-3-hydroxy-5-[4-(isopentyloxy)-3-methoxyphenyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 8.72 |
| | 8437935 | 2-[2-ethoxy-6-iodo-4-({[3-(4-morpholinyl)propyl]amino}methyl)phenoxy]acetamide | 8.48 |
| | 8431366 | 1-[12-(5-cyano-2,4-dioxo-3,4-dihydro-1(2H)-pyrimidinyl)dodecyl]-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinecarbonitrile | 8.42 |
| | 0702702 | 3-hydroxy-4-[(4-methylphenyl)carbonyl]-5-(3-phenoxyphenyl)-1-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 8.36 |
| | 9012355 | 6-amino-4-{4-[(4-chlorobenzyl)oxy]-3-methoxyphenyl}-3-propyl-1,4-dihydropyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile | 8.35 |
| | 8431534 | 2-[(1-{2-hydroxy-3-[(3,3,5-trimethylcyclohexyl)oxy]propyl}piperidin-4-yl)methyl]-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione | 8.22 |
| | 8430692 | 3-(1-{3-[butyl(methyl)amino]-2-hydroxypropyl}-1H-indol-3-yl)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propen-1-one | 8.17 |
| | 8435476 | 1-(4-methoxyphenyl)-2,5-dioxo-3-pyrrolidinyl nitrobenzylidene}hydrazinecarbimidothioate 2-{2- | 8.08 |
| | 971816 | 2-(4-methylphenyl)-2-oxoethyl 2-(4-nitro-1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-3-phenylpropanoate | 8.07 |
| | 8438732 | 4-acetyl-3-hydroxy-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-octyl-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 8.01 |
| | 1413487 | 3-hydroxy-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4-(4-methoxybenzoyl)-5-phenyl-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 7.95 |
| | 8440200 | 4-[(3-ethoxyphenyl)carbonyl]-3-hydroxy-5-(3-hydroxyphenyl)-1-(pyridin-4-ylmethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 7.41 |
| | 8439532 | 3-methyl 5-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)ethyl] 4-{3-nitrophenyl}-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-3,5-pyridinedicarboxylate | 6.68 |
| | 8439528 | 3-methyl 5-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)ethyl] 4-{3-nitrophenyl}-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-3,5-pyridinedicarboxylate | 6.65 |
| | 17124565 | N,N-diethyl-4-[[4-hydroxy-1-(3-methoxypropyl)-5-oxo-2-phenyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]carbonyl]benzenesulfonamide | 5.79 |
| | 1413497 | 5-(4-fluorophenyl)-3-hydroxy-1-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-4-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one | 4.92 |

Fonte: Autora.

4.3.1. Os melhores ligantes

Os melhores ligantes para cada receptor foram identificados pelos maiores escores (Figura 15).

Figura 15 – Estrutura dos ligantes mais favoráveis para cada receptor. Ligantes obtidos pela técnica do *virtual screening* no software Sybyl-X



Fonte: Autora. (Desenvolvidas no programa Pymol). A: melhor ligante (id Zinc: 8440606) para a integrina $\alpha 4\beta 1$; B: melhor ligante (id Zinc: 8438979) para a integrina $\alpha 5\beta 1$; C: melhor ligante (id Zinc: 8439426) para a integrina $\alpha v\beta 1$.

Foi realizada uma busca minuciosa na literatura dos 20 melhores ligantes para cada receptor, obtidos a partir do *virtual screening*. As moléculas N-{3-bromo-4-[(4-fluorobenzyl)oxy]-5-methoxybenzyl}-N-{2-[(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfanyl]ethyl}amine (ID do Zinc: 8437906), ligante de $\alpha 4\beta 1$, 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(furan-2-ylmethyl)-3-hydroxy-4-[(5-methylfuran-2-yl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one (ID do Zinc: 0702710) e 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-4-[(5-methylfuran-2-yl)carbonyl]-1-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one (ID do Zinc 0702716) ligantes de $\alpha 5\beta 1$, possuem relação com a inibição da replicação de *Trypanosoma cruzi*, segundo o banco de dados Collaborative Drug Discovery (CDD) (Hohman *et al.*, 2009). As integrinas da família $\beta 1$ estão envolvidas no processo de entrada do *T. cruzi* em macrófagos humanos. O suporte para essa teoria vem de experimentos de inibição com anticorpos anti- $\beta 1$, causando uma redução na entrada e replicação do *T. cruzi* em macrófagos humanos, não excluindo, contudo, a participação de outras moléculas no processo de infecção. Ressalta-se, portanto, a necessidade das integrinas da família $\beta 1$ na internalização

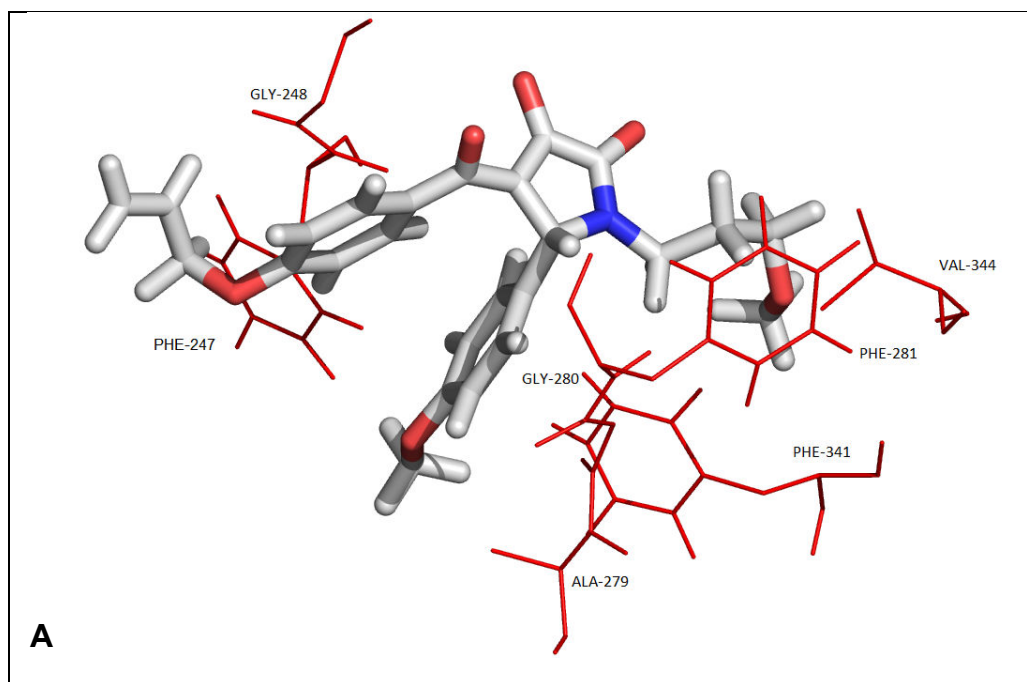
do *T. cruzi* nos macrófagos, possibilitando a replicação do protozoário e infecção da célula (Fernandez *et al.*, 1993).

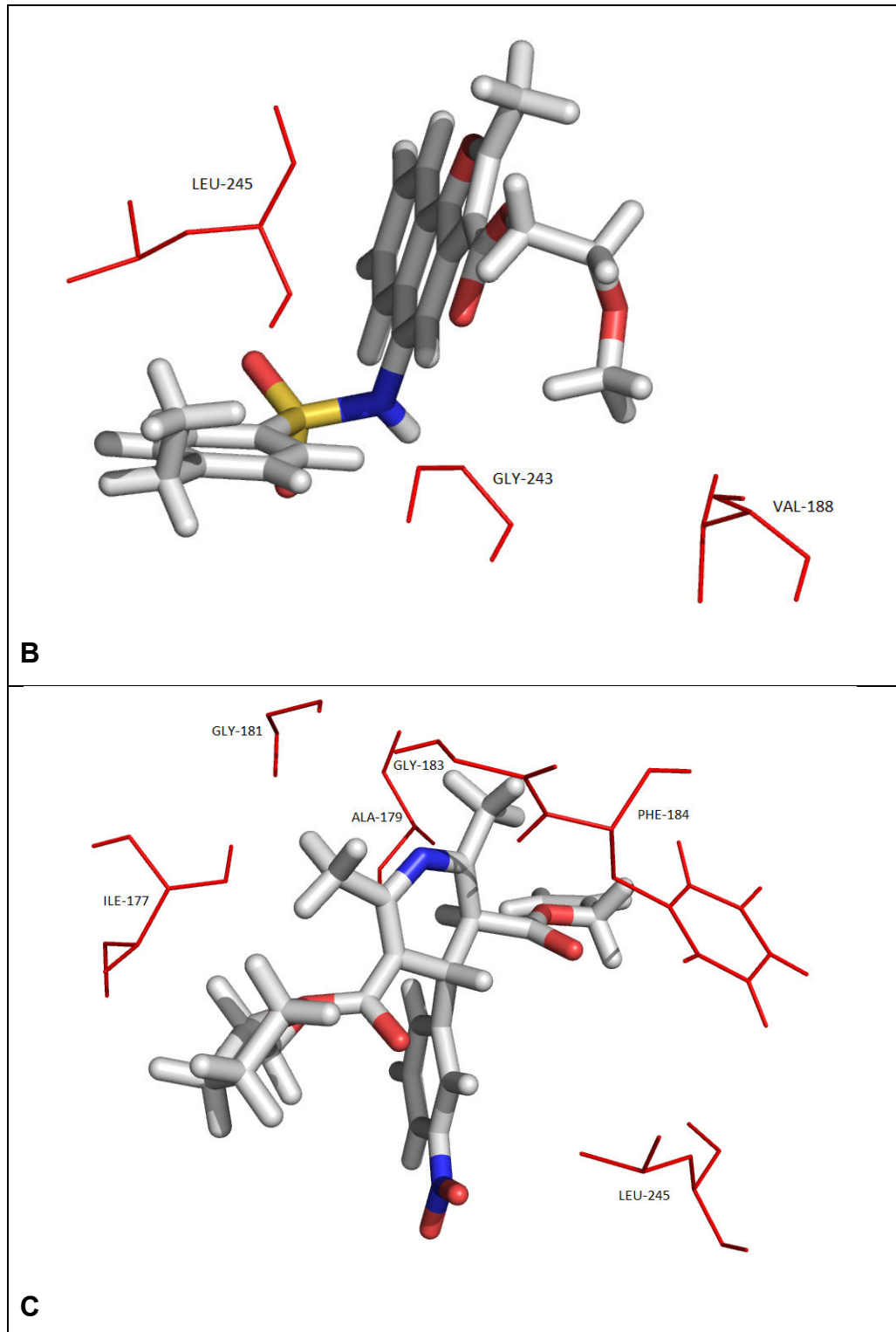
A molécula ligante de $\alpha 5\beta 1$ 1-(4-{4-[(3-bromo-4-ethoxy-5-methoxybenzyl)amino]phenyl}piperazin-1-yl)ethanone (ID do Zinc 0623995), por sua vez, ainda não possui ação comprovada, segundo o CDD, mas é um potencial antagonista de GPR55, um gene humano altamente expresso em neurônios, que codifica um receptor de canabinóides, compostos com efeitos psicotrópicos, que podem causar dependência química (Lauckner *et al.*, 2008).

4.4. Interações hidrofóbicas

As interações hidrofóbicas são interações moleculares que mantêm as regiões apolares das moléculas unidas. As partes apolares não exercem nenhuma atração relevante entre si que influencie a força das interações hidrofóbicas. Tal força é resultante de uma maior estabilidade termodinâmica que o sistema atinge quando o número de moléculas de água torna-se o mínimo necessário no envolvimento das porções hidrofóbicas das moléculas de soluto (Lehninger *et al.*, 2008).

Figura 16 – Resíduos dos receptores que formam interações hidrofóbicas com os ligantes mais favoráveis de cada integrina.





Fonte: Autora. (Elaboradas no programa Pymol). A: resíduos de $\alpha 4\beta 1$ que interagem hidrofobicamente com o melhor ligante, id Zinc 8440606. B: resíduos de $\alpha 5\beta 1$ que formam interações hidrofóbicas com a molécula de id Zinc 8438979. C: resíduos de $\alpha v\beta 1$ que interagem hidrofobicamente com o ligante de id Zinc 8439426.

Observa-se na Figura 16 os resíduos de cada receptor que interagem hidrofobicamente com o ligante. A Figura 16A, correspondente a integrina $\alpha 4\beta 1$, mostra um maior número de resíduos comparando-se às outras proteínas, totalizando 7 aminoácidos, enquanto 16B apresenta 3 resíduos e 16C, 6 resíduos.

4.5. Ligações de hidrogênio

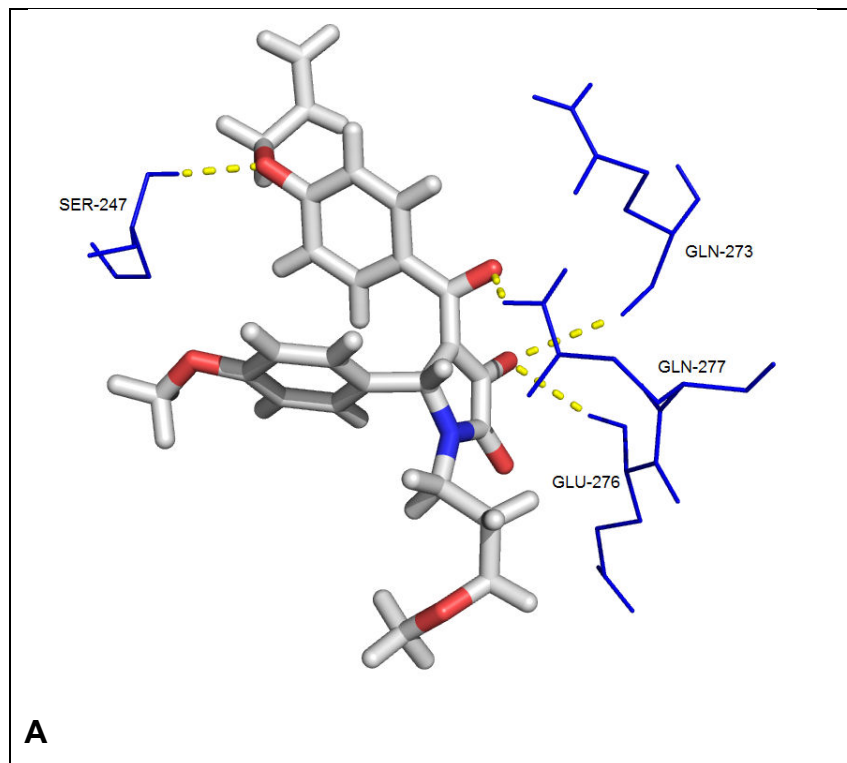
As ligações de hidrogênio são atrações eletrostáticas que ocorrem entre átomos de oxigênio e hidrogênio. São ligações fracas, sendo cerca de 10% covalentes e 90% eletrostáticas devido às sobreposições nos orbitais de ligação (Lehninger *et al.*, 2008). A presença de ligações de hidrogênio contribui para a afinidade da ligação receptor-ligante.

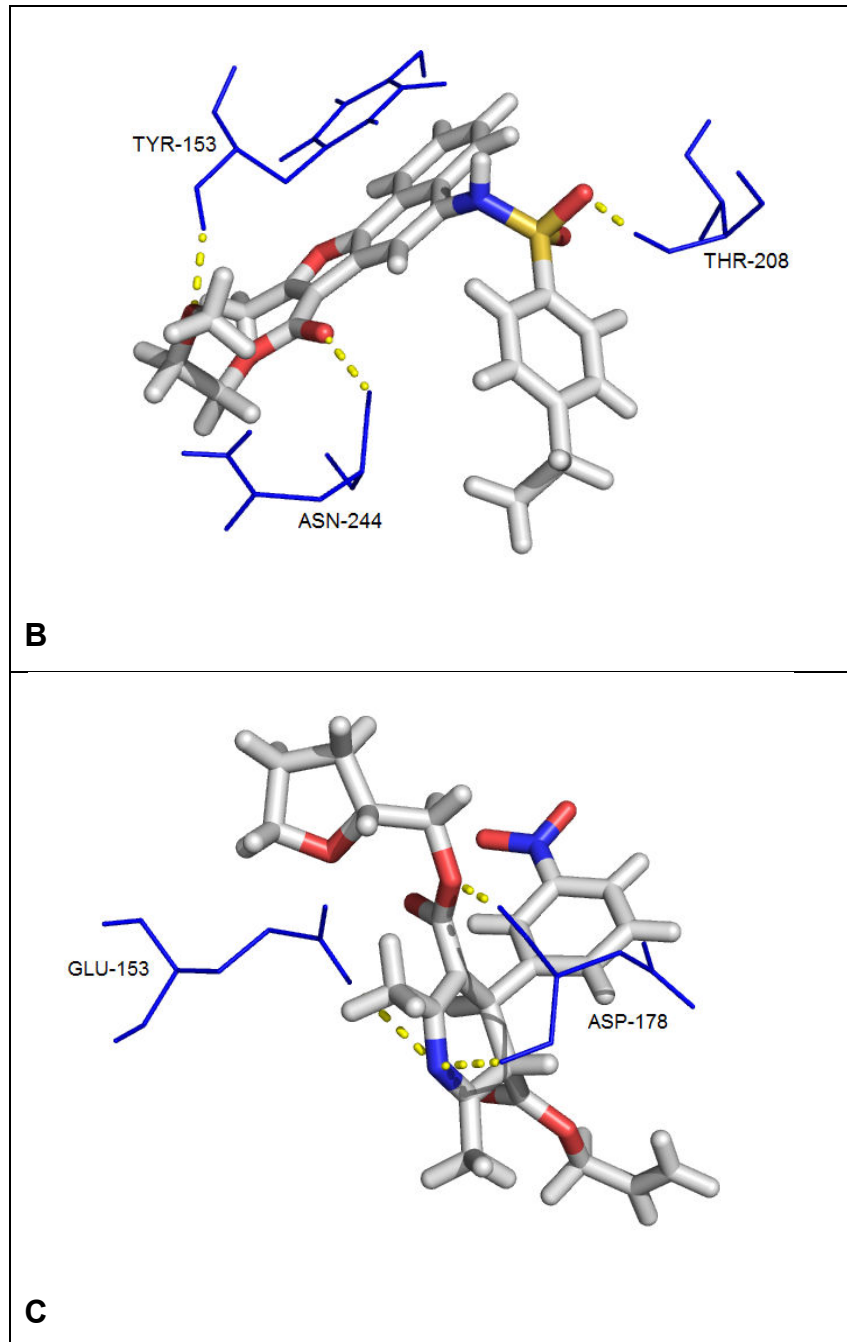
Quadro 2: Resíduos dos receptores que formam ligações de hidrogênio com os melhores ligantes de cada integrina, com especificação da cadeia.

| | $\alpha 4\beta 1$ | $\alpha 5\beta 1$ | $\alpha v\beta 1$ |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| Cadeia α | Glu-276, Gln-277, Gln-273 | | Glu-153, Asp-178 |
| Cadeia β | Ser-247 | Tyr-153, Asn-244, Thr-208 | |

Fonte: Pymol. Aminoácidos dos receptores que formam ligações de hidrogênio com seus respectivos ligantes mais favoráveis

Figura 17 – Interações de aminoácidos das integrinas que formam ligações de hidrogênio com os seus respectivos melhores ligantes.





Fonte: Autora. (Pymol). Estrutura e modo de interação dos aminoácidos que formam ligações de hidrogênio com os ligantes. A: resíduos de $\alpha 4\beta 1$ que formam ligações de hidrogênio com o melhor ligante, id Zinc 8440606. B: resíduos de $\alpha 5\beta 1$ que formam ligações de hidrogênio com a molécula de id Zinc 8438979. C: resíduos de $\alpha v\beta 1$ que interagem hidrofobicamente com o ligante de id Zinc 8439426.

Observa-se que na Figura 17B há uma interação do tipo Sanduíche entre o anel aromático da tirosina-153 e o anel do ligante. Vale ressaltar, também, que os aminoácidos da figura C são todos ácidos (Figura 17C)

Além das interações hidrofóbicas apresentadas pelos melhores ligantes, há ligações de hidrogênio que possuem relação com a afinidade receptor-ligante. O ligante 4-[4-(allyloxy)benzoyl]-3-hydroxy-5-(4-methoxyphenyl)-1-(3-methoxypropyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one (id ZINC 8440606), melhor resultado para $\alpha 4\beta 1$,

apresenta ligações de hidrogênio com ambas as cadeias da integrina. Isso se deve ao fato do ligante estar “docado” na região intercadeia, sendo um inibidor promissor, pois poderá inibir a ligação de moléculas que preferencialmente se acoplam à cadeia α ou à cadeia β .

5. Discussões

No presente trabalho, analisamos a estrutura e participação das integrinas da família $\beta 1$ em processos inflamatórios, além do desenvolvimento de novos fármacos a partir de moléculas com potencial inibitório de tais proteínas.

A metodologia adotada para a caracterização eletrostática da região de ligação foi o cálculo de Poisson-Boltzmann através do software APBS, mostrando que a região onde os ligantes preferencialmente se acoplarão é predominantemente eletronegativa, ou seja, há uma maior concentração de resíduos carregados negativamente.

Utilizamos, para o *virtual screening* e *Docking* molecular, o software Sybyl-X. As moléculas do subconjunto *Clean Lead-like* do banco de dados Zinc foram utilizadas para o *virtual screening* e *Docking* nos receptores, ou seja, nas integrinas da família $\beta 1$. Tais moléculas tiveram suas melhores poses calculadas e os melhores ligantes foram obtidos em forma de escores para cada receptor.

Observou-se que os ligantes mais favoráveis apresentavam-se próximo ao íon do domínio MIDAS, o que já era esperado, visto que o íon Ca^{2+} possui importância na estabilidade do complexo. O encaixe de um ligante nessa região, portanto, provavelmente levaria a um processo inibitório da atividade da integrina, o que necessitaria ser comprovado *in vivo*.

As metodologias *in silico* utilizadas são bastante eficazes na simulação de fenômenos biológicos, permitindo-nos economizar tempo e recursos financeiros nos estudos iniciais de uma grande quantidade de moléculas com potencial inibitório. As estratégias utilizadas foram bem executadas, porém mais tempo seria necessário para o estudo dos ligantes e posterior criação de uma nova molécula com características estruturais favoráveis a um bom inibidor. Entretanto, sabe-se que as moléculas encontradas possuem potencial inibitório devido às suas interações com os receptores, além dos altos números de escores obtidos no *Docking* que mostram que o encaixe proteína-ligante é de baixa energia, podendo ser uma ligação

favorável *in vivo*. Entretanto, simulações e testes laboratoriais seriam necessários para confirmar o modelo.

O próximo passo do nosso trabalho será a dinâmica molecular dos melhores complexos e sua inserção na membrana plasmática, a fim de mimetizar o comportamento das integrinas com seus respectivos ligantes *in vivo*. Essas simulações poderão trazer resultados que complementem aqueles obtidos no *Docking* rígido.

6. Conclusões

Apesar da similaridade entre os sítios de ligação, os ligantes apresentam modos de ligação distintos.

As moléculas selecionadas pela análise de *Docking* possuem escores altos, mostrando que são ligantes favoráveis em seus respectivos receptores. Algumas dessas moléculas possuem relação com a inibição de integrinas envolvidas no processo de replicação do *Trypanosoma cruzi* em humanos: N-{3-bromo-4-[(4-fluorobenzyl)oxy]-5-methoxybenzyl}-N-{2-[(1-methyl-1H-tetraazol-5-yl)sulfanyl]ethyl}amine (ID do Zinc: 8437906), ligante de $\alpha 4\beta 1$, 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(furan-2-ylmethyl)-3-hydroxy-4-[(5-methylfuran-2-yl)carbonyl]-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one (ID do Zinc: 0702710) e 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-4-[(5-methylfuran-2-yl)carbonyl]-1-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one (ID do Zinc 0702716) ligantes de $\alpha 5\beta 1$.

Além disso, aparentemente a maioria das moléculas listadas como ligantes possuem características hidrofóbicas, apesar de sua exposição ao solvente. Os resíduos da molécula 3-allyl 5-(tetrahydro-2-furanylmethyl) 4-{3-nitrophenyl}-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-3,5-pyridinedicarboxylate (id ZINC 8439426) que apresentam ligações de hidrogênio com a integrina $\alpha \beta 1$ são aminoácidos ácidos, ou seja, carregados negativamente, o que comumente ocorre devido à presença do íon Ca^{2+} positivamente carregado na região. A maioria dos ligantes encontrados está localizada próximo ao cátion Ca^{2+} no motivo MIDAS, além de se localizarem na região intercadeia, sendo possíveis inibidores de moléculas que se ligam preferencialmente as cadeias α ou β .

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 4th. New York: Garland Science, 2002. xxxiv, 1548 p. ISBN 0815332181 (hardbound)

CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 3, Mar 2011. ISSN 1943-0264 (Electronic).

CLEMETSON, K. J.; CLEMETSON, J. M. Integrins and cardiovascular disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 54, n. 6, p. 502-13, Jun 1998. ISSN 1420-682X (Print)

DANESE, S.; PANES, J. Development of Drugs to Target Interactions Between Leukocytes and Endothelial Cells and Treatment Algorithms for Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, Sep 16 2014. ISSN 1528-0012 (Electronic)

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biol**, v. 9, p. 71, 2011. ISSN 1741-7007 (Electronic)

FERNANDEZ, M. A.; MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. **Eur J Immunol**, v. 23, n. 2, p. 552-7, Feb 1993. ISSN 0014-2980 (Print)

GORHAM, R. D., JR.; KIESLICH, C. A.; MORIKIS, D. Electrostatic clustering and free energy calculations provide a foundation for protein design and optimization. **Ann Biomed Eng**, v. 39, n. 4, p. 1252-63, Apr 2011. ISSN 1573-9686 (Electronic)

HAS, C. et al. Integrin alpha3 mutations with kidney, lung, and skin disease. **N Engl J Med**, v. 366, n. 16, p. 1508-14, Apr 19 2012. ISSN 1533-4406 (Electronic)

HO, B. K.; THOMAS, A.; BRASSEUR, R. Revisiting the Ramachandran plot: hard-sphere repulsion, electrostatics, and H-bonding in the alpha-helix. **Protein Sci**, v. 12, n. 11, p. 2508-22, Nov 2003. ISSN 0961-8368 (Print)

HOHMAN, M. et al. Novel web-based tools combining chemistry informatics, biology and social networks for drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 14, n. 5-6, p. 261-70, Mar 2009. ISSN 1878-5832 (Electronic)

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC--a free database of commercially available compounds for *virtual screening*. **J Chem Inf Model**, v. 45, n. 1, p. 177-82, Jan-Feb 2005. ISSN 1549-9596 (Print)

KAPP, T. G. et al. Integrin modulators: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, v. 23, n. 10, p. 1273-95, Oct 2013. ISSN 1744-7674 (Electronic)

KRUGER, J. et al. Performance studies on distributed *virtual screening*. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 624024, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic).

LAUCKNER, J. E. et al. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. **PNAS**, v. 105, n. 7, p. 2699-2704, Feb 19 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th. New York: W.H. Freeman, 2008. ISBN 9780716771081

MORRIS, G. M. et al. Automated *Docking* using a Lamarckian Genetic Algorithm and an empirical binding free energy function. **J Comp Chem**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, Jun 24 1998. CCC 0192-8651.

SCHNEIDER, G. *Virtual screening: an endless staircase?* **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 4, p. 273-6, Apr 2010. ISSN 1474-1784 (Electronic)

SUTTER, J. M. et al. Automated descriptor selection for quantitative structure - activity relationships using Generalized Simulated Annealing. **J Chem Inf Comput Sci**, v. 35, n. 1, p. 77-84, 1995. ISSN 0095-2338.

TAMKUN, J. W. et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. **Cell**, v. 46, n. 2, p. 271-82, Jul 18 1986. ISSN 0092-8674 (Print)

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of *Docking* with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**, v. 31, n. 2, p. 455-61, Jan 30 2010. ISSN 1096-987X (Electronic)

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem**, v. 45, n. 12, p. 2615-23, Jun 6 2002. ISSN 0022-2623 (Print)

YANG, G. X.; HAGMANN, W. K. VLA-4 antagonists: potent inhibitors of lymphocyte migration. **Med Res Rev**, v. 23, n. 3, p. 369-92, May 2003. ISSN 0198-6325 (Print)