**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

André Luís Balico da Silva

**Desenho, síntese e caracterização funcional de análogos de
oxitocina**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

André Luís Balico da Silva

**Desenho, síntese e caracterização funcional de análogos de
oxitocina**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa-Neto

Coorientador: Dr. Diego Ângelo Duarte

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

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

Silva, André Luís Balico da

Desenho, síntese e caracterização funcional de análogos de oxitocina.
Ribeirão Preto, 2020.

70 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Costa-Neto, Claudio Miguel da.

Coorientador: Duarte, Diego Ângelo.

1. GPCR. 2. Receptor de oxitocina. 3. Sinalização intracelular. 4. Agonismo
tendencioso.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA, André Luís Balico da

Título: Desenho, síntese e caracterização funcional de análogos de oxitocina

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Bioquímica

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - Código de Financiamento 001. Sendo assim, agradeço a CAPES pela bolsa de mestrado que permitiu a execução deste projeto, bem como FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio à pesquisa oferecido ao laboratório (processo nº12/20148-0).

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, bem como ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, pela formação e infraestrutura que me foi proporcionada.

Ao meu orientador Prof. Claudio Miguel da Costa Neto pela confiança, amizade, ensinamentos e aconselhamentos. Agradeço imensamente pelas chances que tive de trabalhar sob sua orientação durante minha iniciação científica e no mestrado, assim como por todas as outras oportunidades que você me proporcionou nestes anos.

Ao meu coorientador Dr. Diego Ângelo Duarte pela amizade, discussões científicas, direcionamentos e suporte nas várias etapas de desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Eduardo Brandt de Oliveira pelos ensinamentos e supervisão durante a síntese dos peptídeos, bem como pelas discussões científicas, paciência e atenção.

Ao Prof. Marcelo Damário Gomes, Prof. José Antunes Rodrigues, Profa. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia e Prof. Eduardo Brandt de Oliveira por permitirem a utilização da infraestrutura dos seus respectivos laboratórios, bem como por toda a ajuda recebida de suas equipes.

Às técnicas Lúcia, Odete, Cacilda e Silvia pela organização do laboratório, auxílio nos experimentos e amizade.

À técnica Ana Paula Masson e ao André Luiz Brandão Bitencourt pelo suporte nas etapas analíticas desse projeto e pela amizade.

Aos funcionários da secretaria, Ronaldo, Rose e Ivone, por serem sempre tão solícitos, em especial à Ivone por me auxiliar tantas vezes com minhas dúvidas e solicitações.

A todos os demais docentes, técnicos, funcionários, alunos e ex-alunos do Departamento de Bioquímica e Imunologia que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho, em especial ao Diego Ângelo Duarte e ao Jhonatan Maraschin pela revisão criteriosa desta dissertação e pelas sugestões.

Aos companheiros de laboratório: Sarah, Diego, Lucas, Lúcia, Jhonatan, Nichelle, e Larissa pelas discussões, ensinamentos, auxílio nos experimentos, risadas e amizade, assim como pelo apoio nos momentos de frustração. Obrigado pelo apoio nos momentos de ansiedade e por tornarem a nossa rotina melhor.

À Sarah Capelupe Simões, uma grande amiga que fiz desde a iniciação científica. Obrigado pela paciência, ajuda e parceria em qualquer que fosse a ocasião.

Aos amigos do Departamento com quem compartilhei as conquistas e angústias durante esses dois anos: Virginia, Karine e Glaucia.

À minha mãe, Lúcia, meu pai, Wilian, e ao meu irmão, Anderson, por terem acreditado em mim em todos os momentos, pelo amor, carinho e apoio.

À minha noiva, Graziela, por sempre me apoiar e compartilhar tantos momentos desta trajetória, assim como o amor, a alegria, o carinho, as conquistas, e a construção de vários planos juntos.

Aos meus amigos Anne, Beatriz, Bianca, Bruno, Felipe, Guilherme, Keity, Laissa, Laura, Mayara e Rafaela por continuarem sendo uma segunda família para mim, independente da distância.

RESUMO

SILVA, André Luís Balico da. Desenho, síntese e caracterização funcional de análogos de oxitocina. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) atuam em diversos processos fisiológicos, sendo inclusive alvos terapêuticos para aproximadamente 40% dos fármacos atualmente comercializados. O receptor de oxitocina (OXTR) é ativado principalmente pelo nonapeptídeo oxitocina (OXT), o qual atua como neurotransmissor e neuromodulador, além de mediar vários outros processos no organismo. O OXTR apresenta potencial como alvo terapêutico para o tratamento de algumas doenças, porém sua aplicação é dificultada pela falta de seletividade dos ligantes, os quais também se ligam a receptores de arginina-vasopressina (AVPR), bem como pelo desenvolvimento de tolerância. Agonistas que ativam preferencialmente certas vias de sinalização, os denominados agonistas tendenciosos, assim como aqueles que ativam seletivamente ou preferencialmente o OXTR, com menor afinidade e/ou ativação dos AVPR, podem promover a superação das limitações terapêuticas descritas acima. Neste trabalho, foram sintetizados oito análogos de OXT, objetivando-se propriedades bioquímicas e farmacológicas distintas. Estes análogos foram caracterizados de forma *in vitro* quanto à afinidade, assim como quanto em relação à eficiência para ativação de proteína G_q, para recrutamento de β -arrestina2 e para o desencadeamento da internalização do receptor. Alguns dos análogos gerados ativaram preferencialmente determinadas vias de sinalização, especialmente a via de mobilização de Ca²⁺, e apresentaram maior seletividade para o OXTR. Dessa forma, nossos resultados trazem informações relevantes sobre a contribuição de diferentes resíduos da molécula de OXT para a transdução de sinal e para maior seletividade ao OXTR, as quais poderão futuramente ser utilizadas para o desenho e desenvolvimento de fármacos mais seletivos e/ou efetivos.

Palavras-chave: GPCR. Receptor de oxitocina. Sinalização intracelular. Agonismo tendencioso.

ABSTRACT

SILVA, André Luís Balico da. Design, synthesis and functional characterization of oxytocin analogs. 2020. Master's thesis (Master of Science) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

G protein-coupled receptors (GPCRs) regulate a wide range of physiological processes, and are therapeutic targets for approximately 40% of the drugs currently commercialized. The oxytocin receptor (OXTR) is activated mainly by the nonapeptide oxytocin (OXT), which acts as a neurotransmitter and neuromodulator, as well as modulates several other processes in the body. OXTR has the potential to be a therapeutic target for treatment of several diseases, however its application is limited by the lack of ligand selectivity, as ligands also bind to arginine-vasopressin receptors (AVPR), as well as by tolerance development. Agonists that preferentially activate certain signaling pathways, the so-called biased agonists, as well as those that selectively or preferentially activate the OXTR, with lower affinity and/or activation of the AVPR, may allow to overcome the therapeutic limitations mentioned above. In this study, eight OXT analogs were synthesized, aiming distinct biochemical and pharmacological properties. These analogs were characterized *in vitro* for affinity for the receptor, efficiency to trigger G_q protein activation, β-arrestin2 recruitment, and receptor internalization. Some of the generated analogs, preferentially, activated certain signaling pathways, especially the Ca²⁺ mobilization pathway, and presented greater selectivity for OXTR. Therefore, our results provide relevant information on the contribution of different residues in the OXT molecule for signal transduction and improved selectivity for OXTR, which can be used in the future for the development of more selective and/or effective drugs.

Keywords: GPCR. Oxytocin receptor. Intracellular signaling. Biased agonism.

LISTA DE ABREVIATURAS

7TM - Sete hélices transmembranares

Akt - Proteína quinase B

AVP - Arginina-vasopressina / vasopressina

AVPR - Receptor de vasopressina

BRET - Transferência de energia por ressonância de bioluminescência

Ca²⁺ - Cálcio

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

DAG - 1,2-diacilglicerol

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

EC - Extracelular

EC₅₀ - Concentração de agonista na qual se obtém 50% da ativação máxima

EGFP – Proteína verde fluorescente melhorada

EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal

E_{máx} - Resposta máxima

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

Fmoc - 9-fluorenilmetoxycarbonilo

GDP - Guanosina difosfato

GPCR - Receptor acoplado à proteína G

GRK - Quinase de receptores acoplados à proteína G

GTP - Guanosina trifosfato

HEK293T – Rim embrionário humano 293T

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

IC - Intracelular

IC₅₀ - Concentração de ligante na qual se obtém 50% de inibição da resposta máxima inicial

IP3 - Inositol-1,4,5-trifosfato

JNK - c-Jun N-terminal quinase

K_d - Constante de dissociação

K_i - Constante de inibição

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

OXT - Oxitocina

p38a - Quinase ativada por mitógeno p38

PBS – Tampão fosfato-salino

PEI - Polietilenimina

PIP₂ - Fosfatidil 4,5-bisfosfato

PKA - Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

rGFP - Proteína verde fluorescente de *Renilla reniformis*

RlucII - Renilla luciferase de *Renilla reniformis*

Pro - Prolina

Sar - Sarcosina

SNC - Sistema nervoso central

SFB - Soro fetal bovino

TM - Transmembrana

Thr - Treonina

Val - Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Receptores acoplados à proteína G (GPCRs)	11
1.2	Agonismo tendencioso	15
1.3	Receptor de oxitocina (OXTR)	16
1.4	Receptores de arginina-vasopressina (AVPRs)	20
1.5	OXTR como alvo terapêutico	21
2	OBJETIVO GERAL	24
2.1	Objetivos específicos	24
3	METODOLOGIA	26
3.1	Desenho dos análogos de OXT	26
3.2	Síntese química em fase sólida	27
3.3	Cultura e transfecção de células HEK293T	29
3.4	Ensaio de <i>binding</i> com células inteiras	29
3.5	Ensaio de mobilização de Ca^{2+} intracelular	31
3.6	Ensaio funcional utilizando a metodologia de BRET	32
3.6.1	Análise do recrutamento de β -arrestina2 por BRET	32
3.6.2	Análise da internalização do receptor de OXT por BRET	33
3.7	Cálculo do fator de tendência (do Inglês, <i>bias factor</i>)	34
4	RESULTADOS	37
4.1	Desenho, síntese, purificação e caracterização química dos análogos de oxitocina	37
4.2	Afinidade dos análogos de oxitocina pelo OXTR	37
4.3	Mobilização de Ca^{2+} intracelular mediada pelo OXTR após estímulo com os diferentes análogos	40
4.4	Recrutamento de β -arrestina2 pelo OXTR	41
4.5	Internalização do receptor de OXT	45
4.6	Análise da seletividade dos análogos pelo OXTR em relação ao AVPR1a na mobilização de Ca^{2+} intracelular	48
4.7	Fatores de tendência calculados	52
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS	64

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Receptores acoplados à proteína G (GPCRs)

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), também conhecidos como receptores de sete domínios transmembranares (7TMRs), são caracterizados por possuírem domínios alfa-helicoidais que atravessam a membrana sete vezes (TMs 1 a 7), os quais estão interligados por três alças extracelulares (EC-1, EC-2 e EC-3) e três intracelulares (IC-1, IC-2 e IC-3), sendo a porção N-terminal voltada para a região extracelular e a C-Terminal para a região intracelular (Fig. 1). Na membrana celular, as regiões helicoidais e transmembranares do receptor encontram-se agrupadas na forma de um feixe (ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009).

Figura 1. GPCR esquematizado na membrana plasmática em forma de serpentina.
Adaptado de Weis & Kobilka (2018).

Os GPCRs constituem a maior família de receptores de superfície celular, sendo encontrados mais de 800 tipos no código genético humano (WISE; JUPE; REES, 2004). Estes interagem com diferentes tipos de ligantes, incluindo íons, aminas biogênicas, neurotransmissores peptídicos e não peptídicos, fatores de crescimento e lipídeos, podendo inclusive serem ativados por fótons (ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009; CHEN; JIN; ZHOU, 2012; KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013; GUREVICH; GUREVICH, 2018). A ativação de GPCRs medeia uma diversidade de processos fisiológicos, incluindo olfato, visão, cognição, percepção da dor, secreção exócrina e endócrina, metabolismo, inflamação, imunidade, controle cardíaco e neurotransmissão (SEACHRIST; FERGUSON, 2003). Além disso, a importância da superfamília de GPCRs também pode ser evidenciada pelo fato desta ser alvo de cerca de 40% dos medicamentos comercializados atualmente, os quais funcionam bloqueando ou modulando vias de sinalização (HAUSER et al., 2017).

Os GPCRs de vertebrados podem ser classificados em cinco famílias principais: tipo rodopsina (família A), tipo secretina (família B), glutamato (família C), adesão e “*frizzled–taste*” (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013), sendo a família das rodopsinas a mais diversificada entre estas. Os GPCRs são caracterizados por motivos de sequências conservadas que contribuirão para que os receptores possuam estruturas e mecanismos de ativação semelhantes. Entretanto, apesar destas características em comum, cada receptor apresenta características únicas de estrutura, ativação e transdução de sinal, envolvendo o acoplamento a diferentes subtipos de proteína G, β -arrestinas, bem como vias de sinalização dependentes de outras proteínas reguladoras (ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009).

A proteína G, uma proteína heterotrimérica composta das subunidades α , β e γ , participa da sinalização chamada canônica mediada pelos GPCRs, sendo encontrada ancorada na face citoplasmática da membrana celular. Uma molécula de guanosina difosfato (GDP) está ligada a subunidade α da proteína G quando o receptor está inativo e, mediante a ativação deste último ativação e sua consequente mudança conformacional, o receptor interage com a proteína G de forma que sua subunidade α troque GDP por guanosina trifosfato (GTP). Essa substituição ativa a subunidade α que se separa das subunidades β e γ , interagindo então com proteínas efetoras intracelulares. A reassociação das três subunidades e o retorno ao estado inativo ocorre após a subunidade α da proteína G hidrolisar o GTP à GDP (MORRIS; MALBON, 1999; MAUDSLEY; MARTIN; LUTTRELL, 2005; WEIS; KOBILKA, 2018).

As proteínas G são classificadas de acordo com a sua subunidade α . Sendo assim, existem quatro classes principais de proteína G: G_s , G_i , $G_{12/13}$, G_q (MCCUDDEN et al., 2005). As proteínas G_s ativam adenilato ciclase que catalisa a formação de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), o qual leva à ativação da proteína quinase A (PKA), que por sua vez fosforila diversas proteínas-alvo. As proteínas G_i atuam inibindo a adenilato ciclase, diminuindo os níveis de cAMP, assim como também podem desempenhar papel na ativação de canais de potássio e na inibição de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem. Proteínas $G_{12/13}$ medeiam o estímulo da GTPase pequena do tipo Rho, enquanto as proteínas G_q são capazes de ativar a fosfolipase C- β que hidrolisa fosfatidil 4,5-bisfosfato (PIP_2), um fosfolípido de membrana, processo que gera, por sua vez, segundos mensageiros chamados inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) e 1,2-diacylglicerol (DAG). O IP_3 se liga a receptores de IP_3 no retículo endoplasmático

promovendo a liberação de Ca^{2+} e, conseqüentemente, o aumento de sua concentração citosólica. Já o DAG, em conjunto com Ca^{2+} , atua na ativação da proteína quinase C (PKC), a qual fosforila diversas proteínas-alvo (OLDHAM; HAMM, 2008).

Os possíveis efeitos deletérios de uma sinalização sustentada devido ao acoplamento sequencial a múltiplas proteínas G são evitados por mecanismos de dessensibilização que surgiram ao longo do processo evolutivo, os quais cessam a sinalização dependente de proteína G (BENOVIC et al., 1989; SHUKLA; XIAO; LEFKOWITZ, 2011). A dessensibilização de GPCRs ocorre por um processo de duas etapas em que, primeiramente, certos sítios na região C-terminal do receptor e nas alças intracelulares são fosforilados por quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs), assim como pela PKC. Em uma segunda etapa, proteínas denominadas arrestinas são recrutadas para o receptor fosforilado, interagindo então com este de forma a impedir estericamente o acoplamento da proteína G com o receptor. Desta forma, a ativação de proteínas G é impedida e as arrestinas medeiam a formação de vesículas de internalização desses receptores (LEFKOWITZ, 1998). Além do papel das β -arrestinas na dessensibilização e internalização do receptor, estas também podem mediar a sinalização de GPCRs de maneira independente de proteínas G por meio da interação com proteínas como c-Src, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína quinase B (AKT) (SHUKLA; XIAO; LEFKOWITZ, 2011).

1.2 Agonismo tendencioso

Considerando que GPCRs podem sinalizar de forma independente de proteína G, utilizando-se da via de β -arrestinas, juntamente com a descrição de ligantes capazes de estabilizar o receptor em conformações ativas intermediárias, as quais modulam a ativação de uma via de sinalização em detrimento de outra, foi proposto o fenômeno do agonismo tendencioso, do inglês *biased agonism*, também conhecido como seletividade funcional (para revisão, ver: PUPO et al., 2016; SMITH; LEFKOWITZ; RAJAGOPAL, 2018). Considerando sua seletividade funcional para certas vias de sinalização, os agonistas tendenciosos apresentam potencial para a aplicação terapêutica (WHALEN; RAJAGOPAL; LEFKOWITZ, 2011), já que a sua capacidade em ativar uma via de sinalização benéfica ao organismo e impedir a ativação de uma via deletéria pode reduzir possíveis efeitos adversos (VIOLIN et al., 2014).

Há pelos menos 7 agonistas tendenciosos em fases pré-clínicas e clínicas de estudo atualmente. Como exemplo, o TRV130, está em fase final de testes e é voltado para o tratamento de dor aguda grave. Este agonista é capaz de ativar seletivamente a via de proteína G por meio do receptor μ -opioide, produzindo maior analgesia e efeitos adversos reduzidos quando comparado à morfina (SIUDA et al., 2017; FOSSLER et al., 2018). Já os agonistas UNC9975 e UNC9994 são ligantes do receptor de dopamina 2 (D2R) tendenciosos para via de β -arrestinas, sendo voltados para o tratamento de esquizofrenia e transtornos do humor (ALLEN et al., 2011). Ademais, há agonistas tendenciosos descritos e em desenvolvimento para os receptores κ -opioide (BRUST et al., 2016), δ -

opioide (CROMBIE et al., 2015), β 1-adrenérgico e β 2-adrenérgico (WANG et al., 2017)

1.3 Receptor de oxitocina (OXTR)

O receptor de oxitocina (OXTR) é um GPCR da família A, cuja ativação se dá principalmente por meio da ligação do neurohormônio oxitocina (OXT), e que é expresso no sistema nervoso central (SNC) e em diversos tecidos periféricos, incluindo útero, glândulas mamárias, coração e rins (FREEMAN et al., 2014; JUREK; NEUMANN, 2018). A OXT (Fig. 2) é um peptídeo de nove aminoácidos (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂) que possui estrutura em anel, devido à ligação dissulfeto que liga os resíduos 1 e 6 da sequência peptídica, e um grupo amida em sua porção C-terminal, gerada a partir da hidrólise de seu precursor (OXT-Gly-Lys-Arg-neuropsina I). A OXT é sintetizada principalmente em neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico e paraventricular do hipotálamo e liberado a partir da neurohipófise e de nervos terminais em resposta a determinados estímulos. No cérebro, a OXT pode atuar como neurotransmissor e neuromodulador, enquanto que na corrente sanguínea o peptídeo influencia diversos aspectos fisiológicos do organismo (VIERO et al., 2010; BAKERMANS-KRANENBURG; VAN IJZENDOORN, 2013;

MUTTENTHALER et al., 2017). A OXT atua periféricamente promovendo contração da musculatura lisa do útero durante o parto, secreção de leite durante a lactação, ejaculação e na modulação da dor (NISHIMORI et al., 1996; GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; DE ARAUJO et al., 2014). Enquanto isso, seu papel no SNC está associado a múltiplos comportamentos, como estresse, ansiedade, cuidado maternal e paternal, criação de laços afetivos, interação social, entre outros (DONALDSON; YOUNG, 2008; NEUMANN, 2008, 2009; VEENEMA; NEUMANN, 2008; NEUMANN; LANDGRAF, 2012).

Figura 2. Representação esquemática da molécula de oxitocina. Os resíduos estão representados utilizando o código de uma letra e numerados a partir da porção N-terminal. Está indicada a ligação dissulfeto entre os resíduos 1 e 6 (-S-S-) e a amidação no resíduo 9. Adaptado de Muttenthaler et al., (2017).

Mediante a ligação ao receptor, a cauda da OXT interage com as regiões extracelulares do receptor, enquanto a interação da porção cíclica envolve as regiões transmembranares, especialmente resíduos localizados nas TMs 5 e 6 (FRANTZ et al., 2010; BUSNELLI et al., 2016). A partir disso, o receptor OXTR pode ativar as proteínas G_q ou G_i (Fig. 3). Apesar de ser necessário concentrações 10 vezes mais altas de OXT para ativação de vias associadas a proteína G_i em comparação com a sinalização de G_q (BUSNELLI et al., 2012), G_i

atua inibindo a proliferação celular e exerce efeito antagônico na excitabilidade da membrana, tendo papel ainda na diferenciação neuronal durante o desenvolvimento inicial, sendo expressa de forma heterogênea no sistema nervoso central (SNC) (GARIBAY et al., 1991; BUSNELLI et al., 2012; NISHIZATO et al., 2017). Já a proteína G_q é o principal subtipo ativado pelo OXTR em ensaios *in vitro* com células HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293T superexpressando o receptor e as subunidades de proteína G (PARREIRAS-E-SILVA et al., 2017). A proteína G_q é expressa de forma ubíqua em todos os tecidos, sendo particularmente abundante no SNC, local no qual a proteína G_q sobrepõem-se inclusive à distribuição de OXTR em regiões associadas com memória e emoções (GRINEVICH et al., 2016).

Figura 3. Sinalização de proteína G_q e G_i após a ativação do receptor OXTR em tecido neuronal e células do hipotálamo. A ativação de proteína G_i leva à inibição do influxo de íons e consequentemente da despolarização, enquanto a ativação G_q resulta na produção de

segundos mensageiros, ativação de MAPK, liberação de oxitocina e na despolarização da membrana celular. Adaptado de: Gulliver *et al.*, 2019.

Conforme descrito anteriormente, a ativação de proteína G_q aumenta os níveis de IP_3 , DAG e de Ca^{2+} intracelular com subsequente ativação de quinases citosólicas, sendo a cascata de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), que inclui ERK 1/2, p38, JNK, e ERK5, uma das mais importantes vias ativadas por OXTR, estando envolvida, por exemplo, no cuidado maternal e na sociabilidade (SATO et al., 2011; BUSNELLI; CHINI, 2017). O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular tem ainda papel importante na excitabilidade de células nervosas, na modulação de disparos, na liberação de neurotransmissores e no controle do influxo de cálcio por meio de canais dependentes de voltagem e acoplados à receptores (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001). Adicionalmente, este receptor leva a produção de óxido nítrico (NO), que regula diversos processos e funções biológicas, e a transativação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) (BUSNELLI; CHINI, 2017).

Assim como acontece na maioria dos GPCRs, o OXTR também sofre rápida dessensibilização, o que ocorre de 5 a 10min, após a ligação da OXT (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001). Desta forma, após a ativação e a fosforilação por GRKs e PKC, o OXTR recruta então β -arrestina1 e/ou β -arrestina2, havendo uma maior potência para o recrutamento desta última, conforme demonstrado por Busnelli e colaboradores (2012). Ademais, o OXTR pode ser também internalizado por outros mecanismos independentes de β -arrestinas, no qual outras proteínas adaptadoras, como a própria GRK, podem interagir diretamente com a clatrina (WOLFE; TREJO, 2007; PASSONI et al., 2016).

1.4 Receptores de arginina-vasopressina (AVPRs)

O OXTR é estruturalmente relacionado (identidade: ~80%) aos receptores de arginina-vasopressina (AVPR1a, AVPR1b e V2R), pois, surgiram a partir de um ancestral comum durante o processo evolutivo (KIMURA et al., 1994; BUSNELLI; CHINI, 2017). A vasopressina (AVP), principal ligante dos AVPRs, tem atuação periférica no controle da absorção de água e da pressão sanguínea e, centralmente, está relacionada à memória, aprendizado, agressão, estresse e ansiedade (ENGELMANN, 2008; HOLMES; LANDRY; GRANTON, 2003, 2004), sendo o AVPR1a o principal receptor por meio do qual a AVP atua sobre o cuidado parental, sociabilidade e outros aspectos comportamentais (WANG; FERRIS; DE VRIES, 1994; CARTER et al., 2008; DONALDSON; YOUNG, 2008; MEYER-LINDENBERG et al., 2011; KOSHIMIZU et al., 2012).

AVPR1a e AVPR1b ativam principalmente a proteína G_q , o que resulta na ativação de fosfolipase C- β e na mobilização de Ca^{2+} , conforme descrito anteriormente, enquanto o receptor V2R atua majoritariamente pelo estímulo da adenilato ciclase e da geração de cAMP através da ativação de G_s (BARBERIS; MOUILLAC; DURROUX, 1998).

A AVP (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂) é estruturalmente similar à OXT, diferindo apenas nos resíduos 3 e 8. Esta similaridade aliada a identidade entre o OXTR e os AVPRs permite o *cross-talk* entre os dois sistemas, sendo a OXT capaz de ativar os AVPRs e a AVP capaz de ativar o OXTR (CHINI et al., 1996; ŚLUSARZ; SIKORSKA; ŚLUSARZ, 2013). Desta forma, pode-se

considerar que a especificidade funcional destes receptores não é decorrente da seletividade do ligante, mas devida a variações na abundância de receptores, a liberação regulada dos peptídeos, da formação de oligômeros de receptores, assim como pela degradação dos ligantes (MITCHELL; FANG; WONG, 1998).

Tal *cross-talk*, assim como a distribuição sobreposta de AVPRs e OXTRs nos tecidos, constituem uma das maiores problemáticas no desenvolvimento de fármacos que atuem sobre estes receptores (CHINI; MANNING; GUILLON, 2008; MANNING et al., 2008).

1.5 OXTR como alvo terapêutico

O OXTR tem se mostrado um alvo com elevado potencial para tratamento de diversas condições, como câncer, dor, distúrbios cardiovasculares e reprodutivos, além de outros transtornos neuropsiquiátricos, como autismo, fobia, estresse pós-traumático, esquizofrenia, depressão e ansiedade (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; DONALDSON; YOUNG, 2008; W. GRUBER; MUTTENTHALER; FREISSMUTH, 2010; MEYER-LINDENBERG et al., 2011; MATSUZAKI et al., 2012; JUREK; NEUMANN, 2018). Também existem estudos que demonstram o potencial do uso de OXT para tratamento da dependência de drogas (MCGREGOR; BOWEN, 2012; LEE et al., 2016) e de melhoria de certas condições relacionadas à síndrome de Prader-Willi, como a alimentação e sociabilidade (TAUBER et al., 2017). Ademais, a OXT já é amplamente utilizada para indução e progressão do trabalho de parto.

Conforme mencionado anteriormente, um dos obstáculos no desenvolvimento terapêutico envolvendo OXT está na não-seletividade de tal ligante, já que o mesmo atua como agonista parcial em AVPRs, ocasionado efeitos indesejados no organismo (MANNING et al., 2012; YANG et al., 2014). Além disso, resultados obtidos com certos compostos testados em roedores muitas vezes não são reproduzidos em ensaios com humanos. Por exemplo, análogos como atosiban, TGOT e carbetocina possuem alta afinidade para OXTR de ratos, mas não de humanos (REVERSI et al., 2005; CHINI; MANNING, 2007; MANNING et al., 2008, 2012; BUSNELLI et al., 2012, 2013).

No intuito de superar tais limitações, agonistas peptídicos e moléculas pequenas com maior seletividade, estabilidade, eficácia, entre outras características interessantes, estão em desenvolvimento (BEARD et al., 2018; FRANTZ et al., 2018; GULLIVER et al., 2019). Concomitantemente, o maior entendimento da neurobiologia da sinalização de OXT e da dimerização de receptores, em conjunto com a capacidade de criar agonistas tendenciosos, poderão contribuir para o desenho de novos ligantes de OXTR que sejam promissores no âmbito terapêutico (PASSONI et al., 2016; GULLIVER et al., 2019). A exploração do agonismo tendencioso se mostra oportuna para o OXTR, visando a obtenção de agonistas que desencadeiam menos tolerância e dessensibilização do receptor, fatores que constituem barreiras no uso terapêutico da OXT (WISLER et al., 2014; GULLIVER et al., 2019). Adicionalmente, moléculas que ativem preferencialmente certas subunidades de proteína G em detrimento de outras podem tornar-se medicamentos promissores para, por exemplo, tratamento de certos tumores, assim como ferramentas para

entender o papel de cada via de sinalização numa dada condição (BUSNELLI et al., 2012).

Objetivos

2 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar bioquímica e farmacologicamente análogos de OXT para identificação de moléculas com possíveis ações agonísticas tendenciosas ou antagonísticas para o receptor OXTR.

2.1 Objetivos específicos

- Realizar o desenho e síntese de análogos de OXT;
- Avaliar a afinidade dos análogos pelo OXTR e estudar os resíduos de OXT envolvidos na determinação da afinidade pelo receptor, na atividade funcional e na seletividade pelo OXTR;
- Estudar a ativação da proteína G_q , recrutamento de β -arrestina2, e a internalização do receptor após o estímulo com os análogos desenvolvidos;
- Analisar quantitativamente o agonismo tendencioso por meio do cálculo do fator de tendência (*biased factor*) dos análogos testados.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho dos análogos de OXT

Para o desenho racional de análogos de OXT com potencial agonismo tendencioso e/ou maior seletividade para o OXTR, foi realizada previamente uma busca na literatura de características do peptídeo que estão relacionados a determinadas consequências farmacológicas. Dessa forma, foram desenhados análogos que possuem certos resíduos de aminoácidos substituídos e/ou inseridos na sequência peptídica, assim como combinações de modificações (ver Tabela 1, Resultados, 4.1).

As variantes de oxitocina Pro⁸-OXT e Val³Pro⁸-OXT são encontradas em macacos do Novo Mundo, sendo descritas por nosso grupo de pesquisa como peptídeos com menor eficiência para o recrutamento de β -arrestinas, o que mostrou-se relacionado ao maior cuidado parental observado em testes realizados com ratos (PARREIRAS-E-SILVA et al., 2017). Desta forma, no presente estudo, tais modificações nas posições 3 e 8 foram combinadas com outras alterações igualmente interessantes descritas na literatura. Levando-se em consideração o papel do resíduo Sar (sarcosina) no aumento da afinidade de agonistas tendenciosos da via de β -arrestinas descritos para o receptor AT1, como o SII (Sar¹Ile⁴Ile⁸-AngII) (WEI et al., 2003) e o TRV027 (Sar¹D-Ala⁸-AngII) (VIOLIN et al., 2010), o resíduo Sar foi adicionado à posição 0 do peptídeo. Já o emprego de Thr na posição 4 baseou-se no aumento da atividade oxítocítica e afinidade descritos na literatura (MANNING; SAWYER, 1970; SAWYER;

MANNING, 1973; BUSNELLI et al., 2012). Por fim, também foi modificado o C-terminal para avaliar possíveis aumentos da seletividade para OXTR em detrimento do AVPR1a, conforme descrito por Muttenthaler e colaboradores (2017).

3.2 Síntese química em fase sólida

A síntese dos peptídeos análogos de OXT foi realizada sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira (Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP/USP) e por meio do método de síntese química em fase sólida (MERRIFIELD, 1963; FIELDS; NOBLE, 2009), utilizando a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil). A síntese foi iniciada com a resina Rink-Fmoc, para os peptídeos contendo o grupo amida na porção C-terminal, e resina Wang-Fmoc-AA para aqueles sem amidação em tal porção, sendo AA o aminoácido C-terminal do peptídeo. Posteriormente, foi feito o desbloqueio da resina Rink ou do primeiro aminoácido da resina Wang com solução de piperidina 20%, solução de DBU/piperidina e irradiação por micro-ondas. O desbloqueio foi avaliado quanto a eficiência utilizando-se o teste de TNBS (Ácido 2,4,6-Trinitrobenceno sulfônico), e p-2-cloroanil no caso do desbloqueio da prolina. Os aminoácidos subsequentes bloqueados com Fmoc (Fmoc-AA) foram adicionados em excesso depois do desbloqueio do aminoácido anterior. Para tanto, o aminoácido a ser adicionado era dissolvido em DMSO/NMP (dimetilsulfóxido/N-metil pirrolidona), acrescido de HOBt/HBTU (N-hidroxibenzotriazol/ hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-ila)-1,1,3,3-tetrametilurônio) 0,45M para ativação, e agitado por

aproximadamente 2 min. A mistura era transferida para o reator no qual adicionava-se DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) 1,2M para acoplamento, sendo então aplicados 6 pulsos de micro-ondas de 2 min.. Para o acoplamento de certos aminoácidos dissolvidos em DMSO/NMP, utilizou-se HOBt e, após agitação manual, adicionou-se DIC (1,3-diisopropilcarbodiimida) seguido de 6 pulsos de micro-ondas de 2 min.

Após a lavagem da resina com metanol, secagem e tratamento com 1mL de 90% de TFA (ácido trifluoroacético), 4% de H₂O, 4% de TIS (trialquil silano) e 2% de DTT (ditiotreitól) por 2h sob agitação, foi obtido o peptídeo clivado. A solução do peptídeo foi coletada e filtrada em coluna de 1mL com filtro poroso e precipitada com três lavagens com éter. A cada lavagem o éter era removido após centrifugação a 500rpm, 0°C por 5 min. O material precipitado foi seco ao ar e, em seguida, dissolvido em 25mL de solução de pH:8 contendo 70% de H₂O, 25% de acetonitrila e 5% de DMSO, e então submetido à agitação magnética forte por ao menos 24h para oxidação das cisteínas. A eficiência da reação de oxidação foi verificada utilizando-se ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) e fosfato de potássio (0,5M, pH: 7,5).

Posteriormente, os peptídeos foram concentrados utilizando uma coluna C18 e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também com uma coluna C18. As corridas de HPLC foram feitas com um fluxo de 0.5mL/min em um gradiente de concentração de acetonitrila de 20-60% (v/v) em 0.1% (v/v) de TFA (ácido trifluoroacético), sendo as leituras efetuadas à 215nm. Os peptídeos então foram secos utilizando-se vácuo e dissolvidos em DMSO.

Por fim, os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massas (MS), sendo esta última realizada no laboratório do Prof. Dr. Vitor Maciel Faça

(Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP/USP) pela técnica responsável Ana Paula Masson.

3.3 Cultura e transfecção de células HEK293T

As células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100µM e mantidas a 37°C e 5% de CO₂.

A transfecção transiente das células HEK293T com os receptores humanos de OXT e AVP1a, assim como com os vetores necessários para cada ensaio, foi realizada utilizando-se PEI 25KDa (Polysciences, PA, EUA) como agente transfectante na razão de 3:1 PEI/DNA, sendo a quantidade total de DNA transfectado em cada placa completada com DNA de espermatozoides de salmão. As células foram transfectadas em suspensão e, em seguida, distribuídas diretamente em placas tratadas com poli-D-lisina (0,1mg/mL) (MP Biomedicals, CA, EUA) em PBS específicas para cada tipo de ensaio. As células foram mantidas em cultura e os experimentos foram realizados 48h após a transfecção.

3.4 Ensaios de *binding* com células inteiras

Um total de 8×10^6 de células HEK293T transfectadas com 10µg de DNA total, sendo 5µg correspondentes ao vetor que codifica o receptor OXT, foram

transferidas para placas de 24 poços em uma densidade de 2×10^5 células/poço. Após 48h as células foram lavadas com tampão de lavagem gelado (Tris-HCl 25mM, pH 7,4, NaCl 140mM, MgCl₂ 5mM, 0,1% de albumina de soro bovino).

Os experimentos foram realizados em tampão de *binding* gelado [Tris-HCl 25mM, pH 7,4, contendo MgCl₂ 5mM, albumina de soro bovino 0,1% (p/v), e bacitracina (Sigma, MO, EUA) numa concentração final de 100µg/mL], e iniciados com a adição de OXT triciada ([³H]-OXT; American Radiolabeled Chemicals, MO, EUA) na concentração final de 0,3nM, de acordo com padronização realizada, e diferentes concentrações de ligante frio (OXT, AVP ou análogos), em um volume final de reação de 525µL. Após a adição do ligante marcado (diluído no tampão de *binding*), as placas foram deixadas por pelo menos 16h a 4°C. Após a incubação os poços foram lavados duas vezes com tampão de lavagem gelado e em cada poço foi adicionado 200µL de tampão de lise (ureia 48%, detergente NONIDET P-40 2%, preparado em ácido acético 3M). Um volume de 180µL do lisado celular foram transferidos para tubos de cintilação e em seguida, 3mL de líquido de cintilação (UltimaGold™, PerkinElmer, MA, EUA) foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram agitados vigorosamente e a contagem da radiação foi realizada em contador de radiação β (TRI-CARB 4810TR Liquid Scintillation Counter; PerkinElmer, MA, EUA).

Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima de OXT radioativa e por meio de cálculos de regressão não-linear realizados com o software GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, EUA). Foram calculados também os valores de IC₅₀ (concentração de ligante na qual se obtém 50% de inibição da resposta máxima), e os valores de K_i (constante de inibição) utilizando-se a equação de Cheng-Prusoff (Equação 1):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left[1 + \left(\frac{[Radioligante]}{K_D}\right)\right]}$$

Equação 1. Equação de Cheng-Prusoff para o cálculo do K_i .

3.5 Ensaios de mobilização de Ca^{2+} intracelular

Com o intuito de avaliar a ativação da via de sinalização de proteína G_q , analisamos a mobilização de Ca^{2+} , a qual é uma resposta decorrente de tal ativação de proteína G_q . Um total de $3,84 \times 10^6$ de células HEK293T transfectadas com 8µg de DNA total, sendo 4µg correspondentes aos vetores que codificam os receptores OXT e AVP1a, foram semeadas em placas de 96 poços com paredes pretas e fundo transparente (Corning, NY, EUA), na densidade de 4×10^4 células por poço. Após 48h da transfecção, as células foram incubadas por 2h a 37°C com 50µL do indicador fluorescente (FLIPR® Calcium 6 Assay Kit; Molecular Devices, CA, EUA) e 50µL de DMEM. Em seguida, as placas foram inseridas no leitor de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices) e iniciou-se a mensuração de fluorescência após a excitação a 485nm e emissão a 525nm. As leituras foram feitas durante 90 segundos (uma leitura a cada 2 segundos) e 25µL dos ligantes em diferentes concentrações foram injetados automaticamente pelo equipamento no tempo de 16 segundos. A área sob a curva correspondente a cada concentração de cada ligante foi calculada e os dados obtidos foram representados na forma de curvas concentração-resposta normalizadas como porcentagem da resposta máxima induzida pela OXT e AVP. O EC_{50} (concentração de agonista na qual se obtém 50% da ativação) de cada

ligante foi calculado por meio de regressão não-linear utilizando-se o programa GraphPad Prism 7.

3.6 Ensaios funcionais utilizando a metodologia de BRET

As configurações utilizadas neste trabalho são denominadas de BRET_{480-YFP} e BRET_{415-rGFP}. Para o BRET_{480-YFP}, chamado de BRET₁, as proteínas estão fusionadas a RlucII (Renilla luciferase de *Renilla reniformis*) que atua como doador e YFP (*Yellow Fluorescent Protein* de *Aequorea victoria*) que atua como acceptor de energia. Para o BRET_{415-rGFP}, chamado de BRET₂, as proteínas estão fusionadas a RlucII e rGFP (*Green Fluorescent Protein* de *Renilla reniformis*) que atuam como doador e acceptor de energia, respectivamente. As construções OXTR-YFP, OXTR-RlucII, rGFP-KRAS e β -arrestina2-RlucII foram desenvolvidas pelo grupo do Prof. Michel Bouvier do Departamento de Bioquímica da Universidade de Montreal e foram gentilmente cedidas ao nosso laboratório (GALÉS et al., 2006; QUOYER et al., 2013; NAMKUNG et al., 2016). O rGFP-KRAS trata-se de um marcador de membrana que possui a sequência polibásica e a sequência sinal de prenilação de KRAS (KKKKSKTKCVIM).

3.6.1 Análise do recrutamento de β -arrestina2 por BRET

Um total de $3,84 \times 10^6$ de células HEK293T cotransfectadas com 7,5 μ g de DNA total, sendo 3,75 μ g do vetor contendo OXTR-YFP e 187,5ng do vetor de β arr2-RlucII, foram transferidas para placas brancas opacas de 96 poços

(Corning, EUA) em uma densidade de 4×10^4 células/poço. Quarenta e oito hora após a transfecção, as células foram lavadas com PBS e incubadas com tampão Tyrode (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, CaCl_2 1mM, NaHCO_3 12mM, D-glucose 5,6mM, MgCl_2 0,5mM, NaH_2PO_4 0,37mM, HEPES 25mM e pH 7,4) a 37°C por 30min. Posteriormente, as células foram estimuladas com diferentes concentrações de OXT e dos análogos por 15min e a coelenterazina H (Biotium, EUA) 5µM foi empregada como substrato da luciferase. As leituras foram realizadas pelo leitor de placas Synergy Neo2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, EUA). Os sinais de BRET₁ foram calculados dividindo a intensidade da luz emitida pelo acceptor (YFP) em $530 \pm 20\text{nm}$ pela intensidade da luz emitida pelo doador (RLucII) em $480 \pm 20\text{nm}$. Os dados obtidos foram apresentados em curvas concentração-resposta e o EC₅₀ de cada ligante foi calculado a partir da regressão não-linear pelo programa GraphPad Prism 7.

3.6.2 Análise da internalização do receptor de OXT por BRET

Para os ensaios de internalização do receptor OXT por meio de BRET, $3,84 \times 10^6$ de células HEK293T foram cotransfectados com 10µg de DNA total, sendo 250ng do vetor que codifica o receptor OXT fusionado à RLucII e 3µg do marcador de membrana rGFP-kRAS, e então plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 4×10^4 células/poço. Dois dias depois, as células foram lavadas com PBS e incubadas com tampão Tyrode 37°C por 30min. Foram realizados experimentos de concentração-resposta, onde o estímulo com diferentes concentrações de OXT e análogos foi realizado por 20min e a Prolume Purple (Nanolight Technology, EUA) 1,3µM foi utilizada como substrato de luciferase.

As leituras foram realizadas pelo leitor de placas Synergy Neo2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, EUA) e os sinais de BRET₂ foram calculados dividindo a intensidade da luz emitida pelo acceptor (rGFP) em 515 ± 15nm pela intensidade da luz emitida pelo doador (RLucII) em 410 ± 40nm. Os dados obtidos foram apresentados em curvas concentração-resposta e o EC₅₀ de cada ligante foi calculado a partir da regressão não-linear pelo programa GraphPad Prism 7.

3.7 Cálculo do fator de tendência (do Inglês, *bias factor*)

Para quantificar o agonismo tendencioso, os efeitos dos agonistas nos ensaios de mobilização de cálcio intracelular, recrutamento de β-arrestina2 e internalização do OXTR, foram ajustados ao Modelo Operacional de Agonismo de Black e Leff (BLACK; LEFF, 1983), como apresentado na Equação 2:

$$Resposta = \frac{E_{m\acute{a}x} \times \tau^n \times [A]^n}{(K_A + [A]^n) + \tau^n \times K_A^n}$$

Equação 2. Modelo operacional de agonismo.

Na qual, $E_{m\acute{a}x}$ representa a resposta máxima possível do sistema, K_A é a constante de dissociação no equilíbrio do complexo agonista-receptor, n é a inclinação de transdução, e τ representa a eficácia operacional do agonista. Utilizou-se o método proposto por Kenakin e colaboradores (2012) que é baseado em comparações de razões τ/K_A entre agonistas. Os valores de

$\log(\tau/K_A)$, também denominados de coeficientes de transdução, representam a “força” de um dado agonista em ativar uma via de sinalização em um sistema definido. Esses valores foram calculados através de uma reparametrização da equação (Equação 3) do modelo operacional (EVANS et al., 2011):

$$Resposta = basal + \frac{(E_{max} - basal) \times TR^n \times [A]^n}{[A]^n \times TR^n \times \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^n}$$

Equação 3. Modelo operacional de Evans.

onde TR (do inglês - *transduction ratio*) é a razão τ/K_A . O valor de $\Delta\log(\tau/K_A)$ representa a eficiência (ou atividade relativa) do agonista em ativar uma via comparado ao agonista de referência e foi calculado de acordo com a Equação 4:

$$\Delta\log(\tau/K_A)_{agonista/referência} = \log(\tau/K_A)_{agonista} - \log(\tau/K_A)_{referência}$$

Equação 4. Cálculo da tendência de um ligante em comparação ao ligante de referência

A partir da subtração dos $\Delta\log(\tau/K_A)$ de uma via pelos valores de outra é obtido o fator de tendência $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$, conforme a Equação 5:

$$\Delta\Delta\log(\tau/K_A) = \Delta\log(\tau/K_A)_{via\ de\ sinalização\ 1} - \Delta\log(\tau/K_A)_{via\ de\ sinalização\ 2}$$

Equação 5. Cálculo da tendência de um ligante comparando-se duas vias de sinalização

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Desenho, síntese, purificação e caracterização química dos análogos de oxitocina

Na Tabela 1 são mostrados os análogos desenhados e sintetizados. As análises realizadas através do HPLC e da Espectrometria de massas mostraram que a síntese foi bem sucedida.

Tabela 1. Nomenclatura e sequência dos peptídeos endógenos e dos análogos de OXT.

Peptídeo	Sequência										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Oxitocina		Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly	NH ₂
Vasopressina		Cys	Tyr	Phe	Gln	Asn	Cys	Pro	Arg	Gly	NH ₂
Sar ⁰ -OXT	Sar	Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly	NH ₂
Sar ⁰ Val ³ Pro ⁸ -OXT	Sar	Cys	Tyr	Val	Gln	Asn	Cys	Pro	Pro	Gly	NH ₂
Thr ⁴ -OXT		Cys	Tyr	Ile	Thr	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly	NH ₂
Val ³ Thr ⁴ Pro ⁸ -OXT		Cys	Tyr	Val	Thr	Asn	Cys	Pro	Pro	Gly	NH ₂
OXT-OH		Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly	OH
Val ³ Pro ⁸ -OXT-OH		Cys	Tyr	Val	Gln	Asn	Cys	Pro	Pro	Gly	OH
Pro ⁸ -OXT		Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Pro	Gly	NH ₂
Val ³ Pro ⁸ -OXT		Cys	Tyr	Val	Gln	Asn	Cys	Pro	Pro	Gly	NH ₂

Sar: resíduo de sarcosina.

4.2 Afinidade dos análogos de oxitocina pelo OXTR

Inicialmente, para estimarmos a afinidade dos análogos pelo OXTR, foram realizados ensaios de *binding* em células HEK293T expressando o receptor. As concentrações testadas dos peptídeos foram desde 10⁻⁵ M até 10⁻¹² M, e cada ponto foi realizado em duplicata. A Figura 4 mostra os gráficos individuais de

perfil de competição de cada um dos análogos, tendo a OXT e AVP como ligantes de referência. Na Tabela 2 são apresentados os valores estimados de afinidade (K_i e pK_i) para cada um dos análogos.

Figura 4. Curvas de *binding* de ensaios de competição para o OXTR. A) Sar⁰-OXT B) Sar⁰Val³Pro⁸-OXT C) Thr⁴-OXT D) Val³Thr⁴Pro⁸-OXT E) OXT-OH F) Val³Pro⁸-OXT-OH G) Pro⁸-

OXT **H**) Val³Pro⁸-OXT. Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima da [³H]-OXT. *N*= 2 ou 3 experimentos independentes.

Tabela 2. Constantes de afinidade (K_i e pK_i) da OXT, AVP e análogos obtidas em ensaios de competição pela ligação específica do radioligante [³H]-OXT em OXTR.

Peptídeo	K_i (nM) $\pm$ E.P.M.	F_c	$pK_i \pm$ E.P.M.
OXT	8,0 $\pm$ 1,5	1,0	8,1 $\pm$ 0,1
AVP	126,8 $\pm$ 44,0	15,8	6,9 $\pm$ 0,2
Sar ⁰ -OXT	899,7 $\pm$ 177,1	112,1	6,0 $\pm$ 0,1
Sar ⁰ Val ³ Pro ⁸ -OXT	>10.000	N.Q.	N.Q.
Thr ⁴ -OXT	46,0 $\pm$ 5,5	5,7	7,3 $\pm$ 0,1
Val ³ Thr ⁴ Pro ⁸ -OXT	693,7 $\pm$ 90,1	86,4	6,2 $\pm$ 0,1
OXT-OH	1655,4 $\pm$ 461,9	206,2	5,8 $\pm$ 0,1
Val ³ Pro ⁸ -OXT-OH	414,5 $\pm$ 45,2	51,6	6,4 $\pm$ 0,1
Pro ⁸ -OXT	7,5 $\pm$ 0,3	0,9	8,1 $\pm$ 0,1
Val ³ Pro ⁸ -OXT	30,6 $\pm$ 9,7	3,8	7,6 $\pm$ 0,1

Os valores de K_i foram obtidos por meio de cálculos de regressão não linear realizados com o programa GraphPad Prism e são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 2 ou 3 experimentos independentes. O F_c é a razão do valor de K_i para os análogos em relação ao valor de K_i obtido para OXT. N.Q.: Não quantificável.

Nossos resultados mostraram que os análogos Sar⁰Val³Pro⁸-OXT (Fig. 4B) e OXT-OH (Fig. 4E) possuem baixíssima afinidade, sendo que o peptídeo contendo Sar liga-se ao receptor somente em sua concentração mais alta. Os análogos Sar⁰-OXT (Fig. 4A), Val³Thr⁴Pro⁸-OXT (Fig. 4D) e Val³Pro⁸-OXT-OH (Fig. 4F) também apresentaram baixa afinidade, sendo esta inferior à da AVP. Thr⁴-OXT (pK_i : 7,3) (Fig. 4C) e Val³Pro⁸-OXT (Fig. 4H) (pK_i : 7,6) demonstraram afinidades apenas ligeiramente mais baixas em relação a OXT (pK_i : 8,1), enquanto o análogo Pro⁸-OXT (Fig. 4G) apresentou afinidade igual à da OXT.

4.3 Mobilização de Ca^{2+} intracelular mediada pelo OXTR após estímulo com os diferentes análogos

Figura 5. Ensaio de mobilização de Ca^{2+} intracelular modulado por OXTR após a ativação com OXT, AVP e os análogos. **A)** Sar⁰-OXT **B)** Sar⁰Val³Pro⁸-OXT **C)** Thr⁴-OXT **D)** Val³Thr⁴Pro⁸-

OXT **E)** OXT-OH **F)** Val³Pro⁸-OXT-OH **G)** Pro⁸-OXT **H)** Val³Pro⁸-OXT. Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da resposta máxima induzida por OXT. *N* = ao menos 3 experimentos independentes.

Além de investigarmos a afinidade dos análogos pelo receptor de OXT, foi analisada a capacidade destes ligantes em levar a mobilização de Ca²⁺ intracelular, um mecanismo de sinalização que ocorre após a ativação da proteína G_q. Os perfis de ativação de cada um dos análogos testados encontram-se na Figura 5.

Os análogos Sar⁰-OXT (Fig. 5A), Sar⁰Val³Pro⁸-OXT (Fig. 5B), Val³Pro⁸-OXT-OH (Fig. 5F) apresentaram potências muito baixas, porém o E_{máx} encontrado para Sar⁰-OXT foi de 69,1% (Tabela 3). As modificações nos análogos Val³Thr⁴Pro⁸-OXT (pEC₅₀: 7,9) (Fig. 5F) e OXT-OH (pEC₅₀: 7,6) (Fig. 5E) levaram a diminuição da potência em cerca de 10 vezes em relação a OXT (pEC₅₀: 8,7). Já os análogos Thr⁴-OXT (pEC₅₀: 8,3) (Fig. 5C), Pro⁸-OXT (pEC₅₀: 8,7) (Fig. 5G) e Val³Pro⁸-OXT (pEC₅₀: 8,6) (Fig. 5H), demonstraram potências similares ou iguais à da OXT, contudo, destaca-se que o Thr⁴-OXT obteve um E_{máx} calculado igual a 124,5%, superior ao da OXT (100%).

4.4 Recrutamento de β-arrestina2 pelo OXTR

Além da capacidade dos análogos de mobilizar Ca²⁺ de estoques intracelulares, também foi avaliada a possível ativação de vias dependentes de β-arrestina por meio da estratégia de BRET. Neste ensaio, foi analisado o recrutamento de β-arrestina2 fusionada à RlucII para o receptor fusionado à YFP

após 15min de incubação com os ligantes, como ilustrado pela Figura 6. Quando o receptor é ativado, ocorre a interação da β -arrestina2 com a porção citoplasmática do receptor e consequentemente a aproximação de RLucII e de YFP (Fig. 6B). Dessa forma, na presença do substrato de RLucII o sinal de BRET aumenta como pode ser observado na Figura 7.

Os análogos $\text{Sar}^0\text{Val}^3\text{Pro}^8\text{-OXT}$ (Fig. 7B), OXT-OH (Fig. 7E) e $\text{Val}^3\text{Pro}^8\text{OXT-OH}$ (Fig. 7F) não recrutaram β -arrestina2, enquanto $\text{Sar}^0\text{-OXT}$ e $\text{Val}^3\text{Thr}^4\text{Pro}^8\text{-OXT}$ apresentaram baixa potência, levando a resposta somente em alta concentração. Como pode ser observado na Tabela 3, as alterações contidas nos análogos $\text{Thr}^4\text{-OXT}$ (pEC_{50} : 7,3) (Fig. 7C) e $\text{Val}^3\text{Pro}^8\text{-OXT}$ (pEC_{50} : 7,4) (Fig. 7H) levaram a uma pequena redução na potência dos mesmos quando comparados à OXT (pEC_{50} : 8,4), enquanto a potência de $\text{Pro}^8\text{-OXT}$ (pEC_{50} : 8,3) (Fig. 7G) se assemelhou à de tal ligante endógeno.

Figura 6. Princípio da análise do recrutamento de β -arrestina2 para o receptor por meio da técnica de BRET. Células HEK293T são cotransfectadas com vetores que codificam o OXTR fusionado a YFP e β -arrestina2 fusionada à RLucII. Quando o substrato de RLucII, coelenterazina H, é fornecido, a enzima o oxida e emite luz excitando YFP, a qual emite fluorescência. **A)** β -arrestina2 se encontra no citoplasma e não interage com o receptor, impedindo a aproximação de RLucII e YFP e consequente ocorrência de BRET. **B)** Quando o receptor é ativado ele pode recrutar e interagir com β -arrestina2 o que leva à geração de BRET.

Figura 7. Ensaio de recrutamento de β -arrestina2 modulado por OXTR após a ativação com OXT, AVP e os análogos, utilizando-se a técnica de BRET. A) Sar⁰-OXT B) Sar⁰Val³Pro⁸-OXT C) Thr⁴-OXT D) Val³Thr⁴Pro⁸-OXT E) OXT-OH F) Val³Pro⁸-OXT-OH G) Pro⁸-OXT H) Val³Pro⁸-OXT. Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da resposta máxima induzida por OXT. $N \geq$ ao menos 3 experimentos independentes.

Tabela 3. Potência da OXT, AVP e dos análogos na mobilização de cálcio intracelular e no recrutamento de β -arrestina2 mediados por OXTR.

Ligante	EC ₅₀ (nM) $\pm$ E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ $\pm$ E.P.M.	E _{máx} (%)
Mobilização de cálcio intracelular				
OXT	2,6 $\pm$ 0,8	1,0	8,7 $\pm$ 0,1	100
AVP	28,6 $\pm$ 21,2	11	8 $\pm$ 0,3	111,5 $\pm$ 6,4
Sar ⁰ -OXT	1992,6 $\pm$ 1992,5	766,4	5,9 $\pm$ 1,3	69,1 $\pm$ 0,8
Sar ⁰ Val ³ Pro ⁸ -OXT	N.Q.	N.Q.	N.Q.	29,8 $\pm$ 8,9*
Thr ⁴ -OXT	6,1 $\pm$ 1,5	2,4	8,3 $\pm$ 0,1	124,5 $\pm$ 10,7
Val ³ Thr ⁴ Pro ⁸ -OXT	24,7 $\pm$ 17,6	9,5	7,9 $\pm$ 0,3	83,8 $\pm$ 10,1
OXT-OH	38,1 $\pm$ 20,6	14,7	7,6 $\pm$ 0,2	53,2 $\pm$ 11,2
Val ³ Pro ⁸ -OXT-OH	N.Q.	N.Q.	N.Q.	12,6 $\pm$ 4,74*
Pro ⁸ -OXT	4,4 $\pm$ 2,1	1,7	8,7 $\pm$ 0,5	96,1 $\pm$ 7,3
Val ³ Pro ⁸ -OXT	2,7 $\pm$ 0,9	1,1	8,6 $\pm$ 0,2	91,9 $\pm$ 10,3
Recrutamento de β-arrestina 2				
OXT	10,5 $\pm$ 7,5	1,0	8,4 $\pm$ 0,3	100
AVP	34,4 $\pm$ 11,1	3,3	7,5 $\pm$ 0,2	55,2 $\pm$ 9,6
Sar ⁰ -OXT	N.Q.	N.Q.	N.Q.	28,5 $\pm$ 15,8*
Sar ⁰ Val ³ Pro ⁸ -OXT	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Thr ⁴ -OXT	59 $\pm$ 25,7	5,6	7,3 $\pm$ 0,2	98,7 $\pm$ 16,3
Val ³ Thr ⁴ Pro ⁸ -OXT	N.Q.	N.Q.	N.Q.	43,3 $\pm$ 6,9*
OXT-OH	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Val ³ Pro ⁸ -OXT-OH	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Pro ⁸ -OXT	5,3 $\pm$ 0,5	0,5	8,3 $\pm$ 0,1	90,4 $\pm$ 4
Val ³ Pro ⁸ -OXT	40,7 $\pm$ 10,2	3,9	7,4 $\pm$ 0,1	72,8 $\pm$ 7

Os valores de EC_{50} e pEC_{50} são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de ao menos 3 experimentos. O F_c é a razão dos valores de EC_{50} para os análogos em relação ao valor de EC_{50} obtido para OXT. O $E_{m\acute{a}x.}$ é representado em porcentagem, tendo como referência a OXT (100%). N.Q.: Não quantificável. *Valores referentes a resposta do ligante em concentração de $10^{-6}M$.

4.5 Internalização do receptor de OXT

Para avaliar se o recrutamento de β -arrestinas acarretava a internalização do receptor, ou se poderia haver um mecanismo alternativo levando a internalização do OXTR após o estímulo com os análogos, foram realizados ensaios de internalização utilizando-se a técnica de BRET (Fig. 8) incubando-se as células com os ligantes por 20 min. Neste ensaio, quando o receptor é internalizado ocorre o distanciamento entre RlucII e rGFP (Fig. 8B). Dessa forma, na presença do substrato de RlucII o sinal de BRET diminui. As curvas são mostradas na Figura 9 e os cálculos de potência e resposta máxima encontram-se na Tabela 4.

Figura 8. Princípio da análise de internalização do OXTR por meio da técnica de BRET. Células HEK293T expressando o marcador de membrana plasmática, rGFP-kRAS, e OXTR fusionado à RLucII **A)** são estimuladas com o agonista. **B)** Consequentemente, se o agonista levar à internalização do receptor, RLucII se distânciia do marcador de membrana e o sinal de BRET diminui.

Figura 9. Ensaio de internalização do receptor de OXT após a ativação com OXT, AVP e os análogos, utilizando-se a técnica de BRET. A) Sar⁰-OXT B) Thr⁴-OXT C) Val³Thr⁴Pro⁸-OXT D) OXT-OH E) Val³Pro⁸-OXT-OH F) Pro⁸-OXT G) Val³Pro⁸-OXT. Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da resposta máxima induzida por OXT. N= 3 experimentos independentes.

Tabela 4. Potência da OXT, AVP e dos análogos na internalização do OXTR.

Ligante	EC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ ± E.P.M.	E _{máx} (%)
Internalização de OXTR				
OXT	2,6 ± 1,5	1,0	8,7 ± 0,3	100
AVP	86,1 ± 35,9	33,1	7,2 ± 0,3	65,7 ± 11,5
Sar⁰-OXT	N.Q.	N.Q.	N.Q.	38,2 ± 4,7
Thr⁴-OXT	46,7 ± 14,6	18,0	7,4 ± 0,1	76,9 ± 13,3
Val³Thr⁴Pro⁸-OXT	N.Q.	N.Q.	N.Q.	26,4 ± 4,1
OXT-OH	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Val³Pro⁸-OXT-OH	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Pro⁸-OXT	3,3 ± 2,5	1,3	8,7 ± 0,5	87,1 ± 2,3
Val³Pro⁸-OXT	64,32 ± 34,5	24,7	7,3 ± 0,2	69,4 ± 9,9

Os valores de EC₅₀ e pEC₅₀ são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3 experimentos. O F_c é a razão dos valores de EC₅₀ para os análogos em relação ao valor de EC₅₀ obtido para OXT. O E_{máx} é representado em porcentagem, tendo como referência a OXT (100%). N.Q.: Não quantificável.

Os peptídeos desprovidos de amidação na porção C-terminal, OXT-OH (Fig. 9D) e Val³Pro⁸OXT-OH (Fig. 9E), não levaram a internalização do receptor. Já os análogos Sar⁰-OXT (Fig. 9A) e Val³Thr⁴Pro⁸-OXT (Fig. 9C) apresentaram baixa eficiência para internalização do OXTR, ao passo que Thr⁴-OXT (pEC₅₀: 7,4) (Fig. 9B) e Val³Pro-OXT (pEC₅₀: 7,3) (Fig. 9G) demonstraram potências reduzidas comparáveis a da AVP (pEC₅₀: 7,2). Por fim, o análogo Pro⁸-OXT (pEC₅₀: 8,7) (Fig. 9F) apresentou potência igual à da OXT (pEC₅₀: 8,7).

Considerando a baixa afinidade e potência do análogo Sar⁰Val³Pro⁸-OXT, o mesmo não foi avaliado neste ensaio.

4.6 Análise da seletividade dos análogos pelo OXTR em relação ao AVPR1a na mobilização de Ca²⁺ intracelular

Com o intuito de avaliar a seletividade dos análogos pelo OXTR ou AVPR1a para a mobilização de Ca²⁺ intracelular, realizamos tal ensaio com células HEK293T expressando transientemente o AVPR1a. Os perfis de ativação dos análogos podem ser observados na Figura 10. Os resultados referentes ao OXTR e ao AVPR1a foram dispostos conjuntamente na Tabela 5 visando facilitar a comparação entre os dois receptores.

De forma geral, os análogos com Sar, Sar⁰-OXT (Fig. 10A) e Sar⁰Val³Pro⁸-OXT (Fig. 10B), assim como aqueles não-amidados, OXT-OH (Fig. 10E) e Val³Pro⁸OXT-OH (Fig. 10F), não levaram a ativação da via de mobilização de Ca²⁺, indicando que tais modificações levaram a maior seletividade pelo OXTR. Os análogos Val³Thr⁴Pro⁸-OXT (Fig. 10D) e Val³Pro⁸-OXT (Fig. 10H) apresentaram redução da potência de cerca de 8 e 16 vezes, respectivamente, similar a potência 12 vezes menor da OXT no AVPR1a em relação aos resultados observados no OXTR. Contudo tais análogos também apresentaram redução de sua eficiência máxima no AVPR1a quando comparados com OXT no mesmo receptor. Já o análogo Thr⁴-OXT (Fig. 10C) teve sua potência reduzida em 18 vezes, o que foi acompanhado por uma eficiência máxima mais baixa no AVPR1a. Por fim, o peptídeo Pro⁸-OXT (Fig. 10G) demonstrou maior potência para mobilização mediada por AVPR1a (pEC₅₀: 8,9) do que por OXTR (pEC₅₀: 8,7), apesar de ocorrer a redução de sua eficácia em 40%.

Figura 10. Ensaio de mobilização de Ca^{2+} intracelular modulado por AVPR1a após a ativação com OXT, AVP e os análogos. A) Sar⁰-OXT B) Sar⁰Val³Pro⁸-OXT C) Thr⁴-OXT D) Val³Thr⁴Pro⁸-OXT E) OXT-OH F) Val³Pro⁸-OXT-OH G) Pro⁸-OXT H) Val³Pro⁸-OXT. Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da resposta máxima induzida por AVP. N = ao menos 3 experimentos independentes.

Tabela 5. Comparativo da potência da OXT, AVP e dos análogos na mobilização de cálcio intracelular mediada por OXTR e AVPR1a.

Mobilização de cálcio intracelular						
Peptídeo	EC ₅₀ (nM) ± E.P.M.		pEC ₅₀ ± E.P.M.		E _{máx} (%)	
	OXTR	AVPR1a	OXTR	AVPR1a	OXTR	AVPR1a
OXT	2,6 ± 0,8	32,2 ± 9,6	8,7 ± 0,1	7,5 ± 0,1	100	126 ± 10,9
AVP	28,6 ± 21,2	3,6 ± 2,3	8 ± 0,3	8,7 ± 0,3	111,5 ± 6,4	100
Sar⁰-OXT	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	69,1 ± 0,8	12,6 ± 4,2*
Sar⁰Val³Pro⁸-OXT	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	29,8 ± 8,9*	N.Q.
Thr⁴-OXT	6,1 ± 1,5	109,1 ± 48,41	8,3 ± 0,1	7,1 ± 0,2	124,5 ± 10,7	73,6 ± 10,6
Val³Thr⁴Pro⁸-OXT	24,7 ± 17,6	208,5 ± 120,8	7,9 ± 0,3	6,8 ± 0,2	83,8 ± 10,1	66,9 ± 10,2
OXT-OH	38,1 ± 20,6	N.Q.	7,6 ± 0,2	N.Q.	53,2 ± 11,2	16,1 ± 11,6*
Val³Pro⁸-OXT-OH	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	12,6 ± 4,74*	N.Q.
Pro⁸-OXT	4,4 ± 2,1	1,4 ± 0,4	8,7 ± 0,5	8,9 ± 0,1	96,1 ± 7,3	56,2 ± 5
Val³Pro⁸-OXT	2,7 ± 0,9	44,4 ± 12,1	8,6 ± 0,2	7,4 ± 0,1	91,9 ± 10,3	83,4 ± 6,2

Os valores de EC₅₀ e pEC₅₀ são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de ao menos 3 experimentos. O E_{máx.} é representado em porcentagem tendo como referência a OXT ou a AVP (100%). N.Q.: Não quantificável. *Valores referentes a resposta do ligante em concentração de 10⁻⁶ M.

4.7 Fatores de tendência calculados

Para avaliarmos quantitativamente o agonismo tendencioso, utilizamos o cálculo proposto por Kenakin e colaboradores (2012). Os análogos foram avaliados em dois grupos de comparação diferentes (via de mobilização de Ca^{2+} intracelular vs. via de recrutamento de β -arrestina2 e via de mobilização de Ca^{2+} intracelular vs. internalização do OXTR), e os resultados dos análogos para os quais foi possível obter o fato de tendência são apresentados graficamente na Figura 11. No gráfico, a barra de erro corresponde a um intervalo de confiança de 95%, sendo aqueles análogos com intervalos que incluem o zero considerados não tendenciosos para nenhuma das vias em relação ao agonista de referência (OXT).

Figura 11. Análise do agonismo tendencioso dos análogos sintetizados no OXTR. O $\Delta\text{Log}(\tau/K_A)$ dos análogos foi calculado em relação ao agonista de referência (OXT), sendo posteriormente cada análogo comparado para ativação de duas vias diferentes por meio do cálculo do $\Delta\Delta\text{Log}(\tau/K_A)$, representado nestes gráficos com intervalo de confiança de 95%. **A)** Comparação entre ativação da via de mobilização de Ca^{2+} intracelular e do recrutamento de β -arrestina2 **B)** Comparação entre ativação da via de mobilização de Ca^{2+} intracelular e da internalização do receptor de OXT.

Além disso, as atividades relativas (Fig. 12A) e as respostas máximas (Fig. 12B) de cada ligante foram representadas na forma de *heat maps* visando a avaliação das contribuições da potência e da eficácia dos análogos para o agonismo tendencioso. Na Figura 10A, quanto menor o valor de $[\Delta\text{Log}(\tau/K_A)]$ menor é a capacidade de determinado ligante em ativar aquela via em relação à OXT. Já na Figura 10B, quanto mais próximo de zero menor a eficiência máxima do ligante para ativar tal via quando comparado à OXT.

Figura 12. Heat map da atividade relativa e da resposta máxima de cada ligante para mobilização de Ca^{2+} intracelular, recrutamento de β -arrestina2 e internalização do receptor mediante ativação de OXTR. **A)** Representação da atividade relativa [$\Delta\text{Log}(t/\text{KA})$] dos análogos em ativar uma via comparado ao agonista de referência. $\Delta\text{Log}(t/\text{KA})$ foi calculado a partir dos resultados de regressão não-linear de cada ensaio. O valor -4.0 para $\Delta\text{Log}(t/\text{KA})$ foi determinado arbitrariamente para aquelas vias em que o EC_{50} e o $\text{E}_{\text{máx.}}$ não puderam ser quantificados, tendo como referência o menor valor obtido para uma via (-3.5). **B)** Representação da resposta máxima dos análogos tendo como referência a OXT (100%), conforme dados apresentados nas Tabelas 3 e 4. Os análogos marcados com “X” não puderam ser quantificados para a via em questão.

De maneira geral, os análogos que apresentaram atividade significativamente diferente para as vias comparadas são mais ativos para a mobilização de Ca^{2+} intracelular do que para as vias de recrutamento de β -arrestina2 e internalização do receptor. Segundo os cálculos realizados, o análogo $\text{Sar}^0\text{-OXT}$ apresentou maior atividade para mobilização de Ca^{2+} , enquanto $\text{Sar}^0\text{Val}^3\text{Pro}^8\text{-OXT}$ se comportou como um agonista parcial fraco para a primeira via. $\text{Thr}^4\text{-OXT}$, OXT-OH e $\text{Val}^3\text{Pro}^8\text{-OXT-OH}$ também demonstraram maior tendência para a via de mobilização de Ca^{2+} . Já o análogo $\text{Val}^3\text{Thr}^4\text{Pro}^8\text{-OXT}$ mostrou-se mais ativo para mobilização de Ca^{2+} em detrimento da via de β -arrestina2 e, apesar de ser identificado como um agonista balanceado quando comparamos a mobilização de Ca^{2+} e a internalização do receptor por meio do fator de tendência, o análogo $\text{Val}^3\text{Thr}^4\text{Pro}^8\text{-OXT}$ apresenta baixa eficiência máxima para internalização do receptor. O peptídeo $\text{Pro}^8\text{-OXT}$ comportou-se como um agonista balanceado para todas as vias comparadas. O análogo $\text{Val}^3\text{Pro}^8\text{-OXT}$ apresentou perfil balanceado quando comparado a mobilização de Ca^{2+} e o recrutamento de β -arrestina2, porém quando os resultados do ensaio de internalização foram considerados, este análogo se mostrou mais ativo para mobilização de Ca^{2+} .

Discussão

5 DISCUSSÃO

O fenômeno do agonismo tendencioso, também chamado de seletividade funcional, consiste na capacidade de determinados ligantes em estabilizar distintas conformações do receptor, permitindo a interação diferencial deste último com efetores, o que leva a determinado perfil de ativação das vias de sinalização. O melhor entendimento dos mecanismos estruturais e funcionais envolvidos representam potencial para o desenvolvimento de novas moléculas com ações terapêuticas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi, a partir do desenho racional e síntese de novos análogos de OXT, identificar aqueles com perfis tendenciosos e seletivos para o receptor OXTR, assim como associar suas características estruturais com o agonismo tendencioso observado. O melhor entendimento de tais aspectos e das interações que levam a seletividade funcional pode contribuir para uma melhor compreensão da relação estrutura/função e, logo, para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e que causem menos efeitos adversos.

Neste estudo, 8 análogos de OXT foram sintetizados e caracterizados utilizando-se o OXTR, assim como avaliados quanto a seletividade em ensaios com o AVPR1a. Considerando os resultados apresentados neste trabalho, podemos inferir que, possivelmente, o aminoácido Sar na posição 0 cria uma nova conformação no peptídeo que aumenta o impedimento para que ocorra a ligação do mesmo no *binding pocket* do receptor, o que podemos correlacionar com a baixa afinidade dos análogos Sar⁰-OXT e Sar⁰Val³Pro⁸-OXT, em especial deste último, já que a combinação com outras alterações acarreta a diminuição da afinidade em mais de 10 mil vezes. Tal fato reflete-se no comportamento

como agonista parcial da via de mobilização de Ca^{2+} intracelular do análogo Sar^0 -OXT e como agonista fraco do $\text{Sar}^0\text{Val}^3\text{Pro}^8$ -OXT, assim como na eficiência baixa ou nula no recrutamento de β -arrestina2. Apesar do análogo Sar^0 -OXT levar ao recrutamento de β -arrestina2 somente em concentração elevada, este se mostra capaz de acarretar a internalização do receptor, mesmo que com eficiência muito baixa, um fenômeno que pode ser independente de β -arrestina2, como já descrito para o ligante Carbetocina, o que possivelmente envolve a atuação de GRK2 como proteína adaptadora que interage diretamente com a clatrina (PASSONI et al., 2016). Por outro lado, esta divergência nos resultados destes ensaios pode ocorrer em razão dos tipos de constructos empregados na estratégia de BRET, já que geralmente ensaios com constructos com rGFP, como na avaliação de internalização, apresentam maior sensibilidade de detecção.

A literatura relata que o análogo Thr^4 -OXT possui elevada atividade oxitocítica (MANNING; SAWYER, 1970; SAWYER; MANNING, 1973) e, apesar da afinidade 5 vezes menor observada, foi possível constatar que este peptídeo atua como um superagonista na mobilização de Ca^{2+} , superando a eficiência da OXT em 24,5%, como agonista total da via de β -arrestina2, e como agonista parcial na internalização do OXTR, apesar de possuir menor potência em todos estes casos. Contudo, ao substituir conjuntamente os resíduos 3, 4 e 8, conforme realizado no análogo $\text{Val}^3\text{Thr}^4\text{Pro}^8$ -OXT, observou-se uma queda de 86 vezes na afinidade, acompanhada da redução drástica da potência no recrutamento de β -arrestina2 e na internalização do receptor, o que pode estar relacionado as alterações nas posições 3 e 8 (PARREIRAS-E-SILVA et al., 2017). Sendo assim, destaca-se que Thr^4 -OXT e $\text{Val}^3\text{Thr}^4\text{Pro}^8$ -OXT apresentaram-se como agonistas

tendenciosos para mobilização de Ca^{2+} (via dependente da ativação de proteína G_q). Em relação a seletividade, de forma interessante ambos análogos atuaram apenas como agonistas parciais no AVPR1a, apresentando eficiência máxima reduzida quando comparamos os efeitos dos mesmos no OXTR e no AVPR1a, indicando que Gln^4 pode ter um papel chave na seletividade e que a substituição desse resíduo por Thr^4 favorece a ativação de OXTR.

A ausência da amidação levou o análogo OXT-OH a apresentar baixa afinidade pelo receptor, a qual foi parcialmente recuperada no análogo Val^3Pro^8 -OXT-OH. Entretanto, OXT-OH demonstrou potência 15 vezes menor para mobilização de Ca^{2+} via OXTR, em relação à OXT, enquanto Val^3Pro^8 -OXT-OH comportou-se como um agonista fraco. Ambos os análogos não foram capazes de recrutar β -arrestina2 e levar a internalização do receptor, sendo então considerados agonistas tendenciosos para via de proteína G_q . Além disso, a desamidação levou esses análogos a serem incapazes de mobilizar Ca^{2+} intracelular por meio do AVPR1a, aumentando a seletividade pelo OXTR, conforme descrito por Muttenthaler e colaboradores (2017). Desta forma, a presença de um grupo ácido de carga negativa na extremidade C-terminal do peptídeo ou a ausência do grupo amino nesta região parece afetar a ligação do mesmo nos dois receptores, mas principalmente no AVPR1a, assim como se mostra restritiva para mobilização de Ca^{2+} via OXTR (MUTTENTHALER et al., 2017), gerando análogos que não recrutam β -arrestina2 ou que desencadeiam a internalização do OXTR.

A interação hidrofóbica entre a Phe^{103} do OXTR e do resíduo presente na posição 8 da OXT é importante para a ligação e para a seletividade dos ligantes. Essa interação parece ser mantida seja com Leu (OXT endógena) ou Pro nesta

posição (KOEHBACH et al., 2013), já que nos resultados para OXTR o análogo Pro⁸-OXT apresentou potência para mobilização de Ca²⁺, recrutamento de β -arrestina2, internalização do receptor, assim como afinidade, iguais ou similares às aquelas observados para OXT. Quando analisado para o AVPR1a, Pro⁸-OXT se mostrou como um agonista potente para via de mobilização de Ca²⁺, embora com eficiência reduzida em cerca de 70% em relação a OXT, evidenciando a importância deste resíduo na ativação do AVPR1a. Por outro lado, a combinação desta modificação com Val na posição 3, como no análogo Val³Pro⁸-OXT, resultou na redução da afinidade, assim como da potência e da eficiência do análogo em promover o recrutamento de β -arrestina2 e a internalização de OXTR. Sendo assim, em nossos cálculos, Pro⁸-OXT é identificado como um agonista balanceado, enquanto Val³Pro⁸-OXT é classificado como um agonista tendencioso do OXTR para via de mobilização de Ca²⁺, em relação a via de internalização, embora apresente menor atividade relativa e eficiência também para a via de β -arrestina2. No AVPR1a, apesar da diminuição da potência, a presença de Val na posição 3 levou a recuperação parcial da eficiência do análogo em mobilizar Ca²⁺ intracelular.

Os resultados obtidos para os análogos Pro⁸-OXT e Val³Pro⁸-OXT, assim como daqueles análogos contendo estas alterações nas posições 3 e 8 em conjunto com outra modificação, podem sugerir um efeito prejudicial de Val³ e Pro⁸ para a afinidade e/ou sinalização quando somadas à outras alterações, ou então um efeito resultante em parte pela presença de Val na posição 3, já que região cíclica da molécula (aminoácidos de 1 a 6) aparenta ter maior papel na afinidade e na atividade agonística do que a cauda tripeptídica (KABLAOUI; VANASE-FRAWLEY; SCIABOLA, 2018).

Desta forma, nosso trabalho buscou avaliar a contribuição da extremidade N-terminal, dos resíduos nas posições 3, 4 e 8 e da amidação na porção C-terminal da OXT na ativação das diferentes vias de sinalização do OXTR, assim como observar se tais diferenças moleculares poderiam acarretar uma resposta tendenciosa e/ou aumentar a seletividade pelo receptor de OXT em detrimento do AVPR1a. Estes objetivos foram atingidos, uma vez que obtivemos certos ligantes que ativam preferencialmente determinadas vias de sinalização e que são mais seletivos. O desenvolvimento e estudo de ligantes tendenciosos tanto para as vias de proteínas G como para as vias de β -arrestinas, como os apresentados neste estudo, contribuem para a melhor compreensão da contribuição de diferentes resíduos na sinalização e seletividade do receptor, informações importante para o processo de descoberta de drogas, favorecendo o desenvolvimento de fármacos mais efetivos e que apresentem menos efeitos adversos no tratamento de diferentes fisiopatologias.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Estudos que envolvem a avaliação funcional de peptídeos e outras moléculas são importantes para o desenvolvimento de novas moléculas com capacidade terapêutica, bem como para o maior entendimento das características envolvidas na ligação, ativação e sinalização de receptores de superfície celular, como os GPCRs. Sendo assim, o presente trabalho envolveu o desenho, síntese e caracterização de análogos de OXT, contribuindo para a melhor compreensão das características envolvidas no agonismo tendencioso, na determinação da afinidade, e na seletividade pelo OXTR. Sumariamente, as conclusões obtidas neste trabalho foram:

O resíduo Sar na posição 0 afeta a ligação dos peptídeos no receptor, bem como sua funcionalidade, mas pode gerar análogos tendenciosos para via de mobilização de Ca^{2+} .

O resíduo Thr na posição 4 gera um superagonista para mobilização de Ca^{2+} que é tendencioso para tal via. Quando somado à Val³ e Pro⁸, este resíduo torna a tendência pela mobilização de Ca^{2+} ainda mais pronunciada. Há também contribuição relevante de Thr⁴ para a seletividade para o OXTR.

A desamidação da região C-terminal do peptídeo cria agonistas tendenciosos para mobilização de Ca^{2+} , assim como ligantes seletivos para o OXTR.

A manutenção do caráter hidrofóbico na posição 8 como com o uso de Pro permite a obtenção de afinidade e respostas funcionais similares à da OXT, enquanto a alteração em conjunto com Val na posição 3 impacta tais fatores, reduzindo em especial a atividade relativa e a eficiência para o recrutamento de β -arrestina2 e para internalização do receptor.

Desta forma, nossos resultados trazem informações relevantes sobre o papel de certas modificações na sinalização e seletividade, o que pode contribuir para o desenho e desenvolvimento de fármacos mais efetivos e que apresentem menos efeitos adversos para o tratamento de certas doenças relacionadas ao OXTR.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- ALLEN, J. A. et al. Discovery of β -arrestin-biased dopamine D₂ ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2011.
- BAKERMANS-KRANENBURG, M. J.; VAN IJZENDOORN, M. H. **Sniffing around oxytocin: Review and meta-analyses of trials in healthy and clinical groups with implications for pharmacotherapy** *Translational Psychiatry*, 2013. .
- BARBERIS, C.; MOUILLAC, B.; DURROUX, T. **Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function** *Journal of Endocrinology*, 1998. .
- BEARD, R. et al. Building bridges for highly selective, potent and stable oxytocin and vasopressin analogs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2018.
- BENOVIC, J. et al. Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 235–240, 13 out. 1989. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2552582>>.
- BLACK, J. W.; LEFF, P. Operational models of pharmacological agonism. **Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences**, 1983.
- BRUST, T. F. et al. Biased agonists of the kappa opioid receptor suppress pain and itch without causing sedation or dysphoria. **Science Signaling**, 2016.
- BUSNELLI, M. et al. Functional Selective Oxytocin-derived Agonists Discriminate between Individual G Protein Family Subtypes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 6, p. 3617–3629, 3 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.277178>>.
- BUSNELLI, M. et al. Selective and potent agonists and antagonists for investigating the role of mouse oxytocin receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2013.
- BUSNELLI, M. et al. Design and Characterization of Superpotent Bivalent Ligands Targeting Oxytocin Receptor Dimers via a Channel-Like Structure. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2016.
- BUSNELLI, M.; CHINI, B. Molecular Basis of Oxytocin Receptor Signalling in the Brain: What We Know and What We Need to Know. In: **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**. [s.l.: s.n.]p. 3–29.
- CARTER, C. S. et al. **Oxytocin, vasopressin and sociality** *Progress in Brain Research*, 2008. .
- CHEN, L.; JIN, L.; ZHOU, N. An update of novel screening methods for GPCR in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 9, p. 791–806, 21 set. 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17460441.2012.699036>>.
- CHINI, B. et al. Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. **FEBS Letters**, v. 397, n. 2–3, p. 201–206, 18 nov. 1996. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2896%2901135-0>>.

CHINI, B.; MANNING, M. Agonist selectivity in the oxytocin/vasopressin receptor family: New insights and challenges. In: Biochemical Society Transactions, **Anais...**2007.

CHINI, B.; MANNING, M.; GUILLON, G. **Affinity and efficacy of selective agonists and antagonists for vasopressin and oxytocin receptors: an “easy guide” to receptor pharmacology** *Progress in Brain Research*, 2008. .

CROMBIE, A. L. **TRV250: A novel biased ligand at the delta receptor for the potential treatment of migraine.**

DE ARAUJO, A. D. et al. Selenoether oxytocin analogues have analgesic properties in a mouse model of chronic abdominal pain. **Nature Communications**, 2014.

DONALDSON, Z. R.; YOUNG, L. J. **Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality** *Science*, 2008. .

EVANS, B. A. et al. Quantification of functional selectivity at the human $\alpha 1A$ -adrenoceptor. **Molecular Pharmacology**, 2011.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 35, n. 3, p. 161–214, 12 jan. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x>>.

FOSSLER, M. J. et al. Oliceridine (TRV130), a Novel G Protein–Biased Ligand at the μ -Opioid Receptor, Demonstrates a Predictable Relationship Between Plasma Concentrations and Pain Relief. I: Development of a Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model. **Journal of Clinical Pharmacology**, 2018.

FRANTZ, M. C. et al. Subtlety of the Structure-Affinity and Structure-Efficacy Relationships around a Nonpeptide Oxytocin Receptor Agonist. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2010.

FRANTZ, M. C. et al. LIT-001, the First Nonpeptide Oxytocin Receptor Agonist that Improves Social Interaction in a Mouse Model of Autism. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2018.

FREEMAN, S. M. et al. The neuroanatomical distribution of oxytocin receptor binding and mRNA in the male rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **Psychoneuroendocrinology**, 2014.

GALÉS, C. et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor–G protein complexes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 13, n. 9, p. 778–786, 13 set. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nsmb1134>>.

GARIBAY, J. L. R. et al. Analysis by mRNA levels of the expression of six G protein α -subunit genes in mammalian cells and tissues. **BBA - Molecular Cell Research**, 1991.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 629–683, 1 abr. 2001. Disponível em:

<<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.2.629>>.

GRINEVICH, V. et al. **Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain***Biological Psychiatry*, 2016. .

GULLIVER, D. et al. **Targeting the Oxytocin System: New Pharmacotherapeutic Approaches***Trends in Pharmacological Sciences*, 2019. .

GUREVICH, V. V.; GUREVICH, E. V. GPCRs and Signal Transducers: Interaction Stoichiometry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 7, p. 672–684, jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614718300750>>.

HAUSER, A. S. et al. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 12, p. 829–842, 27 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd.2017.178>>.

JUREK, B.; NEUMANN, I. D. The oxytocin receptor: From intracellular signaling to behavior. **Physiological Reviews**, 2018.

KABLAOUI, N.; VANASE-FRAWLEY, M.; SCIABOLA, S. Hybrid peptide-small molecule oxytocin analogs are potent and selective agonists of the oxytocin receptor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2018.

KATRITCH, V.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 531–556, 6 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>>.

KENAKIN, T. et al. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. **ACS Chemical Neuroscience**, 2012.

KIMURA, T. et al. Molecular characterization of a cloned human oxytocin receptor. **European Journal of Endocrinology**, 1994.

KOEHBACH, J. et al. Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. In: Biochemical Society Transactions, **Anais...**2013.

KOSHIMIZU, T. aki et al. **Vasopressin V1a and V1b receptors: From molecules to physiological systems***Physiological Reviews*, 2012. .

LEE, M. R. et al. **Targeting the oxytocin system to treat addictive disorders: Rationale and progress to date***CNS Drugs*, 2016. .

LEFKOWITZ, R. J. G Protein-coupled Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18677–18680, 24 jul. 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.273.30.18677>>.

MANNING, M. et al. **Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents***Progress in Brain Research*, 2008. .

MANNING, M. et al. Oxytocin and Vasopressin Agonists and Antagonists as Research Tools and Potential Therapeutics. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 4, p. 609–628, abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2826.2012.02303.x>>.

MANNING, M.; SAWYER, W. H. 4-Threonine-oxytocin: A more active and specific oxytocic agent than oxytocin. **Nature**, 1970.

MATSUZAKI, M. et al. **Oxytocin: A therapeutic target for mental disorders***Journal of Physiological Sciences*, 2012. .

MAUDSLEY, S.; MARTIN, B.; LUTTRELL, L. M. The Origins of Diversity and Specificity in G Protein-Coupled Receptor Signaling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 2, p. 485–494, ago. 2005. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.105.083121>>.

MCCUDDEN, C. R. et al. **G-protein signaling: Back to the future***Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005. .

MCGREGOR, I. S.; BOWEN, M. T. **Breaking the loop: Oxytocin as a potential treatment for drug addiction***Hormones and Behavior*, 2012. .

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, jul. 1963. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00897a025>>.

MEYER-LINDENBERG, A. et al. **Oxytocin and vasopressin in the human brain: Social neuropeptides for translational medicine***Nature Reviews Neuroscience*, 2011. .

MITCHELL, B. F.; FANG, X.; WONG, S. Oxytocin: A paracrine hormone in the regulation of parturition? **Reviews of Reproduction**, 1998.

MORRIS, A. J.; MALBON, C. C. Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1373–1430, 10 jan. 1999. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1999.79.4.1373>>.

MUTTENTHALER, M. et al. Subtle modifications to oxytocin produce ligands that retain potency and improved selectivity across species. **Science Signaling**, v. 10, n. 508, p. eaan3398, 5 dez. 2017. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scisignal.aan3398>>.

NAMKUNG, Y. et al. Monitoring G protein-coupled receptor and β -arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12178, 11 nov. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncomms12178>>.

NEUMANN, I. D. **Brain oxytocin: A key regulator of emotional and social behaviours in both females and males***Journal of Neuroendocrinology*, 2008. .

NEUMANN, I. D. The advantage of social living: Brain neuropeptides mediate the beneficial consequences of sex and motherhood. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 2009.

NEUMANN, I. D.; LANDGRAF, R. **Balance of brain oxytocin and vasopressin: Implications for anxiety, depression, and social behaviors***Trends in Neurosciences*, 2012. .

NISHIMORI, K. et al. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, 1996.

NISHIZATO, M. et al. Developmental changes in social attention and oxytocin levels in infants and children. **Scientific Reports**, 2017.

OLDHAM, W. M.; HAMM, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 60–71, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2299>>.

PARREIRAS-E-SILVA, L. T. et al. Functional New World monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promotes parental care in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 34, p. 9044–9049, 22 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1711687114>>.

PASSONI, I. et al. Carbetocin is a Functional Selective Gq Agonist That Does Not Promote Oxytocin Receptor Recycling After Inducing β -Arrestin-Independent Internalisation. **Journal of Neuroendocrinology**, 2016.

PUPPO, A. S. et al. **Recent updates on GPCR biased agonism** *Pharmacological Research*, 2016. .

QUOYER, J. et al. Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 52, p. E5088–E5097, 24 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1312515110>>.

REVERSI, A. et al. The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a “biased agonist” mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.

ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G. F.; KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 356–363, 20 maio 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature08144>>.

SATOH, Y. et al. ERK2 contributes to the control of social behaviors in mice. **Journal of Neuroscience**, 2011.

SAWYER, W. H.; MANNING, M. Synthetic Analogs of Oxytocin and the Vasopressins. **Annual Review of Pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 5–17, abr. 1973. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pa.13.040173.000253>>.

SEACHRIST, J. L.; FERGUSON, S. S. G. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. **Life Sciences**, v. 74, n. 2–3, p. 225–235, dez. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320503008282>>.

SHUKLA, A. K.; XIAO, K.; LEFKOWITZ, R. J. Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 9, p. 457–469, set. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000411000867>>.

SIUDA, E. R. et al. **Biased mu-opioid receptor ligands: a promising new generation of pain therapeutics** *Current Opinion in Pharmacology*, 2017. .

ŚLUSARZ, M. J.; SIKORSKA, E.; ŚLUSARZ, R. Interactions of vasopressin and oxytocin receptors with vasopressin analogues substituted in position 2 with 3,3'-diphenylalanine - a molecular docking study. **Journal of Peptide Science**, 2013.

SMITH, J. S.; LEFKOWITZ, R. J.; RAJAGOPAL, S. **Biased signalling: From simple switches to allosteric microprocessors***Nature Reviews Drug Discovery*, 2018. .

TAUBER, M. et al. The use of oxytocin to improve feeding and social skills in infants with prader-willi syndrome. **Pediatrics**, 2017.

VEENEMA, A. H.; NEUMANN, I. D. **Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours***Progress in Brain Research*, 2008.

VIERO, C. et al. REVIEW: Oxytocin: Crossing the Bridge between Basic Science and Pharmacotherapy. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 16, n. 5, p. e138–e156, out. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-5949.2010.00185.x>>.

VIOLIN, J. D. et al. Selectively Engaging β -Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 3, p. 572–579, dez. 2010. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.110.173005>>.

VIOLIN, J. D. et al. **Biased ligands at G-protein-coupled receptors: Promise and progress***Trends in Pharmacological Sciences*, 2014. .

W. GRUBER, C.; MUTTENTHALER, M.; FREISSMUTH, M. Ligand-Based Peptide Design and Combinatorial Peptide Libraries to Target G Protein-Coupled Receptors. **Current Pharmaceutical Design**, 2010.

WANG, J. et al. Gai is required for carvedilol-induced β 1 adrenergic receptor β -arrestin biased signaling. **Nature Communications**, 2017.

WANG, Z.; FERRIS, C. F.; DE VRIES, G. J. Role of septal vasopressin innervation in paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1994.

WEI, H. et al. Independent β -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10782–10787, 16 set. 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1834556100>>.

WEIS, W. I.; KOBILKA, B. K. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. **Annual Review of Biochemistry**, 2018.

WHALEN, E. J.; RAJAGOPAL, S.; LEFKOWITZ, R. J. **Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists***Trends in Molecular Medicine*, 2011. .

WISE, A.; JUPE, S. C.; REES, S. The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 43–66, 10 fev. 2004. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121419>>.

WISLER, J. W. et al. **Recent developments in biased agonism***Current Opinion in Cell Biology*, 2014. .

WOLFE, B. L.; TREJO, J. A. **Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis** *Traffic*, 2007. .

YANG, Y. et al. **Novel oxytocin receptor agonists and antagonists: A patent review (2002-2013)** *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2014. .