UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

EDSON KATEKAWA

Descoberta de ligantes do receptor de melanocortina-5 (MC5R) como candidatos a moduladores da sebogênese: estudos de modelagem por homologia, triagem virtual e ensaio celular

São Carlos

2018

EDSON KATEKAWA

Descoberta de ligantes do receptor de melanocortina-5 (MC5R) como candidatos a moduladores da sebogênese: estudos de modelagem por homologia, triagem virtual e ensaio celular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Rafael V. C. Guido

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2018

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.

Katekawa, Edson

Descoberta de ligantes do receptor de melanocortina-5 (MCR5) como candidatos a moduladores da sebogênese: estudos de modelagem por homologia, triagem virtual e ensaio celular / Edson Katekawa; orientador Rafael Victorio Carvalho Guido - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

72 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Sebogênese. 2. Receptor de melanocortina. 3. Receptor acoplado à proteína G. 4. Modelagem por homologia. 5. Triagem virtual baseada em estrutura. I. Victorio Carvalho Guido, Rafael, orient. II. Título.

À minha mãe,
que não pôde acompanhar
minha carreira profissional;
e ao meu pai,
pelo suporte oferecido
durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Rafael Guido, pelo apoio e atenciosa orientação desde meus primeiros passos na área de Modelagem Molecular.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio concedido através do Programa FAPESP Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas.

À Chemyunion Ltda, por ceder as horas de trabalho necessárias para o cumprimento integral do programa de mestrado.

À Natura Cosméticos S/A, por possibilitar a execução dos testes *in vitro*.

Ao Sr. Wagner Magalhães, que me apresentou constantes desafios ao longo dos anos, proporcionando possibilidades de crescimento científico, intelectual e profissional.

"Os eruditos são aqueles que leram coisas nos livros,
mas os pensadores, os gênios, os facho de luz e promotores da espécie humana
são aqueles que as leram diretamente no livro do mundo."

Arthur Schopenhauer

RESUMO

KATEKAWA, E. **Descoberta de ligantes do receptor de melanocortina-5 (MC5R) como candidatos a moduladores da sebogênese**: estudos de modelagem por homologia, triagem virtual e ensaio celular. 2018. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A acne é uma condição da pele multifatorial com implicações socioeconômicas importantes. Um dos principais fatores que contribuem com a sua etiologia é a superprodução de sebo. Até o momento, há poucos tratamentos seguros e eficazes disponíveis. O receptor de melanocortina-5 (MC5R), um receptor acoplado à proteína G da família das rodopsinas, é uma das proteínas responsáveis pela diferenciação de sebócitos e consequente produção de sebo, mas não há opções de tratamento através do antagonismo deste receptor. Neste trabalho, investigamos a melanocortina-5 como alvo molecular para a descoberta de ligantes como moduladores da sebogênese. Para tanto, empregamos estudos de modelagem por homologia e triagem virtual baseada em estrutura do alvo para construir um modelo 3D da MC5R e identificar de candidatos a ligantes da proteína, respectivamente. Em seguida, avaliamos o potencial de inibição da sebogênese em sebócitos SEBO662AR em meio lipogênico. Os resultados obtidos indicaram a descoberta de peptídeos e flavonoides com características inibidoras e estimuladoras da produção de sebo. Novos esqueletos moleculares foram identificados como promissores para a modulação da sebogênese. Os estudos realizados permitirão o desenvolvimento de novos ativos dermatológicos e cosméticos com potencial de modular a oleosidade da pele, de modo a contribuir com a mitigação dos efeitos da acne, psoríase, alopecia e seborreia, entre outras doenças.

Palavras-chave: Sebogênese. Receptor de melanocortina. Receptor acoplado à proteína G. Modelagem por homologia. Triagem virtual baseada em estrutura.

ABSTRACT

KATEKAWA, EDSON. **Discovery of ligands for the melanocortin-5 receptor (MC5R) as candidates of modulators of sebogenesis**: homology modeling studies, virtual screening and cellular assay. 2018. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Acne is a multifactorial skin condition with important socioeconomic implications. One of the main factors that contribute with its etiology is sebum overproduction. Until now, there are few safe, effective treatments available. Melanocortin-5 receptor (MC5R), a G protein-coupled receptor of the rhodopsin family, is one of the proteins responsible for sebocyte differentiation and consequent sebum production, but there are no options for treatment by antagonism of this receptor. In this work, we investigated MC5R as molecular target for the discovery of ligands as sebogenesis modulators. For that, we used homology modeling studies, and structure-based virtual screening in order to, respectively, build a MC5R 3D model and identify ligand candidates for this protein. Then, we evaluated their sebogenesis inhibition potential on SEBO662AR sebocytes in lipogenic conditions. The obtained results indicated the discovery of peptides and flavonoids with inhibitory and stimulatory sebum production characteristics. New scaffolds were identified as promising for sebogenesis modulation. The performed studies will allow the development of novel dermatologic and cosmetic actives with the potential to modulate skin oiliness in order to contribute to the mitigation of the effects of acne, psoriasis, alopecia and seborrhea, among other diseases.

Keywords: Sebogenesis. Melanocortin receptor. G-protein coupled receptor. Homology modeling. Structure-based virtual screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação de GPCR classe A inserido em membrana (acima) e seus domínios a partir do ponto de vista extracelular (abaixo).	28
Figura 2 -	Processo de descoberta de moduladores do receptor MC5R.	31
Figura 3 -	Sobreposição das TM5 das estruturas 4EIY (em verde) e 3V2Y, com representação da cadeia lateral do resíduo 5.50. A seta indica a diferença nos ângulos das hélices.	39
Figura 4 -	Alinhamento das sequências primárias dos receptores A2AR (PDB ID: 4EIY), S1PR (PDB ID: 3V2Y) e MC5R. Em vermelho, os resíduos idênticos. Em destaque amarelo, o alinhamento da hélice TM5 utilizando apenas a estrutura 3V2Y.	40
Figura 5 -	Gráficos de Ramachandran do modelo de MC5R construído (à esquerda, referente ao modelo sem minimização por dinâmica molecular; à direita, referente ao modelo minimizado).	41
Figura 6 -	Representação do receptor MC5R com os ligantes α -MSH (11-13) (à esquerda) e JNJ-10229570 (à direita) em seu sítio ortostérico.	41
Figura 7 -	Estruturas de A2A alinhadas representando os interruptores de transmissão (A) e de tirosina (B e C), além da tranca iônica. (receptor inativo, em verde; ativo, em azul; setas indicando a orientação do movimento das hélices em amarelo e movimento de resíduos, em roxo).	43
Figura 8 -	Interruptor molecular identificado no modelo de receptor MC5R.	44
Figura 9 -	Barreira hidrofóbica no interior do modelo de receptor MC5R.	45
Figura 10 -	Interações entre diversos resíduos nas proximidades de Y295 ^{7.53}	45
Figura 11 -	Interação entre os resíduos W251 ^{6.48} e N287 ^{7.45}	46
Figura 12 -	Interações polares entre E92 ^{2.60} e N278 (A), entre D119 ^{3.29} e os resíduos S181 e T184 da EL2 (B), entre R112 e D115 ^{3.25} e F110 da EL1 (C) e entre H257 ^{6.54} e Y269 (D).	47
Figura 13 -	Rede de interações nas proximidades de D82 ^{2.50}	48
Figura 14 -	Sistemática de triagem virtual baseada em estrutura empregado neste trabalho. ..	50
Figura 15 -	EGCG docado em modelo de MC5R.	51
Figura 16 -	Amostras de imagens de fluorescência de sebócitos SEBO662AR nos testes <i>in vitro</i> . Células incubadas: sem estímulo, com estímulo, com estímulo e referência de inibição (cerulenina a 10 μ M).	58
Figura 17 -	Taxas de inibição de sebogênese nos testes <i>in vitro</i>	60

Figura 18 -	Amostras de imagens de fluorescência de sebócitos SEBO662AR nos testes <i>in vitro</i> . Células incubadas: sem estímulo, com estímulo, com estímulo e referência de inibição (cerulenina) e com estímulo e substâncias inibidoras de produção de sebo selecionadas por modelagem molecular.	72
Figura 19 -	Amostras de imagens de fluorescência de sebócitos SEBO662AR nos testes <i>in vitro</i> . Células incubadas: sem estímulo, com estímulo, com estímulo e referência de inibição (cerulenina) e com estímulo e substâncias estimuladoras de produção de sebo selecionadas por modelagem molecular.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Delineamento experimental dos ensaios de eficácia realizados em sebócitos humanos SEBO662AR.	35
Tabela 2 - Resíduos X.50 para diversos GPCR Classe A (Homo sapiens).	37
Tabela 3 - Lista das cem moléculas mais bem posicionadas na triagem inicial, ordenadas por ranking baseado em consenso.	52
Tabela 4 - Energias livres de ligação entre as moléculas selecionadas para teste in vitro, usando o protocolo MM-GBSA. Em destaque, o valor de energia livre de ligação encontrado para a molécula JNJ-10229570.	56
Tabela 5 - Concentrações máximas não-citotóxicas obtidas nos testes de citotoxicidade em sebócitos SEBO662AR.	57
Tabela 6 - Modulação de sebogênese pelas moléculas identificadas neste trabalho.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D:	Tridimensional
7TM:	Sete hélices transmembrânicas
cAMP:	Adenosina monofosfato cíclica
CSV:	Valores separados por vírgula (formato de arquivo)
EL:	Alça extracelular
EL n :	Alça extracelular n
EGCG:	Galato de epigallocatequina
EPP:	Protoporfiria eritropoiética
FASTA:	Fast-All (formato de arquivo)
FF:	Campo de força
G α CT:	Porção C-terminal da proteína G α
GPCR:	Receptor acoplado à proteína G
GScore:	Glide Score (função de classificação)
HTS:	<i>High throughput screening</i> , triagem de alta produtividade
IL:	Alça intracelular
IL n :	Alça intracelular n
MC5R:	Receptor de melanocortina-5
MM-GBSA:	Mecânica molecular – área de superfície generalizada de Born
MSH:	Hormônio estimulador de melanócitos
PDB:	<i>Protein Data Bank</i> , ou banco de dados de proteínas
POMC:	Proopiomelanocortina
QM:	Mecânica quântica
RAR- β :	Receptor de ácido retinóico beta
RMS:	Raiz do valor quadrático médio
TM:	Hélice transmembrânica
TM n :	Hélice transmembrânica n
YLD:	anos perdidos devido a incapacitação

LISTA DE SÍMBOLOS

°:	graus
GB:	Gigabytes
GHz:	Gigahertz
Kcal/mol:	quilocalorias por mol
Kcal/mol/Å:	quilocalorias por mol por ångstrom
μM:	micromolar
®:	Marca registrada
US\$:	Dólares americanos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	Sebogeneze e modelagem molecular	25
2	OBJETIVO	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	333
3.1	Estudos <i>in silico</i>	344
3.1.1	Seleção de estruturas moleculares para triagem virtual	344
3.1.2	Construção do modelo estrutural tridimensional do receptor MC5R	355
3.1.3	Ensaio de triagem virtual	355
3.1.4	Seleção de compostos promissores.....	366
3.2	Estudos <i>in vitro</i>	366
4	RESULTADOS	399
4.1	Construção do modelo estrutural tridimensional do receptor MC5R	399
4.1.1	Escolha das proteínas-molde (<i>templates</i>).....	399
4.1.2	Construção do modelo 3D	40
4.1.3	Interruptores moleculares e ativação de GPCR	433
4.2	Triagem virtual	50
4.3	Estudos <i>in vitro</i>	588
5	DISCUSSÃO.....	633
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXO A – Ensaio celular realizado na Bioalternatives (França)	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sebogênese e modelagem molecular

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem a função de manter a homeostase e proteger o indivíduo de ameaças externas. Neste sentido, o sebo – material oleoso produzido pelas glândulas sebáceas – tem importância crucial na lubrificação e impermeabilização da pele. A ausência de sebo está relacionada às dificuldades no aumento de peso corporal, hiperqueratose e anomalias nos folículos capilares. (1) Por outro lado, a produção excessiva de sebo está associada a outros tipos de afecções, como seborreia, dermatites e acne. Os sebócitos são as principais células da glândula sebácea. Após uma etapa de maturação e diferenciação, passam a sintetizar e acumular substâncias lipídicas. O sebo, que é composto de todo o material contido no citoplasma do sebócito, é liberado ao lúmen com o rompimento da membrana plasmática - que, conseqüentemente, leva à morte da célula. Este é um processo de secreção de glândulas exócrinas conhecido como holócrino. (2)

De acordo com relatório de 2016 do *Global Burden of Disease*, as doenças de pele estão entre as enfermidades mais prevalentes. (3) Os impactos das enfermidades dermatológicas não se resumem à pele; efeitos psicológicos e socioeconômicos podem perdurar por muito tempo após a cura das lesões. (4) A acne vulgar (referida neste documento como acne) surge como a 13ª doença mais prevalente e a 14ª em número de casos, afetando mais de 614 milhões de pessoas e acumulando um valor de anos vividos com a doença ou anos perdidos devido a incapacitação (YLD, do inglês, *years lived with disease* ou *years lost due to disability*, respectivamente) de, aproximadamente, 16 milhões de anos. (3) Estima-se que o mercado global para tratamento de acne se aproximou de US\$ 5 bilhões em 2016 e a expectativa é que supere US\$ 7 bilhões em 2025. (5) Ainda assim, o desenvolvimento de novos agentes contra a acne é considerado estagnado. (6)

A acne é uma doença inflamatória crônica que atinge os folículos das glândulas sebáceas. Excessiva produção de sebo, inflamação, queratinização dos folículos e proliferação de *Cutibacterium acnes* (anteriormente conhecido como

Propionibacterium acnes) na unidade pilossebácea são algumas de suas características fisiopatológicas. (7) Os principais tratamentos contra a acne estão relacionados com o controle da proliferação de *C. acnes* por antibióticos, com o controle da produção de sebo por retinóides ou antiandrógenos, ou ainda com agentes comedolíticos.

As descobertas mais recentes indicam que a proliferação de *C. acnes* não é a causa iniciadora da acne; pacientes com acne possuem este micro-organismo em quantidades equivalentes às de pessoas com pele saudável, embora algumas linhagens de *C. acnes* estejam associadas à incidência da doença e seus reflexos inflamatórios. (8) Há anos que o aumento da resistência deste micro-organismo frente aos antibióticos utilizados no tratamento da acne vem sendo apontado e monoterapias vem sendo desencorajadas. (9)

Considera-se a produção excessiva de sebo como um dos principais fatores contribuintes para a patogênese da acne, visto que não se observa acne quando a secreção de sebo é baixa. (10) Dentre os agentes reguladores da sebogênese, os andrógenos são considerados os principais hormônios relacionados à atividade da glândula sebácea. (11) Assim, diversos ingredientes cosméticos foram desenvolvidos para combater a oleosidade excessiva da pele através da inibição seletiva da enzima 5 α -redutase, entre eles cita-se: Sepicontrol A5[®] (Seppic), Zincidone[®] (Solabia) e Cytobiol Iris A2[®] (Gattefossé). Outro agente eficaz na redução da produção de sebo é a isotretinoína. Embora venha sendo utilizada com sucesso por muitos anos, os efeitos adversos incluem mialgia, cansaço e dor de cabeça. Além disso, alguns efeitos adversos raros são muito graves, como lesões oculares, alterações de humor e ideação de suicídio. (12) Por fim, a teratogenicidade é o efeito adverso mais comumente associado à esta substância. (13)

Dentre as mais novas abordagens no controle da produção de sebo para o tratamento da acne, destacam-se os antagonistas de neuropeptídeos regulatórios, como o JNJ-10229570 (JOHNSON & JOHNSON) (14) e a afamelanotida (Nle4-D-Phe7- α -MSH, Scenesse[®]). (15) A afamelanotida foi desenvolvida pela Clinuvel Pharmaceuticals como agonista do receptor de melanocortina-1, com foco no tratamento da protoporfiria eritropoiética (EPP); esta molécula também levou a redução no número de lesões acneicas, embora não se tenha o mecanismo de ação

elucidado experimentalmente. Os testes clínicos visando tratamento para acne foram interrompidos pela Clinuvel; no blog da empresa consta a informação de que a empresa entende ser mais importante focar no combate à EPP e, eventualmente, vitiligo. (16-17) As evidências de que o receptor de melanocortina-5 (MC5R) teria papel fundamental na produção de sebo já havia sido determinada previamente quando a divisão de produtos dermatológicos da Johnson & Johnson desenvolveu o JNJ-10229570. (18-19) Os efeitos observados na administração deste fármaco levaram à redução da produção de sebo e redução do tamanho da glândula sebácea. O mecanismo de ação foi elucidado, tendo sido demonstrado que o fármaco é antagonista dos receptores de melanocortina 1 e 5. Embora os resultados tenham se mostrado promissores, a área responsável pelo desenvolvimento deste fármaco foi vendida para a Valeant Pharmaceuticals (atualmente, Ortho Dermatologics), que resolveu descontinuar o projeto – à época, em testes clínicos em fase II. Até o momento, não há relatos de que o antagonismo deste alvo seja inviável em testes *in vivo* e tampouco foram descobertos outros fármacos como antagonistas do MC5R. Portanto, este receptor permanece como um potencial alvo molecular para o tratamento ou mitigação da excessiva produção de sebo, tanto para fins dermatológicos como cosméticos.

O MC5R é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) da família das rodopsinas (Classe A) com 325 resíduos. Como todos os GPCR, é um receptor presente na interface da membrana plasmática e é composto por sete hélices alfa transmembrânicas (7TM) ligadas por alças intra- e extracelulares (IL e EL, respectivamente). Sua porção N-terminal situa-se na região extracelular e a porção C-terminal, na região intracelular. Possui, ainda, uma oitava hélice alfa, não transmembrânica, acoplada à TM7. O MC5R atua como verdadeiro transdutor de sinal, o qual responde à presença extracelular de um agonista, melanocortinas, que leva ao aumento da concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). (20) O MC5R é expresso nas células diferenciadas no centro das glândulas sebáceas, sendo que células indiferenciadas basais não expressam este receptor. (21) Não há, até o momento, estrutura tridimensional depositada no banco de dados de proteínas (PDB, do inglês, *Protein Data Bank*) de nenhum receptor de melanocortina e apenas recentemente foram publicados estudos de interação ligante-MC5R. (22)

Figura 1 - Representação de GPCR classe A inserido em membrana (acima) e seus domínios a partir do ponto de vista extracelular (abaixo). Fonte: Elaborada pelo autor.

Em GPCR classe A, é comum utilizar o esquema de numeração de resíduos desenvolvido por Ballesteros e Weinstein, baseado na presença de resíduos conservados nas TM. (23) A numeração tem, como prefixo, o número da TM, seguido de ponto. O resíduo mais conservado recebe o sufixo 50, e os demais resíduos são numerados de acordo com a distância deste resíduo. A Tabela 2 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra os resíduos mais conservados (X.50) para diversos GPCR classe A humanos, onde se pode notar que o resíduo 5.50 é menos conservado que os X.50 das demais TM.

Tabela 1 - Resíduos X.50 para diversos GPCR Classe A (*Homo sapiens*).

GPCR	1.50	2.50	3.50	4.50	5.50	6.50	7.50
CB1	N134	D163	R214	W241	L286	P358	P394
β2 muscarínico	N51	D79	R131	W158	P211	P288	P323
μ opioide	N88	D116	R167	W194	P246	P297	P335
M2	N41	D69	R121	W148	P198	P402	P437
Rodopsina	N55	D83	R135	W161	P215	P267	P303
A2A	N24	D52	R102	W129	P189	P248	P285
P2Y12	N43	D70	R122	W149	N201	P251	P295
S1P1	N63	D91	R142	W168	L213	P271	P308
MC5R	N54	D82	R140	W167	H207	P253	P292

Fonte: ISBERG et al. (24)

Sendo assim, com base no impacto socioeconômico da acne, a escassez de tratamentos seguros e eficazes contra a oleosidade excessiva da pele (e suas consequências) e as evidências científicas de um promissor alvo molecular para a modulação da atividade das glândulas sebáceas, esta dissertação descreve e discute os estudos de modelagem molecular com o receptor de melanocortina-5 (MC5R) para a descoberta de novos antagonistas como candidatos a moduladores da sebogênese.

2 OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi a descoberta de novos ligantes do receptor de melanocortina-5 como candidatos a moduladores da sebogênese. Para tanto foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Construção de modelo estrutural tridimensional do receptor;
- Seleção e preparação de estruturas moleculares para triagem virtual;
- Ensaios de triagem virtual;
- Seleção de compostos promissores;
- Avaliação de segurança e eficácia *in vitro*;
- Desenvolvimento de produto a partir de fontes naturais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizados métodos computacionais e biológicos para a descoberta de moléculas capazes de modular a sebogênese através de seu efeito sobre o receptor MC5R. O processo empregado está esquematizado conforme a Figura 2.

Figura 2 - Processo de descoberta de moduladores do receptor MC5R.
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1 Estudos *in silico*

Os estudos *in silico* foram executados nos seguintes sistemas:

- Dell Precision Tower 7910, equipada com processador Intel® Xeon® E5-2650 v3 2,30GHz 10 núcleos, 16GB de memória, placa de vídeo NVIDIA® Quadro® K2200 e sistema operacional CentOS Linux 7 (64-bit). Softwares instalados: Schrödinger Biological Suite, Schrödinger PyMOL, Certara SYBYL-X Suite, Cambridge Crystallography Data Centre GOLD, OpenBabel.
- Notebook Apple MacBook Pro 13”, equipado com processador Intel®i5 dual core 2,3 GHz, 16 GB de memória, processador gráfico Intel®HD Graphics 3000 e sistemas operacionais Ubuntu Linux 14.04 e OS X El Capitan. Softwares instalados: MODELLER, Schrödinger PyMOL, OpenBabel, Cambridge ChemDraw 15.0.

3.1.1 Seleção de estruturas moleculares para triagem virtual

Os arquivos com as estruturas moleculares de pequenas moléculas foram obtidos na base de dados gratuita ZINC (25), subconjunto “Zbc – ZINC Biogenic Compounds” (que contém apenas metabólitos primários e secundários), bem como na base de dados DIVERSet-EXP fornecida pela empresa ChemBridge (San Diego, CA, EUA) e no catálogo virtual fornecido pela empresa ChromaDex (Irvine, CA, EUA).

Os arquivos com as informações de coordenadas atômicas foram tratados utilizando o software LigPrep versão 3.5 incluso na suíte Schrödinger Release 2015-3 (Schrödinger, Nova York, NY, EUA) para eliminação de compostos na forma salina, geração de tautômeros, geração de estados de ionização (considerando solução aquosa a pH 7 ± 2), manutenção da quiralidade especificada e exploração dos demais centros quirais, atribuição de cargas parciais utilizando o campo de força OPLS_2005 (26) e minimização de energia das estruturas e conversão para o formato de arquivo mol2.

3.1.2 Construção do modelo estrutural tridimensional do receptor MC5R

A sequência de aminoácidos do receptor MC5R foi obtida no sítio UniProt.org. (27) A escolha das proteínas-molde foi feita com o auxílio das ferramentas online BLAST (28) e GPCRDB. (24) Os arquivos com as estruturas tridimensionais das proteínas-molde foram obtidos no *Protein Data Bank*. (29) O modelo estrutural tridimensional foi construído utilizando o software MODELLER. (30) A energia do modelo foi minimizada utilizando os protocolos presentes nos softwares Prime versão 4.1 (31) e Desmond Molecular Dynamics System versão 4.3 (32) e o modelo foi validado através de docagem virtual dos ligantes α -MSH(11-13) e JNJ-10229570 através do uso do software Glide 6.8 (33) inclusos na suíte Schrödinger Release 2015-3 (Schrödinger, Nova York, NY, EUA).

3.1.3 Ensaios de triagem virtual

Para as triagens virtuais, o sítio de ligação foi definido com base nos estudos de mutagênese versus interação com NDP- α -MSH de Yang (22), sendo que a cavidade selecionada para exploração na triagem virtual foi composta pelos resíduos E92^{2.60}, T93^{2.61}, I96^{2.64}, D115^{3.25}, F118^{3.28}, D119^{3.29}, I122^{3.32}, C123^{3.33}, V126^{3.36}, F177^{4.60}, I187^{5.30}, L190^{5.33}, W251^{6.48}, F254^{6.51}, F255^{6.52}, H257^{6.54}, L258^{6.55}, M261^{6.58}, H276^{7.33}, F277^{7.34}, L281^{7.38} e I284^{7.41}, além dos resíduos S183, T184 e Y185 da EL2 e Y269 da EL3.

Foram utilizados os softwares Glide versão 6.8, GOLD versão 5.3 (*Cambridge Crystallographic Data Centre*, Cambridge, Reino Unido) (33) e Surflex-Dock incluso na suíte SYBYL-X versão 2.1.1 (Certara, Princeton, NJ, EUA). (34)

Na etapa de triagem inicial, todos os softwares foram ajustados na precisão padrão (SP para o Glide, 20% para o GOLD, Screen para o Surflex-Dock). A partir deste primeiro ensaio, uma lista de consenso foi construída com base na função score de cada software. As posições no ranking foram somadas e as moléculas foram classificadas por soma em ordem crescente. Moléculas com variações nos rankings acima de 5% foram desqualificadas para a etapa seguinte.

As 100 (cem) moléculas mais bem posicionadas no ranking foram selecionadas para uma etapa de redocagem, onde se utilizou o modo QM-Polarized

Ligand Docking do software Glide, que foi configurado para reatribuição de cargas parciais dos ligantes por mecânica quântica, usando conjunto de bases químicas 6-31G*/LACVP* com método híbrido da Teoria do Funcional de Densidade B3LYP e convergência do método Ultrafine SCF (self-consistent field). As estruturas que passaram por esse tratamento foram redocadas nos três softwares, em modo de precisão máxima (XP para o Glide, 100% para o GOLD e GeomX para o Surflex-Dock), com e sem uso do cálculo de cargas parciais através de campos de força. Desta forma, cada molécula foi docada mais uma vez em seis condições diferentes, em máxima precisão.

3.1.4 Seleção de compostos promissores

As 600 poses referentes às docagens das 100 moléculas mais bem posicionadas no ranking por consenso foram visualmente inspecionadas utilizando os softwares PyMol versão 1.7.7.2 e Maestro versão 10.3 (Schrödinger, Nova York, NY, EUA). Poses com choque estérico evidente foram consideradas inadequadas, enquanto que interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, empilhamento π -cátion e π - π foram consideradas favoráveis. As moléculas com as melhores poses e, preferencialmente, com boas poses na maioria das docagens, foram consideradas promissoras e tiveram a energia livre de ligação estimada através do protocolo existente no software Prime MM-GBSA (do inglês, *Molecular Mechanics – Generalized Born Surface Area*). Padrões puros das substâncias disponíveis à época foram adquiridos e codificados para serem testados quanto ao efeito sobre a sebogênese em ensaios *in vitro*.

3.2 Estudos *in vitro*

Os ensaios de segurança prévia foram realizados em triplicata, em modelo de sebócitos humanos SEBO662AR (35) através de método de redução de MTT com detecção fotométrica, sob estímulo celular basal. Os testes de eficácia *in vitro* foram conduzidos em triplicata, também em cultura de sebócitos SEBO662AR, segundo o desenho experimental indicado na Tabela .

Tabela 2 - Delineamento experimental dos ensaios de eficácia realizados em sebócitos humanos SEBO662AR.

	Cerulenina	Fator lipogênico
Controle	-	-
Controle positivo	-	+
Referência	+	+
Candidatos	-	+

Fonte: Elaborada pelo autor.

As concentrações máximas a serem utilizadas nos ensaios de eficácia foram determinadas pelos resultados dos ensaios de segurança realizados previamente. As amostras foram distribuídas em três placas e foram pré-incubadas com os candidatos por 4 horas, passando para uma incubação de 7 dias em meio contendo vitamina C, vitamina D3, insulina e cálcio para estimular a lipogênese. Após a incubação, as células foram lavadas, fixadas e permeabilizadas. As gotículas lipídicas no interior das células foram marcadas com uma sonda Bodipy para a marcação de lipídeos neutros. Paralelamente, os núcleos das células foram corados com solução de bis-benzimida (Hoechst 33258). A medida de fluorescência dos lipídeos, normalizada pelo número de células presentes, foi considerada como parâmetro de eficácia de redução de sebogênese. Foram utilizados controles sem meio lipogênico, controle com meio lipogênico e a referência para avaliação de redução de lipogênese em meio lipogênico foi feita na presença de cerulenina (inibidor de síntese de ácidos graxos e esteróis). Os testes *in vitro* foram realizados na empresa Bioalternatives (França).

4 RESULTADOS

4.1 Construção do modelo estrutural tridimensional do receptor MC5R

4.1.1 Escolha das proteínas-molde (*templates*)

De acordo com o estudo de Rataj e colaboradores, a proteína-molde (*template*) não precisa ser necessariamente a proteína mais próxima evolutivamente. (37) Ainda, também foi encontrada na literatura a construção de quimeras de GPCR para posterior uso em triagem virtual, com resultados positivos. (38) Desta forma, tendo como entrada o código referente ao receptor MC5R no UniProt (ID P33032), a busca utilizando a ferramenta BLAST, restringindo apenas às proteínas com estrutura depositada no *Protein Data Bank* e significância estatística de 0,001 (ou seja, com menor chance de que uma escolha foi feita por acaso) gerou uma lista de possíveis candidatos a proteína-molde. Como proteína-molde principal, a estrutura escolhida foi a do receptor de adenosina A2A (PDB ID 4EIY, cadeia A) (39), pois possui uma das maiores identidades (30%), além de ter o maior *score* total, a melhor resolução (1,8 Å) e há um antagonista cocrystalizado – o que aumenta a chance de preservação de interruptores moleculares presentes nos GPCR, mantendo o receptor na forma inativa. Entretanto, após uma análise cautelosa das sequências do receptor-alvo e dos candidatos a proteína-molde, foi observado que poderia haver uma distorção não justificada da hélice transmembrânica 5 (TM5) se apenas a estrutura 4EIY fosse utilizada devido à presença de um resíduo de prolina (Pro208^{5.50}) na proteína-molde. Sendo assim, decidiu-se utilizar também a estrutura do receptor esfingosina-1-fosfato (PDB ID 3V2Y, cadeia A) (40), que possui o resíduo L213^{5.50} que substitui a Pro208^{5.50} em sua TM5, para ser usada como molde desta TM. Esta estrutura também está na forma inativa, possui um antagonista co-cristalizado e está em resolução de 2,8 Å. Enquanto o ângulo formado entre o resíduo 5.50, o primeiro e último resíduo da TM5 da estrutura 4EIY é de 171°, na estrutura 3V2Y este ângulo é de 176° (Figura 3).

Figura 3 - Sobreposição das TM5 das estruturas 4EIY (em verde) e 3V2Y, com representação da cadeia lateral do resíduo 5.50. A seta indica a diferença nos ângulos das hélices.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O servidor GPCRDB (disponível em <http://tools.gpcr.org>) é um repositório de dados e aplicativos voltados a estruturas de GPCR. Esse servidor também foi utilizado de modo a comparar os resultados de seleção de proteínas-molde para alinhamento e construção do modelo 3D. Como dado de entrada, foi selecionado o receptor MC5R na ferramenta de seleção de proteínas-molde; foi aplicado, ainda, um filtro para que apenas estruturas de GPCR Classe A (ou seja, da família da rodopsina) co-cristalizadas com antagonista fossem selecionados. Para tanto, foi utilizada a ferramenta de alinhamento da base de dados cujo resultado indicou uma lista já ranqueada pela similaridade e a numeração dos resíduos para GPCR segundo Ballesteros-Weinstein. O alinhamento no formato FASTA ou CSV foi exportado e utilizado para a construção do modelo 3D do MC5R.

4.1.2 Construção do modelo 3D

Após a escolha das proteínas-molde e da transferência dos arquivos eletrônicos contendo as coordenadas atômicas das estruturas depositadas no PDB, seguiu-se com a construção do modelo 3D do MC5R utilizando o software MODELLER. Brevemente, MODELLER analisa a estrutura das proteínas-molde e extrai as restrições espaciais (distâncias e ângulos de ligação) das partes homólogas entre as proteínas-molde e proteína-alvo com base no alinhamento entre as

sequências primárias. Em seguida, as restrições espaciais (i.e., coordenadas x, y, z) são transferidas para o modelo que tem a energia total minimizada para eliminação de violações espaciais. Para tanto, MODELLER utiliza algoritmos de otimização de energia por gradiente conjugado e recozimento simulado (do inglês, *simulated annealing*). O alinhamento produzido pelos scripts do MODELLER foi manualmente editado para que a TM5 fosse inteiramente modelada de acordo com a TM5 do receptor de esfingosina-1-fosfato. O alinhamento utilizado para a modelagem do MC5R está apresentado na Figura 4.

aln.pos	10	20	30	40	50	60	
4E1YA	-----	-----	APPIMGSSVYITVELAIAVLAI	LG	NVLV	CWAVWLNSNLQ	
3V2YA	-----	VSDYVNYDIIVRHYNTGKL	NISADKENS	IKLTSVVFILICCFI	LEN	IFVLLTIWTKKFFH	
mc5r	MNSSFHLHFLDLNLNATEGNLSGPNVKNKSSPCEDMGIAVEVFLTLGVISL	LEN	ILVIGAIVKKNLH				
aln.p	70	80	90	100	110	120	130
4E1YA	NVTNYFVVS	LAAAD	IAVGVLAI	PF	AI-----	TISTGFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIF	SLL
3V2YA	RPMYYFIGN	LALSD	LLAGVAYTANLL	-----	LSGATTYKLT	PAQWFLREGSMFVALSASVF	SLL
mc5r	SPMYFVCS	LAVAD	MLVSMSSAWETIT	ITYLLNNKHLVIADA	--FVRHIDNVFDSMICISVVASMC	SLL	
aln.pos	140	150	160	170	180	190	200
4E1YA	AIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGI	IAICW	VLSFAIGLTPMLGWNNCGQPK	EGKNHSQ	CGEGQV		
3V2YA	AIAIERIYITMLK/NNF	-----	RLFLLISACW	VISLILGGLPIMGWNCISALSS	-----		
mc5r	AIAVDRYVTIFYALRYHHIMTARRSGAI	ITAGI	WAFCTGCGIVFILYSES	-----			
aln.pos	210	220	230	240	250	260	270
4E1YA	ACLFEDVVMNYMVFNFACVLV	-----	-----	-----	PLLLMLGVYLRIFLAARRQL	/---	
3V2YA	-----	STVLPLYHKHYILFCTTVFT	LLLLSIV	ILYLCRIYS	LV	TR	/A---
mc5r	-----	TYVILCLISMFF	AM	LFLVSLYI	HMFL	LARTH	-----VKRIA
aln.pos	280	290	300	310	320	330	340
4E1YA	--/ERARSTLQKEVHAAKSLAIIVGL	FALCWL	PLHIINCF	TF	CPDCSHAPLWLMY	--LAIV	LSHTNS
3V2YA	-----	SRSENVAL	LKTVIIIVLSVFIACWAP	LFI	LLLDVGC	KVKTCDILFRAE	--YFLVLAVLNS
mc5r	ALPGASSARQRTSMQGA	VTMTLLGV	FTVCWAP	FFLHLTLM	LSCPQ	NLYCSR	FM
aln.pos	350	360					
4E1YA	VVNPFIYAYRIREFRQTFRKI	IRSHV	/-A.-				
3V2YA	GTNP	IIYTLTNKEMRA	FIRIMGRPL	----			
mc5r	VMD	PLIYA	FRSOEMRKT	FKELICRGFR	-..		

Figura 4 – Alinhamento das sequências primárias dos receptores A2AR (PDB ID: 4E1Y), S1PR (PDB ID: 3V2Y) e MC5R. Em vermelho, os resíduos idênticos. Em destaque amarelo, o alinhamento da hélice TM5 utilizando apenas a estrutura 3V2Y.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O refinamento de alças foi feito na região da proteína compreendida entre os resíduos 1–32, 99–111, 213–226 e 271–276. O modelo com alças refinadas seguiu para minimização de energia na suíte da Schrödinger, com modelo de solvatação VSGB e membrana implícita alinhada às hélices, dois ciclos de interações com 65 passos cada, gradiente de raiz do valor quadrático médio (RMS) para convergência de 0,01 Kcal/mol/Å.

Para validar o modelo, foi analisado o gráfico de Ramachandran (Figura 5) bem como estudos de modelagem com os antagonistas de MC5R JNJ-10229570 e α -MSH(11-13) (Figura 6 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Figura 5 - Gráficos de Ramachandran do modelo de MC5R construído (à esquerda, referente ao modelo sem minimização por dinâmica molecular; à direita, referente ao modelo minimizado).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6 - Representação do receptor MC5R com os ligantes α -MSH (11-13) (à esquerda) e JNJ-10229570 (à direita) em seu sítio ortostérico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível observar que, de acordo com o gráfico de Ramachandran correspondente ao modelo construído, após a etapa de minimização de energia por simulação de dinâmica molecular, quase todos os resíduos de aminoácidos apresentam ângulos energeticamente favoráveis (fundo vermelho) ou permitidos

(fundo amarelo), com a exceção de um único aminoácido (D100), que está em região de alça, fora do sítio de ligação. Como regiões de alça possuem alta mobilidade estrutural, a presença do D100 em região não permitida é relativamente pouco relevante neste estudo. Portanto, o modelo está em conformidade com as restrições espaciais típicas de proteínas encontradas na natureza.

A docagem virtual com os ligantes α -MSH (11-13) e JNJ-10229570, ambos com comprovada atividade frente ao MC5R, utilizando o software Glide, indicou GScore de -9,62 Kcal/mol e -6,66 Kcal/mol, respectivamente, sugerindo que há interação entre o modelo construído e os ligantes mencionados, dando mais um indício de robustez do modelo. A função GScore do software Glide XP é uma equação que leva em conta as interações eletrostáticas e de van der Waals entre receptor e ligante e dá uma estimativa da energia de ligação com exatidão na faixa de alguns Kcal/mol. O GScore, na prática é capaz de distinguir moléculas ativas de moléculas que não apresentam atividade biológica. Para efeitos de comparação da grandeza do GScore obtidos nos ensaios de docagem virtual, em recente trabalho que também envolveu estudos *in silico* e *in vitro* integrados, o GScore observado para ligantes biologicamente ativos ficou entre -3,29 Kcal/mol e -12,18 Kcal/mol (41), de modo que os valores encontrados nas simulações deste estudo são compatíveis com atividade biológica em simulações similares descritas em outros estudos.

4.1.3 Interruptores moleculares e ativação de GPCR

O atual entendimento sobre o mecanismo de ativação de GPCR por intermédio de agonistas é que ele se dá através de um complexo mecanismo envolvendo o rompimento de interações intramoleculares conhecidas como interruptores moleculares. Quando um agonista se liga ao sítio ativo do receptor, há um movimento da TM6, que tende a se aproximar do ligante. Esta aproximação costuma estar acompanhada de uma rotação no plano horizontal, guiada pelo reposicionamento dos resíduos conservados W^{6.48} e F/Y^{6.44} em direção à P^{5.50} (Figura 7^a). Como consequência, uma barreira de resíduos hidrofóbicos constituída pelos resíduos L^{2.43}, L^{2.46}, L^{3.43}, L^{3.46}, M^{6.36} e M^{6.40} se abre (interruptor de transmissão; interruptor global) e resíduos de tirosina se rearranjam para ocupar os espaços

oriundos da movimentação (Figura 7B). Isso leva à extensão de uma rede de ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água que vai desde a região do sítio ativo até os resíduos conservados DRY na TM3 (interruptor de tirosina)(Figura 7C). O motivo DRY, que interage com a TM6 através dos resíduos E^{6.30} e T^{6.34} quando o receptor está na forma inativa (tranca iônica), fica mais distante da TM6 (Figura 7D), abrindo espaço para a ligação do peptídeo GαCT, possibilitando assim a ativação da proteína G.

Figura 7- Estruturas de A2A alinhadas representando os interruptores de transmissão (A) e de tirosina (B e C), além da tranca iônica. (D); receptor inativo, em verde; ativo, em azul; setas indicando a orientação do movimento das hélices em amarelo e movimento de resíduos, em roxo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Portanto, o planejamento racional de um ligante antagonista para estes receptores deve levar em consideração não apenas a ocupação do sítio ativo, como também a possibilidade de manutenção dos interruptores moleculares em seu estado

intacto, quando existentes, para a potencialização do efeito. Da mesma forma, um agonista deve ser capaz de romper tais dispositivos para que a ativação do receptor possa ocorrer.

A posição relativa entre os resíduos D139^{3.49}, R140^{3.50}, Y150 e S233^{6.30} do modelo construído sugere a existência de interações que se assemelham funcionalmente à tranca iônica (Figura 8). Neste caso, esta serina ocuparia a posição do resíduo ácido glutâmico (E^{6.30}) identificado em trancas similares da família da rodopsina, de modo que, a rigor, não se trata exatamente de uma tranca iônica e, sim, baseada em ligação de hidrogênio. Estas interações não são observadas nos moldes 4EIY (42) e 3V2Y; conferem grande restrição conformacional a alça intracelular 2 (IL2) e podem ter influência na ativação da proteína G (43). Embora não tenham sido previamente reportadas até o momento, estas interações observadas no modelo construído não foram confirmadas experimentalmente.

Figura 8 – Interruptor molecular identificado no modelo de receptor MC5R (à esq.) e tranca iônica na rodopsina (PDB ID 1GZM, à direita).

Fonte: Elaborada pelo autor.

No modelo construído, é possível observar alguns elementos que pressupõem a existência do interruptor de tirosina como o resíduo conservado Y295^{7.53} do motivo nPxxY na TM7 e a barreira de resíduos hidrofóbicos delimitada pelos resíduos V75^{2.43}, L78^{2.46}, L133^{3.43}, I136^{3.46} e L243^{6.40} (Figura 9). Uma rotação da TM6 no plano horizontal provocaria um maior distanciamento entre estes resíduos hidrofóbicos, abrindo espaço para a movimentação do resíduo Y295^{7.53}, que mediaría uma série de ligações de hidrogênio mediadas por água exatamente da mesma forma que o interruptor de tirosina visto em outros GPCR de classe A. Entre o final da TM7 e H8, existe uma série de ligações de hidrogênio com IL1 e TM6: R298 com Q235^{6.32},

T239^{6.36} e I294^{7.52}; Q300^{8.49} com Q235^{6.32}; E301 com N64 e N66 da IL1; R303^{8.51} com F297^{7.55}; e T305^{8.53} com N64 (Figura 10). Estas interações sugerem uma certa rigidez nesta região, dificultando a rotação das TM6 e TM7 no plano horizontal, tendo impacto direto no interruptor de tirosina (Y295^{7.53}).

Figura 9 – Barreira hidrofóbica no interior do modelo de receptor MC5R.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Interações entre diversos resíduos nas proximidades de Y295^{7.53}.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A interação entre os resíduos W251^{6.48} e N287^{7.45} se dá por ligação de hidrogênio direta (Figura 11), e não mediada por água, como ocorre em outros receptores da mesma família. Esta interação é importante pois ajuda a definição da orientação do resíduo W251^{6.48}, que dá limite à porção mais profunda da cavidade do

sítio ortostérico do MC5R. A ausência desta molécula de água entre os resíduos mencionados está sendo investigada através de estudos de simulação de dinâmica molecular.

Figura 11 – Interação entre os resíduos W251^{6.48} e N287^{7.45}.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação a outras interações importantes observadas no modelo, vale destacar a presença de interações polares entre E92^{2.60} e N278^{7.35} (Figura 12A**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Também são observadas ligações de hidrogênio entre D119^{3.29} e os resíduos S181 e T184 da alça extracelular 2 (EL2)(Figura 12B**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), reforçando a importância das EL2 em GPCR de classe A (44). O resíduo D115^{3.25} está orientado de modo a fazer ligação de hidrogênio com R112 situado na alça extracelular 1 (EL1) que, por sua vez, também interage com o átomo de oxigênio da cadeia principal da F110 (Figura 12C). O resíduo H257^{6.54} faz ligação de hidrogênio com Y269 presente na alça extracelular 3 (EL3) (Figura 12D).

Figura 12 - Interações polares entre E92^{2.60} e N278 (A), entre D119^{3.29} e os resíduos S181 e T184 da EL2 (B), entre R112 e D115^{3.25} e F110 da EL1 (C) e entre H2576.54 e Y269 (D).
Fonte: Elaborada pelo autor.

É importante notar que essas interações envolvendo as alças EL1, EL2 e EL3 podem ajudar a manter o sítio ortostérico disponível para a recepção de ligantes volumosos, como os peptídeos derivados de POMC, que são os ligantes endógenos do MC5R. A ausência de interações entre os resíduos resulta em um aumento de mobilidade das alças, dificultando a aproximação de ligantes.

Ainda, o resíduo D82^{2.50} interage com S129^{3.39}, N287^{7.45} e S288^{7.46}; nesta mesma região, W251^{6.48} interage com N287^{7.45} através de ligação de hidrogênio (Figura 13). Esta rede de interações sugere que D82^{2.50} pode ter papel fundamental na manutenção do arranjo tridimensional do receptor.

Figura 13 – Rede de interações nas proximidades de D82^{2.50}.
Fonte: Elaborada pelo autor.

As interações descritas no modelo estão em consonância com o estudo de YANG e colaboradores (22) em que mutações nos resíduos E92^{2.60}, D115^{3.25}, D119^{3.29} e H257^{6.54} levaram a redução na afinidade do receptor com NDP- α -MSH – conhecido agonista de receptores de melanocortina – e na capacidade de sinalização do receptor. Ainda, as cadeias laterais destes resíduos apontam para o sítio de ligação ortostérico. Também observa-se no modelo construído uma cavidade hidrofóbica na região que compreende os resíduos I122^{3.32}, C123^{3.33}, V126^{3.36}, I187, F194^{5.37}, W251^{6.48}, F254^{6.51}, F255^{6.52}, L258^{6.55}, L281^{7.38} e I284^{7.41}; segundo o mesmo estudo de YANG e colaboradores, mutações nos resíduos F194^{5.37}, W251^{6.48}, F254^{6.51}, F255^{6.52} levam a redução significativa da atividade de ligação com NDP- α -MSH. (22) Ainda, sugere que o empilhamento π - π entre ligante e receptor pode ser fundamental, condizente com uma afinidade entre a cavidade hidrofóbica do sítio ortostérico do receptor e a fenilalanina do motivo HFRW presente nos ligantes endógenos derivados de POMC. Portanto, comparando os dois trabalhos, pode-se inferir que o modelo construído neste trabalho é compatível com os dados experimentais reportados no referido estudo.

As interações descritas no modelo estão em consonância com o estudo de YANG e colaboradores (22) em que mutações nos resíduos E92^{2.60}, D115^{3.25}, D119^{3.29} e H257^{6.54} levaram a redução na afinidade do receptor com NDP- α -MSH – conhecido

agonista de receptores de melanocortina – e na capacidade de sinalização do receptor. Ainda, as cadeias laterais destes resíduos apontam para o sítio de ligação ortostérico. Também observa-se no modelo construído uma cavidade hidrofóbica na região que compreende os resíduos I122^{3.32}, C123^{3.33}, V126^{3.36}, I187, F194^{5.37}, W251^{6.48}, F254^{6.51}, F255^{6.52}, L258^{6.55}, L281^{7.38} e I284^{7.41}; segundo o mesmo estudo de YANG e colaboradores, mutações nos resíduos F194^{5.37}, W251^{6.48}, F254^{6.51}, F255^{6.52} levam a redução significativa da atividade de ligação com NDP- α -MSH. (22) Ainda, sugere que o empilhamento π - π entre ligante e receptor pode ser fundamental, condizente com uma afinidade entre a cavidade hidrofóbica do sítio ortostérico do receptor e a fenilalanina do motivo HFRW presente nos ligantes endógenos derivados de POMC. Portanto, pode-se inferir que o modelo construído neste trabalho é compatível com os dados experimentais reportados no referido estudo.

A literatura mais recente sobre modelagem por homologia de GPCR para uso em triagens virtuais baseadas em estrutura afirma que é necessário um grau de acurácia extremamente alto na conformação das cadeias laterais no sítio de ligação para a obtenção de bons resultados e que, sem intervenções baseadas em conhecimento, a modelagem de GPCR para uso em triagens virtuais pode ser considerada uma abordagem limitada. (45) As evidências estruturais publicadas por YANG et al. (22) e de EISINGER et al. (14), bem como as descrições de interruptores moleculares descritas na revisão de TRZASKOWSKI et al. (46) foram muito importantes para a construção do modelo 3D do receptor MC5R e sua validação prévia; portanto, fundamentais para a sequência à próxima etapa.

4.2 Triagem virtual

A triagem virtual baseada em estrutura é um método que vem sendo amplamente utilizado para a descoberta de moléculas bioativas a partir de uma base de dados de moléculas. A sistemática geral desta etapa está representada na Figura 14.

Figura 14 - Sistemática de triagem virtual baseada em estrutura empregado neste trabalho.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Neste trabalho, foram utilizados três softwares para a triagem virtual: Glide (Schrödinger), GOLD (CCDC) e Surflex-Dock (Certara). O software Glide utiliza um protocolo sistemático para posicionamento da estrutura do ligante no receptor, com uma classificação inicial de conformeros, passando por um refinamento pós-docagem; a função de classificação é empírica e se baseia em termos de contribuição de campos de força (eletrostática e van der Waals) e premiações ou penalizações de acordo com interações favoráveis ou desfavoráveis. (32) Já o software GOLD emprega um algoritmo genético onde uma série de conformeros são associados a um cromossomo e, a cada geração evolutiva, os cromossomos sofrem recombinação e posterior determinação da população mais viável; sua função de classificação emprega termos para energia de van der Waals entre proteína e ligante, além de contabilizar ligações de hidrogênio, energia de van der Waals intraligante e torções nas poses do ligante. (33) Já o Surflex-Dock, utiliza a construção incremental da estrutura do ligante dentro do campo de busca; a função de classificação leva em conta informações estéricas, polares, entrópicas e penaliza repulsões. (47) Como os algoritmos de busca e posicionamento dos ligantes, bem como as funções de classificação são diferentes entre os softwares, uma avaliação por consenso entre as classificações poderia levar a uma lista final contendo compostos com maiores chances de apresentarem atividade biológica.

Após a triagem inicial e a etapa de redocagem, a inspeção visual das 600 poses – que considerou efeitos de choque estérico como parâmetros de exclusão, assim como considerou favoráveis as presenças de ligações de hidrogênio e/ou

empilhamento π - π entre ligante e receptor – levou a uma lista reduzida, onde as moléculas prontamente disponíveis no mercado à época foram adquiridas e codificadas para a realização de testes *in vitro*. Os estudos de triagem virtual sugerem que os ligantes mais bem posicionados no *ranking* apresentam interação com o receptor através de, ao menos, uma ligação de hidrogênio com os resíduos E92^{2.60}, D115^{3.25}, D119^{3.29} e H257^{6.54}. A Figura 15 representa a interação de galato de epigallocatequina (EGCG) com o modelo de MC5R.

Figura 15 - EGCG docado em modelo de MC5R.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1 - Lista das cem moléculas mais bem posicionadas na triagem inicial, ordenadas por ranking baseado em consenso. Em destaque, as moléculas adquiridas para testes *in vitro*.

Código	Ranking Glide	Ranking Surflex	Ranking GOLD	Valor Consenso
EK0001	402	134	41	577
EK0002	386	825	111	1322
EK0003	1528	239	565	2332
EK0004	1779	295	305	2379
EK0005	826	1619	33	2478
EK0006	138	1530	1026	2694
EK0007	1606	103	1054	2763
EK0008	397	1087	1307	2791
EK0009	146	415	2324	2885
EK0010	39	1248	1639	2926
EK0011	4	2868	1145	4017
EK0012	1092	352	2579	4023
EK0013	1749	46	2733	4528
EK0014	62	3388	1148	4598
EK0015	80	4584	30	4694
EK0016	84	4254	545	4883
EK0017	66	2770	2457	5293
EK0018	31	5026	342	5399
EK0019	2654	1034	1741	5429
EK0020	17	4463	969	5449
EK0021	23	3676	1780	5479
EK0022	4801	217	1510	6528
EK0023	12	5507	1078	6597
EK0024	180	3293	3315	6788
EK0025	291	4196	2491	6978

continua

continuação

Tabela 3 - Lista das cem moléculas mais bem posicionadas na triagem inicial, ordenadas por ranking baseado em consenso. Em destaque, as moléculas adquiridas para testes *in vitro*.

Código	Ranking Glide	Ranking Surflex	Ranking GOLD	Valor Consenso
EK0026	377	4931	2014	7322
EK0027	2181	5157	122	7460
EK0028	337	4557	2777	7671
EK0029	38	1879	5760	7677
EK0030	44	4883	2789	7716
EK0031	5310	201	2610	8121
EK0032	6897	505	949	8351
EK0033	961	4354	3161	8476
EK0034	230	7716	584	8530
EK0035	32	1600	7115	8747
EK0036	164	2743	6112	9019
EK0037	283	2696	6283	9262
EK0038	21	7467	1806	9294
EK0039	1813	2839	4834	9486
EK0040	99	6821	2575	9495
EK0041	119	3937	5478	9534
EK0042	159	6013	3507	9679
EK0043	73	7006	2624	9703
EK0044	60	3647	6020	9727
EK0045	864	1863	7136	9863
EK0046	8819	453	901	10173
EK0047	2962	6981	260	10203
EK0048	110	5102	5151	10363
EK0049	501	6298	3815	10614
EK0050	277	3477	6872	10626

continua

continuação

Tabela 3 - Lista das cem moléculas mais bem posicionadas na triagem inicial, ordenadas por ranking baseado em consenso. Em destaque, as moléculas adquiridas para testes *in vitro*.

Código	Ranking Glide	Ranking Surflex	Ranking GOLD	Valor Consenso
EK0051	1147	786	8794	10727
EK0052	4327	4663	1801	10791
EK0053	2344	6314	2220	10878
EK0054	2350	97	8612	11059
EK0055	1464	5732	4079	11275
EK0056	16	8659	2757	11432
EK0057	1563	7304	2776	11643
EK0058	96	8520	3184	11800
EK0059	3596	5743	2824	12163
EK0060	143	6209	6289	12641
EK0061	723	1684	10635	13042
EK0062	2853	6476	4204	13533
EK0063	2008	10513	1068	13589
EK0064	10431	1152	2725	14308
EK0065	1948	3359	9091	14398
EK0066	541	7823	6191	14555
EK0067	200	8058	6524	14782
EK0068	8512	3358	2916	14786
EK0069	7771	1940	5108	14819
EK0070	1805	8777	4303	14885
EK0071	805	5205	9430	15440
EK0072	4860	9222	1615	15697
EK0073	116	6456	9211	15783
EK0074	58	7652	8373	16083
EK0075	5378	5445	5410	16233

continua

conclusão

Tabela 3 - Lista das cem moléculas mais bem posicionadas na triagem inicial, ordenadas por ranking baseado em consenso. Em destaque, as moléculas adquiridas para testes *in vitro*.

Código	Ranking Glide	Ranking Surflex	Ranking GOLD	Valor Consenso
EK0076	11135	2300	3369	16804
EK0077	8344	3876	5020	17240
EK0078	688	7398	9414	17500
EK0079	9998	3691	4535	18224
EK0080	4714	9983	3588	18285
EK0081	4052	12139	2702	18893
EK0082	553	10001	8595	19149
EK0083	6411	2832	10202	19445
EK0084	9811	1369	8613	19793
EK0085	9117	3346	7370	19833
EK0086	5374	8033	8559	21966
EK0087	2909	10112	11349	24370
EK0088	5738	7208	12502	25448
EK0089	8294	8475	11362	28131
EK0090	4561	15453	8171	28185
EK0091	8414	10342	9880	28636
EK0092	3749	13938	11277	28964
EK0093	13619	10504	5359	29482
EK0094	10974	15140	6458	32572
EK0095	11999	13666	8738	34403
EK0096	16601	8308	11473	36382
EK0097	13263	11744	12320	37327
EK0098	15252	13737	8968	37957
EK0099	10899	12458	15479	38836
EK0100	10433	10306	18636	39375

Fonte: Elaborada pelo autor.

As energias livres de ligação para as moléculas selecionadas para estudos *in vitro* foram estimadas por MM-GBSA (Tabela 2), que leva em consideração a energia de solvatação e utiliza um modelo de solvente contínuo. As energias livres calculadas dessa forma foram sempre negativas, entre -38,7 Kcal/mol e -101,6 Kcal/mol, sendo que o JNJ-10229570 teve energia livre de ligação estimada em -45,2 Kcal/mol. Portanto, os valores calculados sugerem que o processo de ligação das moléculas selecionadas para testes *in vitro* deve ser termodinamicamente favorável.

Tabela 2 - Energias livres de ligação entre as moléculas selecionadas para teste *in vitro*, usando o protocolo MM-GBSA. Em destaque, o valor de energia livre de ligação encontrado para a molécula JNJ-10229570.

Molécula	$\Delta G_{\text{ligação}}$ (Kcal/mol)
JNJ-10229570	-45,2
EK0011	-47,9
EK0021	-69,3
EK0029	-73,5
EK0030	-57,4
EK0036	-62,6
EK0056	-69,2
EK0067	-101,6
EK0070	-92,8
EK0073	-56,5
EK0085	-38,7
EK0086	-91,2
EK0092	-88,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tendo se partido de mais de 300.000 moléculas neste processo, doze moléculas foram selecionadas para testes de eficácia (inibição da sebogênese) *in vitro*. Na próxima seção desta dissertação estão descritos os resultados dos testes *in vitro*.

4.3 Estudos *in vitro*

Os ensaios *in vitro* de modulação da produção de sebo foram realizados pela empresa Bioalternatives (França). Primeiramente, testes de citotoxicidade foram conduzidos para a determinação das concentrações máximas de cada substância a ser testada quanto à atividade frente à produção de sebo (Tabela 5**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Os valores citotoxicidade obtidos indicam que há significativa variação de concentração máxima permitida para os testes de eficácia. As concentrações máximas não tóxicas variaram entre 1,4 (EK0070) e 1000 μM (EK0011) (Tabela 5). Em seguida, os compostos foram distribuídos em três placas para teste, onde cada uma delas continha controle sem estímulo (controle negativo), controle com estímulo (meio lipogênico sem andrógenos), e cerulenina (controle positivo; inibidor da síntese de ácidos graxos e esteroides). É importante destacar que algumas alterações morfológicas foram observadas nos testes de citotoxicidade para algumas moléculas, indicando possível efeito androgênico destas substâncias (35).

Tabela 3 - Concentrações máximas não-citotóxicas obtidas nos testes de citotoxicidade em sebócitos SEBO662AR.

Substância	Menor concentração testada (μM)	Maior concentração testada (μM)	Concentração máxima não-citotóxica (μM)
EK0011	1,4	3000	1000
EK0021	0,23	500	500
EK0029	0,46	1000*	100
EK0030	0,91	2000	300
EK0036	0,46	1000	500
EK0056	1,4	3000*	300
EK0067	1,4	3000	500
EK0070	1,4	3000*	1,4
EK0073	0,046	100*	30
EK0085	0,46	1000	500
EK0086	1,4	3000*	500
EK0092	0,46	1000*	100

*: alterações morfológicas em concentrações citotóxicas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi possível verificar que as células incubadas em meio sem estímulo geraram muito pouca fluorescência (Figura6A), enquanto que o tratamento com meio lipogênico sem andrógenos estimulou fortemente a produção e acúmulo de lipídeos (Figura6B). As células incubadas na presença de cerulenina (10 μ M) apresentaram inibição significativa da lipogênese (Figura6C). Estes resultados sugerem a validade do ensaio biológico como modelo para a avaliação da modulação da sebogênese.

Nestas condições experimentais, os doze compostos selecionados a partir dos estudos de triagem virtual tiveram a capacidade de modular a sebogênese avaliada. Os resultados obtidos indicam que os compostos apresentam propriedades inibidoras e estimuladoras de sebogênese. As respostas em meio lipogênico frente às concentrações testadas (normalizadas com relação ao controle e com relação ao inibidor cerulenina a 10 μ M) estão apresentadas na Tabela 6**Erro! Fonte de referência não encontrada.** Amostras das imagens de fluorescência para as moléculas com maior atividade biológica estão dispostas nas Figuras 18 e 19**Erro! Fonte de referência não encontrada.** (Vide Anexos).

Figura 16 - Amostras de imagens de fluorescência de sebócitos SEBO662AR nos testes *in vitro*. Células incubadas: sem estímulo, com estímulo, com estímulo e referência de inibição (cerulenina a 10 μ M).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nestas condições experimentais, onde foram testadas doze substâncias selecionadas a partir de modelagem molecular – construção de modelo de MC5R por homologia e subsequente triagem virtual baseada em estrutura – foram encontrados peptídeos e flavonoides inibidores e estimuladores de sebogênese. As respostas frente às concentrações testadas estão apresentadas na Figura 7**Erro! Fonte de referência não encontrada.** É importante reparar que valores positivos nestes gráficos significam redução de sebogênese e valores negativos representam aumento de sebogênese.

Os compostos EK0029, EK0030, EK0056 e EK0092 induziram aumento relevante da produção de sebo e apresentam potencial aplicação em produtos destinados ao tratamento de pele seca. As moléculas EK0067, EK0070, EK0073 e EK0086 tiveram pequeno efeito sobre a sebogênese e não apresentam potencial comercial na modulação deste fenômeno. As substâncias EK0011, EK0021, EK0036 e EK0085 inibiram significativamente a produção de sebo e apresentam potencial aplicação em produtos voltados ao controle de oleosidade da pele por conta de sua atividade inibidora da sebogênese. Mesmo sendo necessário o uso de concentrações relativamente altas para atingir taxas de inibição de sebogênese superiores às da cerulenina a 10 μM (por exemplo, EK0011 a 333 μM foi 57% superior à cerulenina a 10 μM em termos de inibição da produção de sebo), os inibidores de sebogênese descobertos no trabalho são pouco citotóxicos e, portanto, apresentam potencial comercial de uso para esta finalidade. Por este motivo, pretende-se proceder ao depósito de patente e, para proteção da propriedade intelectual, as estruturas das substâncias que apresentaram atividade biológica frente à sebogênese não estão explicitadas na dissertação. Vale ressaltar que as moléculas testadas não passaram por qualquer etapa de otimização, de modo que ainda há possibilidades de evolução a partir destas moléculas bioativas, gerando novos compostos-líder baseados nos esqueletos destas substâncias.

Os resultados dos testes *in vitro* confirmam o atingimento do objetivo principal deste trabalho.

Figura 17 - Taxas de sebogênese nos testes *in vitro*.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Modulação de sebogênese pelas moléculas identificadas neste trabalho. Em fundo cinza, as moléculas inibidoras de produção de sebo; em itálico, as moléculas estimuladoras da produção de sebo.

Composto	Concentração (μM)	Sebogênese ref. controle em meio lipogênico (%)	Inibição de sebogênese ref. cerulenina 10 μM (%)	Classificação da modulação da sebogênese
EK0021	500	58	+40	Inibidor
EK0011	333,33	59	+57	Inibidor
EK0036	500	70	+15	Inibidor
EK0085	500	72	+8	Inibidor
EK0067	500	83	-35	-
EK0070	0,47	89	-31	-
EK0073	30	89	-63	-
EK0086	500	91	-70	-
<i>EK0092</i>	<i>100</i>	<i>134</i>	-313	Estimulador
<i>EK0056</i>	<i>300</i>	<i>135</i>	-235	Estimulador
<i>EK0030</i>	<i>300</i>	<i>138</i>	-227	Estimulador
<i>EK0029</i>	<i>100</i>	<i>158</i>	-463	Estimulador

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Aproximadamente 30% dos fármacos comercializados atualmente possuem como alvo os receptores acoplados à proteína G. (48) Entretanto, ainda há muito a se avançar acerca do conhecimento estrutural dos GPCR devido à dificuldade na expressão destes receptores em sistemas heterólogos, bem como sua purificação e cristalização. Existe, portanto, uma considerável barreira científica a ser transposta nos estudos que envolvem tais receptores.

As abordagens mais tradicionais para o controle da oleosidade da pele envolvem alvos moleculares (5α -redutase e RAR- β) onde o tratamento pode desencadear efeitos adversos importantes. Neste sentido, o receptor de melanocortina-5, um GPCR da família das rodopsinas, permanece sendo um alvo bastante promissor ligado à diferenciação de sebócitos e consequente produção de sebo. Embora não tenha sido explorado comercialmente de forma bem-sucedida – apesar de todas as evidências da eficácia no antagonismo deste receptor – o MC5R foi escolhido como objeto desta pesquisa visando a descoberta de novos agentes capazes de modular a sebogênese, principalmente do ponto de vista cosmético.

A modelagem por homologia do receptor MC5R foi considerada satisfatória para a finalidade do trabalho, cujo foco foi descobrir novos compostos de origem natural capazes de modular a sebogênese. A estratégia adotada para a escolha de proteínas-molde, bem como o alinhamento sequencial adequado e o uso de informações moleculares sobre o receptor foram essenciais para o processo de modelagem molecular da estrutura 3D do receptor MC5R.

Quanto à triagem virtual baseada no alvo molecular, os métodos utilizados na modelagem do modo de ligação, classificação e seleção dos candidatos a ligantes de MC5R também podem ser considerados satisfatórios. Os resultados experimentais indicam que foi possível identificar novas moléculas biologicamente ativas. Possivelmente, o uso de três algoritmos de busca e classificação diferentes, bem como a eliminação de candidatos cuja diferença na classificação superou 5% levou à redução de falsos positivos. Nesse sentido, tal abordagem pode ser bastante vantajosa, já que nem sempre a síntese dos candidatos é uma tarefa simples ou economicamente viável.

Com relação aos antagonistas descobertos, cruzando os dados dos testes *in vitro* e os ensaios *in silico*, é possível observar que as poses obtidas durante a triagem virtual preveem interação com o resíduo D119^{3.29}, que é o mais importante resíduo do sítio ortostérico com carga formal. (22) Adicionalmente, são previstas interações entre os compostos EK0036 e EK0021 com o resíduo F254^{6.51}, que é o resíduo aromático mais importante do sítio ortostérico. (22) O resíduo E92^{2.60} pode interagir com os compostos EK0036 e EK0021. Ainda, são previstas interações dos compostos EK0011 e EK0021 com a EL2 através do resíduo T184 e entre o composto EK0021 e o resíduo Y269 da EL3. Embora não seja uma surpresa a interação entre EL e ligantes (44), é um dado que não foi previamente reportado em estudos com o MC5R.

Por outro lado, a previsão que pode ser feita pelos resultados obtidos neste trabalho é de que pode haver interação entre agonistas com os resíduos D115^{3.25}, D119^{3.29} e F254^{6.51}, mas não necessariamente com o resíduo E92^{2.60}, divergindo dos estudos realizados com o agonista NDP- α -MSH. (22) Para confirmação destas hipóteses, são necessários ensaios adicionais.

Embora não seja possível uma comparação direta com o estudo de EISINGER e colegas (14), onde sebócitos primários humanos foram induzidos a produzir sebo com o uso toxina colérica e o fármaco JNJ-10229570 levou a completa inibição da produção de sebo a 1 μ M, a atividade antagonista de alguns dos compostos avaliados pode ser considerada bastante promissora, visto que não passaram por qualquer etapa de otimização estrutural. Por exemplo, o composto EK0070 levou a uma redução de 11% na produção de sebo por sebócitos humanos SEBO662AR a uma concentração de apenas 0,47 μ M em meio lipogênico. Portanto, as moléculas selecionadas neste trabalho representam novos esqueletos moleculares como potenciais candidatos a agentes moduladores de produção de sebo para o controle da acne.

6 CONCLUSÃO

Nesta dissertação de mestrado, foram apresentados resultados expressivos que incluíram estudos de modelagem por homologia, triagem virtual e ensaios biológicos. Em geral, o processo de triagem virtual baseada em estrutura requer uma estrutura-alvo de alta resolução para uma maior taxa de sucesso. Diante disso, este projeto foi especialmente desafiador, visto que a triagem virtual se baseou em um modelo construído a partir de proteínas-molde com baixa identidade sequencial com a proteína-alvo. A identificação de interruptores moleculares no modelo construído e as energias de ligação estimadas entre o modelo e dois ligantes conhecidos foram essenciais para a validação do modelo construído, possibilitando a validação do protocolo adotado.

A busca por moléculas biologicamente ativas quanto à modulação da sebogênese através do planejamento racional descrito nesta dissertação identificou doze candidatos promissores e culminou na descoberta de quatro inibidores promissora capacidade de modulação da sebogênese, quatro inibidores fracos e quatro estimuladores da produção de sebo. Com os resultados dos testes in vitro em sebócitos humanos foi possível confirmar o sucesso da estratégia adotada na modelagem de um GPCR, assim como do protocolo envolvido nas triagens virtuais, inclusive a classificação dos candidatos – que influenciou na escolha das moléculas a serem testadas em modelo biológico de forma decisiva.

Os resultados deste trabalho indicam a possibilidade de ampliação dos tratamentos voltados a condições associadas à sebogênese, com ênfase em acne, e potencial atividade contra a seborreia, alopecia, psoríase, entre outros, o que pode trazer mais qualidade de vida para mais de 10% da população mundial.

A perspectiva é que a partir dos resultados coletados nesta dissertação sejam desenvolvidos e lançados novos produtos com foco no consumidor final que deseje reduzir ou aumentar a oleosidade da pele. Para isso, estão sendo desenvolvidos métodos de obtenção das moléculas moduladoras da sebogênese a partir de fontes renováveis. Além disso, estudos de confirmação de identidade molecular, testes in vitro adicionais, estudos de estabilidade e estudos clínicos deverão ser conduzidos para a confirmação do potencial de eficácia e econômico das moléculas identificadas.

Modificações das moléculas poderão ser feitas, com a finalidade de aumentar a eficácia ou facilitar a translocação do ativo ao seu alvo. Também estão nos planos o depósito de patentes relacionadas com estas descobertas.

Uma pesquisa que poderia ser realizada envolve a confirmação da ação androgênica das moléculas EK0056, EK0073, EK0086, EK0070 e EK0092. O resultado pode levar a novas abordagens para condições associadas à deficiência de hormônios sexuais – como falta de libido e excitação sexual – e até mesmo modificar alguns aspectos de nutrição – principalmente gestacional e geriátrica – atualmente em uso.

Para a confirmação do modo de ligação entre os antagonistas identificados neste trabalho e o MC5R, seriam necessários ensaios de mutação nos resíduos envolvidos e comparação da ação dos antagonistas com o receptor selvagem. Ainda, poderiam ser realizados ensaios envolvendo mutações nos resíduos da EL2, particularmente envolvendo o resíduo T184, e da EL3, como o resíduo Y269, para verificar a influência das alças extracelulares na interação com pequenas moléculas. O papel do resíduo E922.60 na ativação do receptor também pode ser reavaliado.

Com o sucesso da modelagem do MC5R, é razoável assumir que outros GPCR – principalmente os demais receptores de melanocortina – também podem ser modelados utilizando a mesma estratégia. O receptor de melanocortina-4, por exemplo, tem sido estudado como alvo para a obesidade e síndrome metabólica – uma das maiores preocupações mundiais na área da saúde, por aumentar o risco de outras comorbidades. Há centenas de GPCR sem estrutura tridimensional publicada no Protein Data Bank – ou seja, é um campo de pesquisa farmacológica bastante fértil, além de abrangente. Métodos de modelagem molecular, incluindo modelagem por homologia de GPCR, ainda se encontram pouco disseminados na área cosmética. Portanto, neste trabalho foi demonstrado que este importante segmento da economia pode se beneficiar amplamente de estudos de modelagem e simulação molecular, assim como já vem sendo feito na área farmacêutica – seja ela industrial ou acadêmica.

REFERÊNCIAS

- 1 GATES, A. H.; KARASEK, M. Hereditary absence of sebaceous glands in the mouse. **Science**, v.148, n. 3676, p. 1471-1473, 1965.
- 2 PELLE, E. et al. Identification of histamine receptors and reduction of squalene levels by an antihistamine in sebocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 5, p. 1280-1285, 2008.
- 3 GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1211-1259, 2017.
- 4 GUPTA, M. A. et al. Suicidal behaviors in the dermatology patient. **Clinics in Dermatology**, v. 35, n. 3, p. 302-311, 2017.
- 5 STATISTA. **Global acne treatment market size 2025**. 2018. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/717599/global-acne-treatment-market-size/>>. Acesso em: 28 maio 2018.
- 6 YANG, J. H. et al. Seeking new acne treatment from natural products, devices and synthetic drug discovery. **Dermato-Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. e1356520, 2018.
- 7 DRÉNO, B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 31, n. S5, p. 8-12, 2017.
- 8 DRENO, B. et al. Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. S2, p. 5-14, 2018.
- 9 THIBOUTOT, D. et al. A call to limit antibiotic use in acne. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 12, n. 12, p. 1331, 2013.
- 10 MELNIK, B. C. Acne vulgaris: the metabolic syndrome of the pilosebaceous follicle. **Clinics in Dermatology**, v. 36, n. 1, p. 29-40, 2018.
- 11 ZOUBOULIS, C. C.; DEGITZ, K. Androgen action on human skin - from basic research to clinical significance. **Experimental Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 5-10, 2004.
- 12 BRZEZINSKI, P. et al. Adverse effects of isotretinoin: a large, retrospective review. **Dermatologic Therapy**, v. 30, n. 4, 2017. doi: 10.1111/dth.12483.
- 13 STRAUSS, J. S. et al. Isotretinoin and teratogenicity. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 19, n. 2, p. 353-354, 1998.

- 14 EISINGER, M. et al. A melanocortin 1 and 5 antagonist inhibits sebaceous gland differentiation and the production of sebum-specific lipids. **Journal of Dermatological Science**, v. 63,n. 1, p. 23-32, 2011.
- 15 BOEHM, M.; EHRCHEN, J.; LUGER, T. A. Beneficial effects of the melanocortin analogue Nle4-D-Phe7- α -MSH in acne vulgaris. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 1, p. 108-11, 2012.
- 16 CLINUVEL PHARMACEUTICALS. **Inside clinuvel**: SCENESSE® in acne?. 2012. Disponível em: <<http://www.clinuvel.com/blog/news/inside-clinuvel-scenesse-in-acne/>>. Acesso em: 04 jul. 2018.
- 17 CLINUVEL PHARMACEUTICALS. **Inside clinuvel**: effective drug development. 2012. Disponível em: <<http://www.clinuvel.com/blog/news/inside-clinuvel-effective-drug-development/>>. Acesso em: 04 jul. 2018.
- 18 THIBOUTOT, D. et al. The melanocortin 5 receptor is expressed in human sebaceous glands and rat preputial cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 4, p. 614-619, 2000.
- 19 CHEN, W. et al. Exocrine gland dysfunction in MC5R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. **Cell**, v. 91, n. 6, p. 789-798, 1997.
- 20 GANTZ, I. et al. Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 200, n. 3, p. 1214-1220, 1994.
- 21 ZHANG, L. et al. Melanocortin-5 receptor: a marker of human sebocyte differentiation. **Peptides**, v. 27, n. 2, p. 413-420, 2006.
- 22 YANG, Y. et al. Molecular characterization of human melanocortin-5 receptor ligand-receptor interaction. **Biochemistry**, v. 52, n. 10, p. 1737-1745, 2013.
- 23 BALLESTEROS, J. A.; WEINSTEIN, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. **Methods in Neuroscience**, v. 25, p. 366-428, 1995. doi.org/10.1016/S1043-9471(05)80049-7.
- 24 ISBERG, V. et al. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D422-D425, 2014.
- 25 IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.52, n. 7, 2012. 1757-1768.
- 26 BANKS, J. L. et al. Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1752-1780, 2005.

- 27 THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. D204-D212, 2015. doi: 10.1093/nar/gku989.
- 28 ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- 29 BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
- 30 SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.
- 31 JACOBSON, M. P. et al. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. **Proteins: structure, function and bioinformatics**, v. 55, n. 2, p. 351-367, 2004.
- 32 BOWERS, K. J. et al. **Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters**. 2006. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=4090217>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- 33 FRIESNER, R. A. et al. Extra precision Glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 6177-6196, 2006.
- 34 JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.
- 35 JAIN, A. N. Surflex-Dock 2.1: robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 5, p. 281-306, 2007.
- 36 BARRAULT, C. et al. Androgens induce sebaceous differentiation in sebocytes cells expressing a stable functional androgen receptor. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 152, n. 1, p. 34-44, 2015.
- 37 RATAJ, K. et al. Impact of template choice on homology model efficiency in virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 6, p. 1661-1668, 2014.
- 38 BETTINELLI, I. et al. The approach of conformational chimeras to model the role of proline-containing helices on GPCR mobility: the fertile case of Cys-LTR1. **ChemMedChem**, v. 6, n. 7, p. 1217-1227, 2011.
- 39 LIU, W. et al. Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. **Science**, v. 337, n. 6091, p. 232-236, 2012.
- 40 HANSON, M. A. et al. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. **Science**, v. 335, n. 6070, p. 851-855, 2012.

- 41 SINGH, P.; BAST, F. Screening and biological evaluation of myricetin as a multiple target inhibitor insulin, epidermal growth factor, and androgen receptor; in silico and in vitro. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 3, p. 575-593, 2015.
- 42 PANG, X.; YANG, M.; HAN, K. Antagonist binding and induced conformational dynamics of GPCR A2A adenosine receptor. **Proteins**, v. 81, n. 8, p. 1399-1410.
- 43 JAAKOLA, V. P. et al. The 2.6Å crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. **Science**, v. 322, n. 5905, p. 1211-1217, 2008.
- 44 SEIBT, B. F. et al. The second extracellular loop of GPCRs determines subtype-selectivity and controls efficacy as evidenced by loop exchange study at A2 adenosine receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1317-1329, 2013.
- 45 LOO, J. S. E. et al. Assessing GPCR homology models constructed from templates of various transmembrane sequence identities: binding mode prediction and docking enrichment. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 80, p. 38-47, 2018. doi: 10.1016/j.jmgm.2017.12.017.
- 46 TRZASKOWSKI, B. et al. Action of molecular switches in GPCRs - theoretical and experimental studies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 1090-1109, 2012.
- 47 PHAM, T. A.; JAIN, A. N. Customizing scoring functions for docking. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 22, n. 5, p. 269-286, 2008.
- 48 SHONBERG, J. et al. GPCR crystal structures: medicinal chemistry in the pocket. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 14, p. 3880-3906, 2015.

ANEXO A – Ensaio celular realizado na Bioalternatives (França)

Controle sem estímulo
Controle com estímulo
Cerulenina 10 μ M
EK0036 500 μ M
EK0011 333,33 μ M
EK0085 500 μ M
EK0021 500 μ M

Figura 18 - Amostras de imagens de fluorescência de sebócitos SEBO662AR nos testes *in vitro*. Células incubadas: sem estímulo, com estímulo, com estímulo e referência de inibição (cerulenina) e com estímulo e substâncias inibidoras de produção de sebo selecionadas por modelagem molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 - Amostras de imagens de fluorescência de sebócitos SEBO662AR nos testes *in vitro*. Células incubadas: sem estímulo, com estímulo, com estímulo e referência de inibição (cerulenina) e com estímulo e substâncias estimuladoras de produção de sebo selecionadas por modelagem molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.