

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – MESTRADO
(PGbiotecM)

NÍCOLAS ALBUQUERQUE BARRETO

TÍTULO DO PROJETO:
ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE 2-N-ALQUILPIRIDILPORFIRINAS CATIÔNICAS
COM PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DINÂMICA DE Ca^{2+} EM CARDIOMIÓCITOS

JOÃO PESSOA
2022

NÍCOLAS ALBUQUERQUE BARRETO

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE 2-N-ALQUILPIRIDILPORFIRINAS CATIÔNICAS
COM PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DINÂMICA DE Ca^{2+} EM CARDIOMIÓCITOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de pós-graduação em
biotecnologia da Universidade Federal da
Paraíba para obtenção do Grau de Mestre
em Biotecnologia.

Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes
Orientador

JOÃO PESSOA
2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B273a Barreto, Nicolas Albuquerque.

Análise da interação de 2-N-alquilpiridilporfirinas catiônicas com proteínas envolvidas na dinâmica de Ca²⁺ em cardiomiócitos / Nicolas Albuquerque Barreto. - João Pessoa, 2022.
94 f. : il.

Orientação: Enéas Ricardo de Moraes Gomes.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Doenças cardiovasculares. 2. Canal de cálcio (Cav1.2). 3. Cardiomiócitos. 4. Docking molecular. 5. Porfirinas. 6. Troponina C. I. Gomes, Enéas Ricardo de Moraes. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.12(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



João Pessoa, 29 de junho de 2022

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata da **31^a** (trigésima primeira) Dissertação de Mestrado do discente **Nícolas de Albuquerque Barreto** do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, candidato ao título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Às treze horas (13h) do dia vinte e nove de junho do ano de dois mil e vinte e dois (29/06/2022), no endereço eletrônico <https://meet.google.com/afi-dknc-cwp>, divulgado na página eletrônica do Programa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o discente **Nícolas Albuquerque Barreto**, candidato ao título de Mestre em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores **Enéas Ricardo de Moraes Gomes** (Orientador e presidente, Universidade Federal da Paraíba), **Edson Luiz Folador** (membro interno, Universidade Federal da Paraíba) e **Júlio Santos Rebouças** (membro externo, Universidade Federal da Paraíba). Dando início aos trabalhos, o presidente da banca professor Enéas Ricardo de Moraes Gomes, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado **"ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE 2-N-ALQUILPIRIDILPORFIRINAS CATIÔNICAS COM PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DINÂMICA DE Ca²⁺ EM CARDIOMIÓCITOS"**. Após discorrer sobre o referido tema, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, a Banca Examinadora procedeu à avaliação e julgamento do candidato em caráter secreto, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO**. Em face da aprovação, declarou o presidente achar-se o candidato **Nícolas Albuquerque Barreto** legalmente habilitado a receber o Título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração **Biotecnologia Aplicada à Saúde**, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Tânia Maria Alves de Araújo, na qualidade de secretária, lavrei a presente ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes (Coorientador e presidente)

Prof. Dr. Edson Luiz Folador (examinador interna)

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças (examinador externo)

Emitido em 29/06/2022

ATA Nº 1/2022 - CBIOTEC - DB (18.62)
(Nº do Documento: 1)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 01/07/2022 16:37)
JULIO SANTOS REBOUCAS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
1698581

(Assinado digitalmente em 01/07/2022 15:39)
ENEAS RICARDO DE MORAIS GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2008919

(Assinado digitalmente em 01/07/2022 16:16)
EDSON LUIZ FOLADOR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
1273899

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **1**,
ano: **2022**, documento (espécie): **ATA**, data de emissão: **01/07/2022** e o código de verificação: **7f57eae52**

Emitido em 29/06/2022

ATA N° 01/2022 - PGBiotecM (11.01.44.05)
(N° do Documento: 1)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 20/07/2022 07:53)
IAN PORTO GURGEL DO AMARAL
COORDENADOR DE CURSO
2016711

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **1**,
ano: **2022**, documento (espécie): **ATA**, data de emissão: **20/07/2022** e o código de verificação: **ff8a086c72**

EPÍGRAFE

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

DEDICATÓRIA

Acredito que os primeiros agradecimentos devem ir aos meus pais, **Jaime** e **Dora**, os dois grandes pilares que me sustentaram até aqui. Não somente eles, como a minha família, meu irmão **Jaime Neto** e minha cunhada **Nathália**, que também foram pivots para que eu pudesse chegar onde estou.

Não devo deixar de agradecer a minha namorada e companheira **Heloísa** que me deu suporte tanto em meus momentos baixos quanto os momentos altos dessa jornada que foi o mestrado. Sua capacidade de me aguentar me surpreende cada vez mais.

A meus amigos, **Acácio**, **Carlos** e **Marcus**, que por mais distante que estejam me apoiam e me incentivam a seguir em frente com minhas ideias e escolhas independentemente de onde elas me levem.

Agradeço do fundo do meu coração a **Valdeíse** e **Nelson**, amizades que a graduação trouxe e se mantiveram forte até aqui. Sou muito grato pelas conversas, momentos felizes e conselhos dos últimos dois anos.

Um agradecimento especial a **(José de) Anchieta**. Foi meu companheiro de laboratório e também uma das ajudas mais sólidas que tive durante os dois anos do mestrado. Qualquer dúvida, por mais que ele não conseguisse me ajudar 100%, ele sabia me direcionar.

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos ao **Prof. Dr. Enéas Gomes**. Posso afirmar que os últimos cinco anos compartilhando conhecimento foram de extrema importância para minha formação como profissional e também como pessoa.

Agradeço também a todo **corpo docente** do **PGbiotecM** responsáveis pela minha formação dos últimos 2 anos como também a **UFPB** por todo suporte prestado durante essa jornada.

Agradeço também a CAPES e CnPQ pelo apoio estrutural e financeiro durante a execução do projeto

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	18
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.2 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO NO CORAÇÃO.....	26
2.3 CANAL DE CÁLCIO DO TIPO L (CaV _{1.2}).....	29
2.4 RECEPTOR DE RIANODINA DO TIPO 2 (RyR2).....	32
2.5 COMPLEXO TROPONINA.....	34
2.6 PORFIRINAS.....	36
2.7 ATRACAMENTO MOLECULAR.....	38
3 OBJETIVO.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 PROTEÍNAS/MACROMOLÉCULAS.....	41
4.2 LIGANTES.....	42
4.3 PREPARAÇÃO DE PROTEÍNA E LIGANTES.....	43
4.4 MOLECULAR BLIND DOCKING.....	43
4.5 <i>REDOCKING</i> E <i>DOCKING</i> EM SÍTIO CONHECIDO.....	44
4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 <i>BLIND DOCKING</i> H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ COM CaVAb.....	46
5.2 <i>BLIND DOCKING</i> H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺	49

5.3 REDOCKING E DOCKING H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ E H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE PAAs	52
5.4 REDOCKING E DOCKING H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ E H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE DHPs	55
5.5 REDOCKING E DOCKING H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ E H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE BZTs	58
5.6 BLIND DOCKING H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ COM cNTnC-cTnl ₁₄₄₋₁₆₃	61
5.7 BLIND DOCKING H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ COM cNTnC-cTnl ₁₄₄₋₁₆₃	64
5.8 REDOCKING E DOCKING H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ E H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE SCs	67
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6.1 CONCLUSÃO	71
6.2 PERSPECTIVAS FUTURAS	72
7 REFERENCIAS	73
APÊNDICE A – lista de resíduos e tipos de interação presentes no docking de H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e CaVAb com <i>exhaustiveness</i> no valor 8	81
APÊNDICE B – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e CaVAb com <i>exhaustiveness</i> no valor 32	82
APÊNDICE C – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>docking</i> de H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ e CaVAb com <i>exhaustiveness</i> no valor 8	83
APÊNDICE D – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>docking</i> de H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ e CaVAb com <i>exhaustiveness</i> no valor 32	84
APÊNDICE E – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>redocking</i> de BR-Verapamil e <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ em CaVAb no sítio para PAAs com <i>exhaustiveness</i> no valor 8	85
APÊNDICE F – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>redocking</i> de BR-Verapamil e <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ em CaVAb no sítio para PAAs com <i>exhaustiveness</i> no valor 32	86

APÊNDICE G – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>redocking</i> de amlodipine e <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ em CaVAb no sítio para DHPs com <i>exhaustiveness</i> no valor 8	87
APÊNDICE H – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>redocking</i> de amlodipine e <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ em CaVAb no sítio para DHPs com <i>exhaustiveness</i> no valor 32	88
APÊNDICE I – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>redocking</i> de diltiazem e <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ em CaVAb no sítio para BZTs com <i>exhaustiveness</i> no valor 8	89
APÊNDICE J – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>redocking</i> de diltiazem e <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ em CaVAb no sítio para BZTs com <i>exhaustiveness</i> no valor 32	90
APÊNDICE K – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e cNTnC – cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ com <i>exhaustiveness</i> no valor 8.....	91
APÊNDICE L – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e cNTnC – cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ com <i>exhaustiveness</i> no valor 32.....	92
APÊNDICE M – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>docking</i> de H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ e cNTnC – cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ com <i>exhaustiveness</i> no valor 8	93
APÊNDICE N – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>docking</i> de H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ e cNTnC – cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ com <i>exhaustiveness</i> no valor 32	94
APÊNDICE O – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>redocking</i> de DFPB-O e <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ em cNTnC – cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ no sítio para SCs com <i>exhaustiveness</i> no valor 8.....	95
APÊNDICE P – lista de resíduos e tipos de interação presentes no <i>redocking</i> de DFPB-O e <i>docking</i> de H ₂ TM-2-PYP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ em cNTnC – cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ no sítio para SCs com <i>exhaustiveness</i> no valor 32.....	96

RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte numa esfera global, sendo o infarto do miocárdio responsável por 17.9 milhões de morte no ano de 2017. Fatores como sedentarismo, alimentação de baixa qualidade, alcoolismo, tabagismo, alterações na homeostase do Ca^{2+} e na homeostase redox do miócito cardíaco já estão bem descritos como desencadeadores de DCVs. Dentre as moléculas potencialmente ativas na modulação redox e com possível atividade farmacológica terapêutica encontram-se as bases livres de porfirinas e metaloporfirinas. Num trabalho executado por nosso grupo de pesquisa e colaboradores em 2020 observou-se que MnTE-2-PyP⁵⁺ foi capaz de modular Ca^{2+} *in vitro* e *in vivo*, mas essa capacidade não teria correlação com sua modulação redox. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar por meio da técnica de *docking* molecular como porfirinas interagem com proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração cardíaco. Para isso foi utilizada a estrutura de CaVAB, um canal de cálcio de origem bacteriana e um complexo contendo a troponina C cardíaca e fragmento da troponina I cardíaca. Foi possível observar que as duas porfirinas utilizadas, meso-tetraquis(N-metilpiridínio-2-il)porfirina e meso-tetraquis(N-etilpiridínio-2-il)porfirina obtiveram bons valores de afinidade para CaVAB tanto no processo de *blind docking* quanto do *docking* direcionado para sítios ativos conhecidos. Já no caso da troponina C, observou-se maior interação com região N-terminal da proteína em um sítio diferente ao que moléculas com atividade conhecida se ligam. Desta maneira, foi possível concluir que as porfirinas utilizadas, baseando-se nas afinidades, possuem um alto potencial para modular CaVAB e não teriam capacidade de sensibilizar a troponina ao Ca^{2+} .

Palavras-chave: canal de cálcio (Cav1.2), cardiomiócitos, *docking molecular*, porfirinas, troponina C

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of the death across the globe with myocardial infarction being responsible for 17.9 million of death in 2017. Factors such as sedentarism, unhealthy diet, alcoholism, changes in Ca^{2+} homeostasis and redox homeostasis are already well described as CVDS triggers. Among molecules with potential redox modulation capability and therapeutic potential are porphyrins and metaloporphyrins. Our research group and collaborators in 2020 described MnTE-2-PyP⁵⁺ as capable of modulating Ca^{2+} *in vivo* and *in vitro*, but this activity was not assigned to its redox modulation capability. Thus, the main goal of this work was to analyze through molecular docking how porphyrins interact with proteins involved in the excitation-contraction coupling. CaVAb a Calcium channel with bacterial origin and a complex of cardiac troponin C with a fragment from cardiac troponin I were used. It was observed that the two used porphyrins *meso*-tetrakis (N-methylpyridin-2-yl)porphyrin and *meso*-tetrakis(N-ethylpyridin-2-yl)porphyrin obtained good affinity values for CaVAb, both in blind docking protocol and in known active site binding. As for troponin C, it was observed a major interaction with the N domain of the protein, different from the known binding site for this structure. Therefore, it was possible to conclude that the used porphyrins, based on the values of affinity found have a high potential to modulate CaVAb and low potential do sensitize the troponin C to Ca^{2+}

Keywords: cardiomyocytes, porphyrins, molecular docking, calcium channel, troponin C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da parede cardíaca com separação em todas as camadas do pericárdio, miocárdio e endocárdio	24
Figura 2: Representação da invaginação membranar do túbulo-T e proteínas responsáveis pelo transporte do Ca^{2+} (em vermelho).....	25
Figura 3: Fluxograma de participação do íon Ca^{2+} dura o acoplamento excitação- contração no miócito cardíaco.....	26
Figura 4: Sequência de eventos a partir da ligação do Ca^{2+} com a troponina C.....	27
Figura 5: Representação gráfica da variação no potencial de membrana do miócito cardíaco com as etapas em sequência e numeradas	28
Figura 6: Estrutura de $\text{CaV}_{1.2}$ e suas subunidades $\alpha 1\text{C}$, $\alpha 2\delta$, β e γ . $\alpha 1\text{C}$ representando a subunidade poro permitindo a passagem de Ca^{2+} para o citosol.....	30
Figura 7: Estrutura química dos bloqueadores do canal de cálcio do tipo L	31
Figura 8: Estrutura homotetramérica do RyR2 com vista da região superior do poro do canal e com FKBP's em cinza.....	32
Figura 9: Estrutura química de dois modulares da atividade do receptor de rianodina 2	33
Figura 10: Esquematisação do complexo troponina acoplado a tropomiosina, actina e ao filamento de miosina	34
Figura 11: Estrutura das porfirinas. A esquerda o núcleo geral porfirínico e a direita a estrutura de um complexo metálico porfirínico ou metaloporfirina	36
Figura 12: Ilustração representando o docking com sítio de ligação conhecido e o Blind Docking	39
Figura 13: Estruturas de <i>meso</i> -tetraquis(<i>N</i> -metilpiridínio-2-il)porfirina e	42
Figura 14: Fluxograma do protocolo utilizada para execução de Blind Docking	43
Figura 15: Fluxograma da execução de redocking e docking com base no valor de RMSD.....	44
Figura 16: CaVAb (PDB ID:5KMD) + $\text{H}_2\text{TM-2-PyP}^{4+}$ exhaustiveness 32	47
Figura 17: CaVAb (PDB ID:5KMD) + $\text{H}_2\text{TM-2-PyP}^{4+}$ exhaustiveness 8	47
Figura 18: CaVAb (PDB ID:5KMD) + $\text{H}_2\text{TM-2-PyP}^{4+}$ exhaustiveness 8 e 32 interações	48
Figura 19: CaVAb (PDB ID:5KMD) + $\text{H}_2\text{TE-2-PyP}^{4+}$ exhaustiveness 8.....	50
Figura 20: CaVAb (PDB ID:5KMD) + $\text{H}_2\text{TE-2-PyP}^{4+}$ exhaustiveness 32.....	50

Figura 21: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8 e 32 interações (2D)	51
Figura 22: CaVAb (PDB ID:5KMH) – Br-Verapamil + redockings (exhaustiveness 8 e 32)	52
Figura 23: CaVAb (PDB ID: 5KMH) + Br-Verapamil + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ (Sítio PAAs).....	53
Figura 24: CaVAb (PDB ID:5KMH) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8 e 32 interações (2D) (Sítio PAAs)	54
Figura 25: CaVAb (PDB ID:5KMD) – Amlodipino + redockings (exhaustiveness 8 e 32)	55
Figura 26: CaVAb (PDB ID:5KMD) – Amlodipino + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ + H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ (Sítio DHPs)	56
Figura 27: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8 e 32 interações (2D) (Sítio DHPs)	57
Figura 28: CaVAb (PDB ID:6KE5) – Diltiazem + redockings (exhaustiveness 8 e 32)	58
Figura 29: CaVAb (PDB ID:5KMD) – Diltiazem + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ + H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ (Sítio BZTs)	59
Figura 30: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8 e 32 interações (2D) (Sítio BZTs).....	60
Figura 31: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8	61
Figura 32: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 32 ..	62
Figura 33: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8 e 32 interações (2D).....	63
Figura 34: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8.....	64
Figura 35: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 32...	65
Figura 36: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8 e 32 interações (2D).....	66
Figura 37: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) – DFPB-O + redockings (exhaustiveness 8 e 32)	67
Figura 38: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) – DFPB-O + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ + H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ (Sítio SCs)	68
Figura 39: cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ exhaustiveness 8 (2D) (Sítio BZTs).....	69

Figura 40: cNTnC-cTnl₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺
exhaustiveness 32 (2D) (Sítio BZTs).....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista macromoléculas proteínas utilizadas com suas respectivas informações.....	41
Tabela 2: Informações a respeito dos ligantes utilizados para execução do trabalho	42
Tabela 3: Valores de afinidade obtidos no BDde CaVAb (PDB ID:5KMD) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺	46
Tabela 4: Valores de afinidade obtidos no BDde CaVAb (PDB ID:5KMD) + H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺	49
Tabela 5: Valores de afinidade obtidos no redocking de CaVAb (PDB ID:5KMH) e docking + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ (sítio PAAs)	54
Tabela 6: Valores de afinidade obtidos no redocking de CaVAb (PDB ID:5KMD) e docking + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ (sítio DHPs).....	56
Tabela 7: Valores de afinidade obtidos no redocking de CaVAb (PDB ID:6KE5) e docking + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ (sítio BZTs).....	59
Tabela 8: Valores de afinidade obtidos no BDde cNTnC-cTnI144-163 (PDB ID:2L1R) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺	61
Tabela 9: Valores de afinidade obtidos no BD de cNTnC-cTnI144-163 (PDB ID:2L1R) + H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺	64
Tabela 10: Valores de afinidade obtidos no redocking de cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) e docking + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ e H ₂ TE-2-PyP ⁴⁺ (sítio SCs)	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ADT	<i>AutoDock Tools 4</i>
ASN	Asparagina
ASP	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BD	<i>Blind docking</i>
BZTs	Benzodiazepinas
Ca²⁺	Íon cálcio
CADD	<i>Computer Aided Drug Discovery</i>
CaM	Calmodulina
CaVAb	Canal de Cálcio dependente de voltagem homotetramérico bacteriano
cCTnI	Região C-Terminal da troponina I cardíaca
cLTCC	<i>Cardiac L-Type Calcium Channel</i>
cNTnC	Região N-Terminal da troponina C cardíaca
CO₂	Gás dióxido de carbono
cTnC	Troponina C cardíaca
cTnI	Troponina I cardíaca
cTnT	Troponina T cardíaca
DCVs	Doenças cardiovasculares
DHPs	Dihidropiridinas
FKBP	<i>FK binding protein</i>
GLU	Glutamato
GLY	Glicina
ILE	Isoleucina
K⁺	Íon potássio
LEU	Leucina
LTCC	<i>L-Type Calcium Channel</i>
LYS	Lisina
MET	Metionina
Mg²⁺	Íon magnésio
Mn³⁺	Íon manganês

MnTE-2-PyP⁵⁺	Mn (III) <i>mesotetrasquis(N-etilpiridinhio-2-il)</i> porfirina
Na⁺	Íon Sódio
O₂	Gás oxigênio
O₂⁻	Ânion superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAAAs	Fenilaquilaminas
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PHE	Fenilalanina
PKA	Proteína Cinase A
PRO	Prolina
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNS	RNS do inglês <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	ROS do inglês <i>reactive oxygen species</i>
RyR2	Receptor de Rianodina 2
SCs	Sensibilizadores do Ca ²⁺
SER	Serina
SERCA2a	Cálcio-ATPase do retículo sarcoendoplasmático 2a
SOD	Superóxido Dismutase
SPDBV	<i>Swiss PDB Viewer</i>
SR	Retículo sarcoplasmático
H₂TE-2-PyP⁴⁺	<i>meso-tetraquis(N-etilpiridínio-2-il)</i> porfirina
THR	Treonina
TM	Tropomiosina
H₂TM-2-PyP⁴⁺	<i>meso-tetraquis(N-metilpiridínio-2-il)</i> porfirina
TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
TRP	Triptofano
TT	Túbulos T
TYR	Tirosina
VAL	Valina
ΔG	Energia livre de Gibbs

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte numa esfera global, sendo responsáveis por 17.9 milhões de mortes. Nesse número que representa cerca de 32% das mortes totais no mundo, 4 de 5 mortes por DCVs são causadas pelo infarto do miocárdio (ataque cardíaco) e derrame (WHO, 2021). No Brasil, as DCVs também seguem como maior causa de mortes, estando as doenças isquêmicas em primeiro lugar entre 2000 e 2018 (SBC, 2021).

Fatores de risco como obesidade, sedentarismo, baixo consumo de frutas e vegetais, alcoolismo e tabagismo já estão bem estabelecidos e associados ao aparecimento de DCVs (DAHLÖF, 2010; WHO, 2021). Também é de interesse ressaltar que desde o entendimento de que o cátion bivalente cálcio (Ca^{2+}) é um dos efetores mais importantes no processo conhecido como acoplamento excitação-contracção do músculo cardíaco, ficou claro que alterações na homeostase desse íon têm um papel de altíssima relevância no processo fisiopatológico das DCVs. (LANDSTROM *et al.*, 2017).

Dada a relevância do Ca^{2+} na contracção do músculo cardíaco também é interessante destacar que os efetores que lidam diretamente com a passagem do íon e o chamado transiente de Ca^{2+} entre os diversos compartimentos celulares, são afetados tanto por alterações físicas, como a perda de células e danos pós-infarto do miocárdio, como por modificações a nível molecular, como os processos oxidativos que são desencadeados por mudanças na homeostase redox. Esse desbalanço homeostático é causado pelo acúmulo das chamadas espécies reativas de nitrogênio (RNS do inglês *reactive nitrogen species*) e espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*) como o peroxinitrito (ONOO^-) e ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (SILVA, JASIULIONIS, 2014; STEENMAN, LANDE; 2017).

Dentre as moléculas com atividade redox e potencialmente farmacológicas encontram-se as porfirinas e seus complexo metálicos (metaloporfirinas), que são amplamente estudados como potenciais agentes terapêuticos em diversos processos fisiopatológicos. Como alguns exemplos desses estudos temos o uso destes compostos como radioprotetores, agentes antitumorais e protetores de órgãos em eventos de transplante (MONFARED *et al.*, 2009; ARCHAMBEAU *et al.*; EVANS *et al.*,

2013). Algumas metaloporfirinas já possuem trabalhos visando estudar seus processos de modulação redox quanto sua farmacocinética como demonstrado no trabalho de Weitner *et al.*, (2013) (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010; TOVMASYAN *et al.*, 2015).

Entretanto, no trabalho de Barbosa *et al.*, 2020, pôde-se observar que a metaloporfirina Mn(III) meso-tetrasquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfirina (MnTE-2-PyP⁵⁺) foi capaz de modular a atividade do Ca²⁺ em cardiomiócitos isolados de ratos, com destaque para uma diminuição dose dependente no pico de Ca²⁺ e tratamento e prevenção de eventos arrítmicos sem a característica perda de força de contração encontrada nos tratamentos com drogas antiarrítmicos. No entanto estas propriedades demonstradas por MnTE-2-PyP⁵⁺ não estariam associadas à sua capacidade de mimetizar a superóxido dismutase (SOD), uma das enzimas que combatem o acúmulo de ROS e RNS no organismo uma vez que não foram observadas alterações nos valores de ROS presentes no tecido.

Destacada, portanto, a relevância das porfirinas e suas capacidades como modulador redox e farmacológico de alterar a homeostase do Ca²⁺, buscamos entender melhor a interação das porfirinas com proteínas no processo de contração do miócito cardíaco.

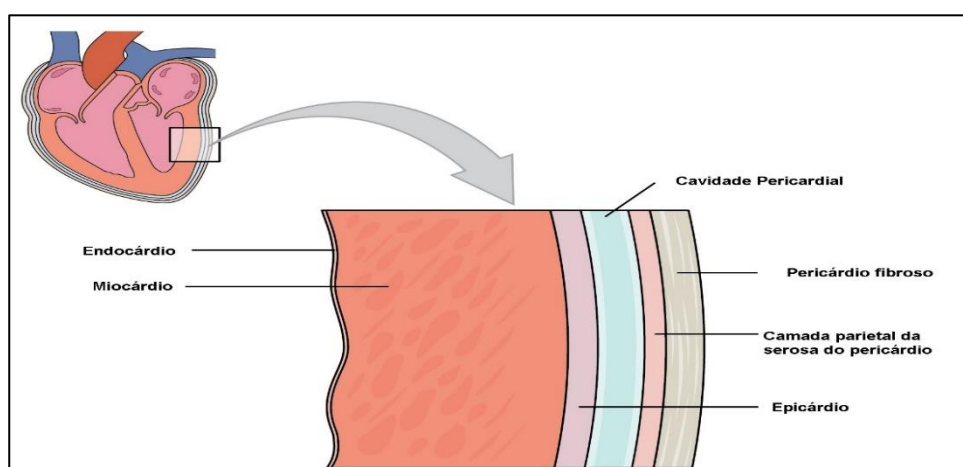
.

2.1 O CORAÇÃO

O coração é o primeiro órgão que se forma durante o desenvolvimento embrionário e, logo após sua formação, o mesmo já começa a funcionar, sendo de vital importância para o embrião. Podendo ser descrito, nos mamíferos, como duas bombas operando em série, o coração é o órgão responsável por suprir as demandas metabólicas do organismo e é composto por quatro compartimentos: átrios direito e esquerdo e ventrículos também esquerdo e direito. Este órgão alimenta as chamadas circulação pulmonar e circulação sistêmica. A circulação pulmonar acontece quando o sangue é recebido do organismo no átrio direito, sendo repassado para o ventrículo direito que o direciona, por meio da artéria pulmonar, para os pulmões onde CO_2 é trocado, fazendo o sangue rico em O_2 . Esse sangue rico em O_2 volta ao coração por meio das veias pulmonares e chega no átrio esquerdo, passa o ventrículo esquerdo e é então ejetado para circulação sistêmica (KATZ, 2010; MONTE-NIETO; HARVEY, 2021).

A superfície dos átrios e ventrículos é composta de três camadas: o epicárdio, a camada mais externa composta de tecido e células escamosas fibroelásticas; o endocárdio a camada mais interna composta de fibras de colágeno, fibras elásticas e uma cama rudimentar de músculo liso, e entre elas, o miocárdio, uma camada com arranjo tridimensional de células com formato de bastonetes, os miócitos cardíacos ou cardiomiócitos (FIG 1) (BIRD *et al.*, 2003; KATZ, 2010)

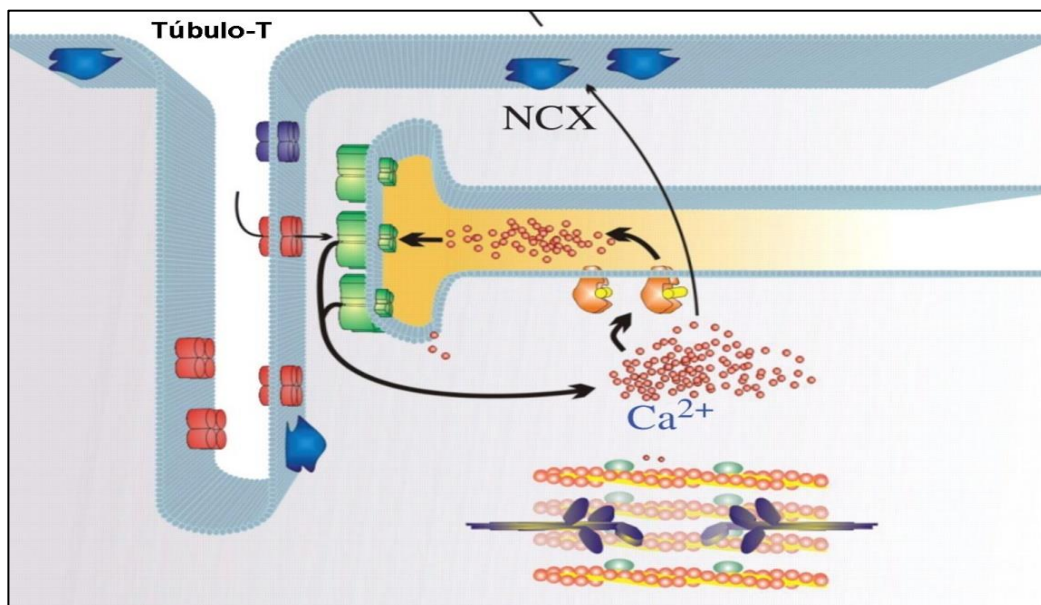
Figura 1: Ilustração da parede cardíaca com separação em todas as camadas do pericárdio, miocárdio e endocárdio



Fonte: Adaptado de wikimedia.org

Tendo aproximadamente 10 a 20 μm no diâmetro e 100 μm no comprimento, o que explica forma de bastonete citada anteriormente, o cardiomiócito tem sua membrana majoritariamente composta por lipo proteínas e mucopolissacarídeos. Uma vez excitadas pelo potencial de ação iniciado no nó sinoatrial, e propagado pelas fibras de purkinje, esses miócitos se contraem *in tandem*, ou seja, sincronizadas. Essa contração sincronizada se dá pela presença de grandes invaginações nas membranas dos cardiomiócitos conhecidas como túbulos T (TT), e, é nessas estruturas que estão localizadas as redes de proteínas canais responsáveis pela movimentação de Ca^{2+} e consequentemente, responsáveis pelo chamado acoplamento excitação-contração (FIG 2) (SONG *et al.*, 2005; VASSALLO *et al.*, 2012).

Figura 2: Representação da invaginação membranar do túbulo-T e proteínas responsáveis pelo transporte do Ca^{2+} (em vermelho)



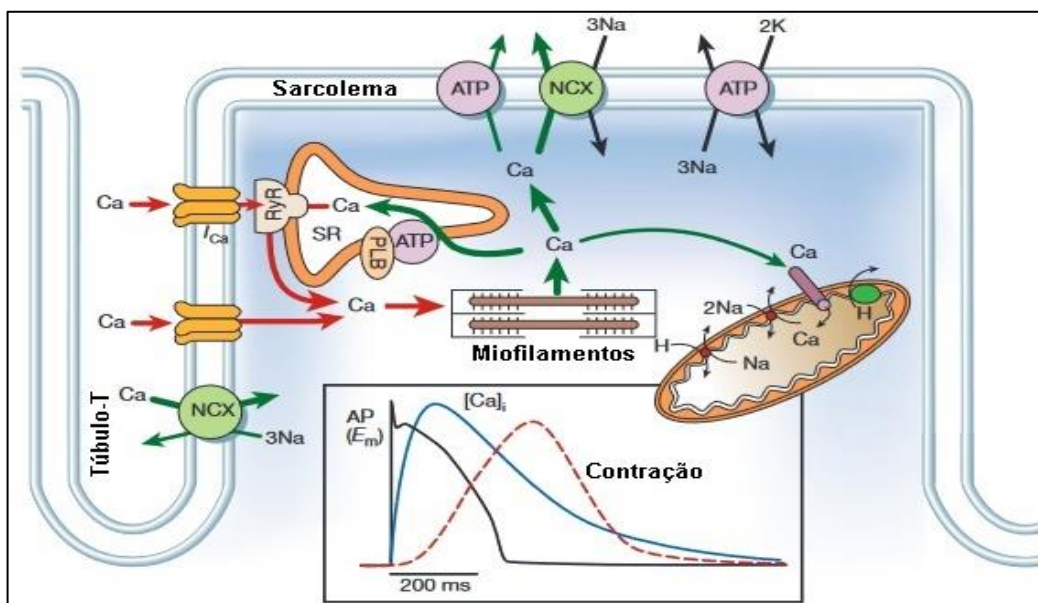
Fonte: Adaptado de Ibrahim (2011)

2.2 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO NO CORAÇÃO

No músculo cardíaco, íons Ca^{2+} contribuem diretamente para o acoplamento da atividade elétrica com a geração de força contrátil, em um processo conhecido como acoplamento excitação-contracção (BERS, 2002).

No acoplamento excitação-contracção, quando um potencial de ação alcança o cardiomiócito, gera uma mudança no potencial inicial de membrana -90 mV . O aumento desse valor permite que canais de sódio (Na^+) dependentes de voltagem se abram, gerando a passagem do íon para o meio intracelular, fazendo valor do potencial de membrana aumentar para $+20 \text{ mV}$ antes dos canais de Na^+ entrarem em inativação. Pós entrada de Na^+ , canais de potássio (K^+) rápidos se abrem para iniciar o processo de repolarização, no entanto, a mudança no potencial de membrana desencadeia a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, o que gera um platô no valor do potencial graças a entrada de Ca^{2+} e a baixa saída de K^+ . Quando a passagem de Ca^{2+} cessa, pelo fechamento dos canais, e os canais de K^+ lentos induzem uma maior permeabilidade desse íon, o platô se encerra, e a combinação desses fatores culminam no potencial de membrana retornando para o valor de repouso inicial (FIG 3) (NERY *et al.*, 2012; SILVERTHORN, 2017).

Figura 3: Fluxograma de participação do íon Ca^{2+} dura o acoplamento excitação-contracção no miócito cardíaco

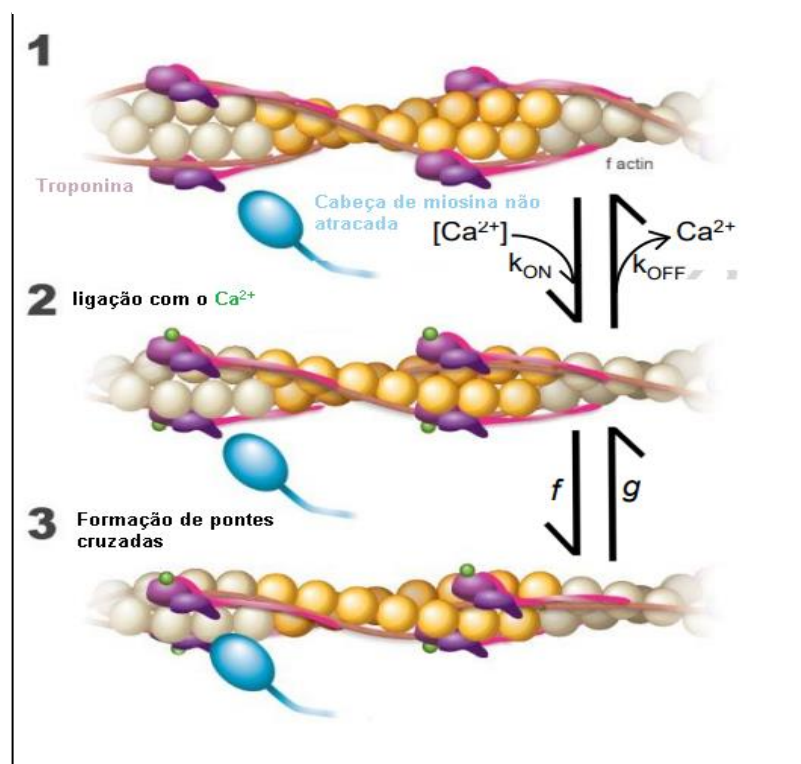


Fonte: Adaptado de BERS (2002)

Durante o platô no potencial, existem alguns fatores a serem pontuados quanto aos eventos que permitem o aumento de Ca^{2+} no meio intracelular. Na etapa em que os canais de Ca^{2+} se abrem, apenas uma pequena fração de íons faz a passagem para o interior da célula. No entanto, essa fração internalizada se concentra em um espaço entre a membrana do sarcolema, nos TT, e o retículo sarcoplasmático (SR), o que acarreta na interação de Ca^{2+} com o receptor de rianodina do tipo 2 (RyR2), a isoforma cardíaca. Dessa interação ocorre o evento chamado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , o que leva ao aumento drástico na fração desse íon bivalente no interior da célula (Eisner *et al.*, 2017).

Com os valores de Ca^{2+} elevados no citosol, há a formação reversível de um complexo com a troponina C, e, essa interação promove a exposição de um sítio de ligação nesse complexo para interação com a troponina I, previamente ligada a actina. Graças a essas interações, tropomiosina (Tm) se desloca na actina, expondo sítios de ligação para formação das pontes cruzadas com as cabeças de miosina (FIG 4). Com o deslizamento dos filamentos e o consequente encurtamento do cardiomiócito, há um aumento na pressão durante o acoplamento, isso propulsiona o volume presente nos ventrículos em direção às circulações (PARMACEK; SOLARO, 2004).

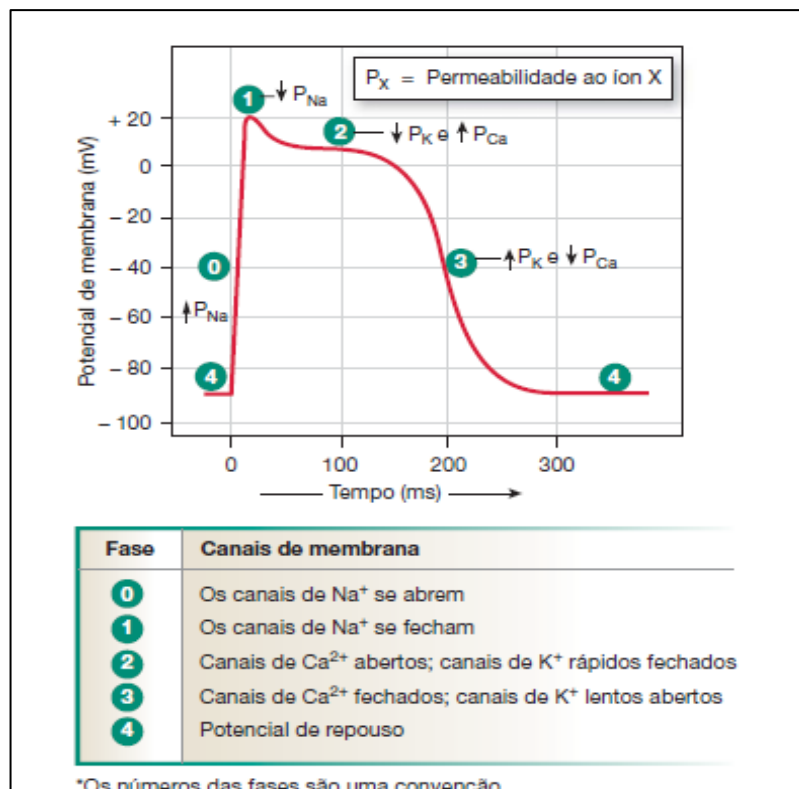
Figura 4: Sequência de eventos a partir da ligação do Ca^{2+} com a troponina C



Fonte: Adaptado de Gonzalez-Martinez *et al* (2018)

Durante a fase de repolarização, há a necessidade da retirada do Ca^{2+} do citosol e a recaptação é feita pela Cálcio-ATPase do retículo sarcoendoplasmático 2a (SERCA2a), uma bomba responsável por movimentar 70% desses íons para o reabastecimento do SR, enquanto 28% é deslocado para fora pela ação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e 2% pela Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA). Com os íons retirados do interior do cardiomiócito, os estoques do SR repostos e o potencial de membrana restaurado para -90 mV, a célula se encontra pronta para um próximo ciclo de contração (FIG 5) (VAFIADAKI *et al.*, 2009).

Figura 5: Representação gráfica da variação no potencial de membrana do miócito cardíaco com as etapas em sequência e numeradas



Fonte: Adaptado de Silverthorn (2017)

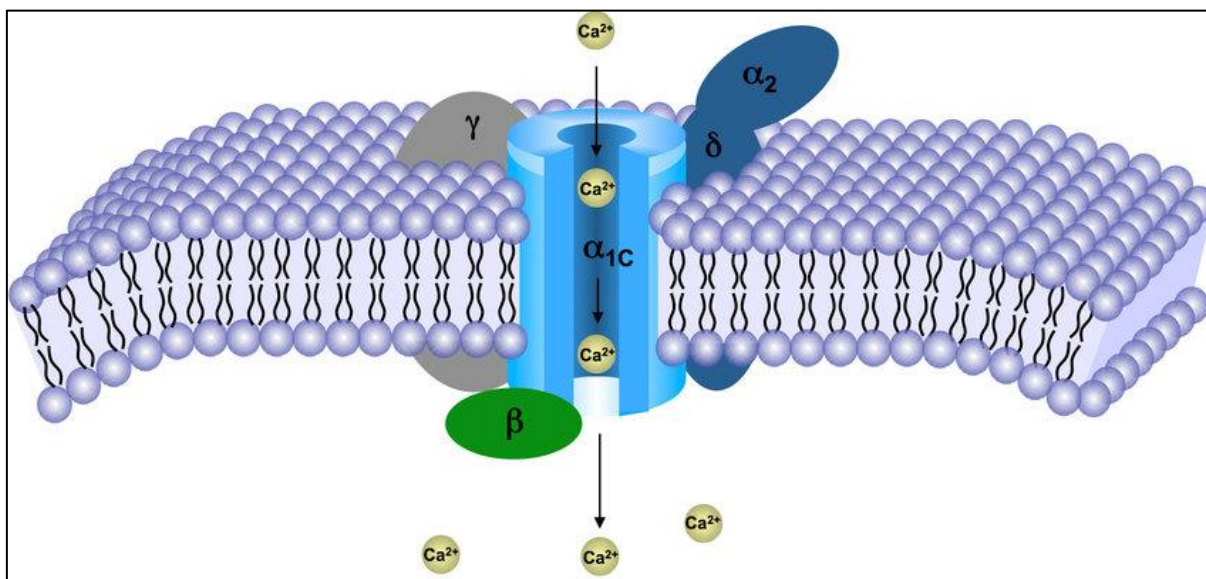
2.3 CANAL DE CÁLCIO DO TIPO L (CaV_{1.2})

O Ca²⁺ é um segundo mensageiro de altíssima importância especialmente quando falamos do acoplamento excitação contração no músculo cardíaco. O influxo desse íon em direção ao ambiente intracelular é o responsável por desencadear tal acoplamento, e, essa passagem se dá através dos chamados canais de cálcio dependente de voltagem ou canais de cálcio do tipo L (*L-Type Calcium Channel* ou LTCC) (BERS, 2002; HARVEY; HELL, 2013).

Esses LTCCs estão presentes não somente em todos os tecidos musculares, mas também em tecidos de outras naturezas como células endócrinas e neurônios, tendo, em cada uma dessas tipagens celulares, funções específicas, como controle hormonal, expressão gênica e integração sináptica. Estudos primários visando entender a estrutura por trás dos LTCCs revelaram a existência de 4 subunidades formando o canal, sendo essas subunidades denominadas α_1 , β e γ com análises subsequentes revelando a existência de uma subunidade $\alpha_2\delta$ formando um dímero com a subunidade α_1 . (CATTERALL, 2000; HARVEY; HELL, 2013).

Apesar da expressão em diversos tecidos com capacidade excitatória, LTCCs são produtos de expressão gênica com propriedades específicas para cada tecido. Um exemplo disso são as diferenças presentes nos canais presente no músculo esquelético e cardíaco. Os LTCCs do músculo esquelético possuem as 4 subunidades citadas anteriormente, no entanto a isoforma expressa no tecido cardíaco (cLTCCs) carece da subunidade γ configurando então uma formação de 3 subunidades. A subunidade α_1 , no tecido cardíaco, também se trata de uma isoforma específica, chamada α_{1c} . Essa subunidade, no entanto, ainda compartilha de funções da sua contraparte presente no tecido muscular, como ser responsável por formar o poro que permite a passagem de Ca²⁺ e também por conter o sítio de ligação para agentes bloqueadores do canal (FIG 6) (MUKHERJEE; SPINALE, 1998).

Figura 6: Estrutura de CaV11.2 e suas subunidades α_1C , $\alpha_2\delta$, β e γ . α_1C representando a subunidade poro permitindo a passagem de Ca^{2+} para o citosol.



Fonte: Adaptado de HU *et al.*, (2017)

As subunidades α_1 possuem 4 domínios homólogos cada um desses domínios sendo composto de seis segmentos transmembranares (S1-S6). Os segmentos S1-S4 correspondem ao domínio sensor de voltagem, enquanto S5-S6 compõe os domínios que forma o poro do canal. Atualmente tem-se como principais moduladores de LTCCs as dihidropiridinas (DHPs), capazes de funcionar como antagonistas ou agonistas, as fenilalquilaminas (PAAs) e as benzodiazepinas (BTZs) (BRUNET *et al.*, 2009; GAO; YAN, 2021).

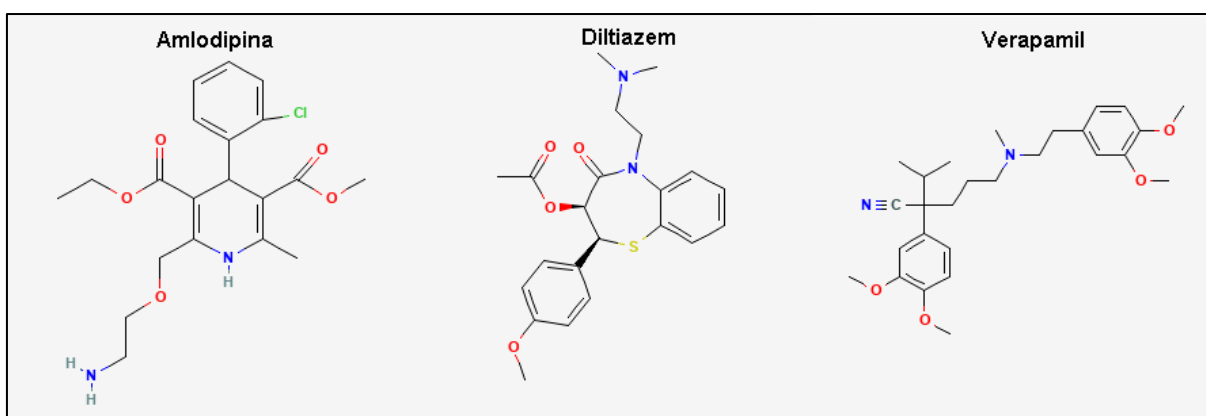
As substâncias pertencentes a esses grupos são amplamente utilizadas como agentes terapêuticos em DCVs, tendo sido introduzidas a mais de quarenta anos atrás. O verapamil, pertencente ao grupo das PAA, tem como mecanismo de ação, o bloqueio físico do poro do canal. A droga atravessa a membrana em uma forma não carregada, sendo reprotonada no citosol e, sequencialmente, se dirige ao poro onde interage com seu sítio de ligação nos segmentos 6 (S6) dos domínios III e IV (TANG *et al.*, 2016, 2019).

Já diltiazem faz parte dos BZTs com aplicação em múltiplos quadros de doenças cardíacas. De acordo com os estudos de Tang *et al* (2019), o sítio de ligação dos agentes das classes das PAAs e BZTs se sobrepõe de uma maneira parcial, sendo no caso do diltiazem também em S6 dos domínios III e IV. O efeito inibitório dessa molécula é aumentado por despolarizações sequenciais, o que sugere uma

preferência da estrutura pelo canal em estado aberto e inativo (TALREJA; CASSAGNOL, 2020).

Amlodipino, nifedipino e nimodipino são exemplos de DHPs utilizadas na clínica, porém um dos fatores que os diferenciam, é que uma vez ligado ao seu sítio de ligação, a inibição do canal acontece por meio de mudança alostérica. Esse sítio de ligação para DHP está presente em uma fresta entre os domínios III e IV e apresenta, curiosamente, a capacidade ser seletivo a enantiômeros de uma molécula. Esta seletividade pode ser observada no Bay K 8644, onde seu enantiômero (*R*)-(+) age como antagonista do canal e (*S*)-(-) age como agonista (FIG 7) (GODFRAIND, 2014; TANG *et al.*, 2016; GAO; YAN, 2021).

Figura 7: Estrutura química dos bloqueadores do canal de cálcio do tipo L



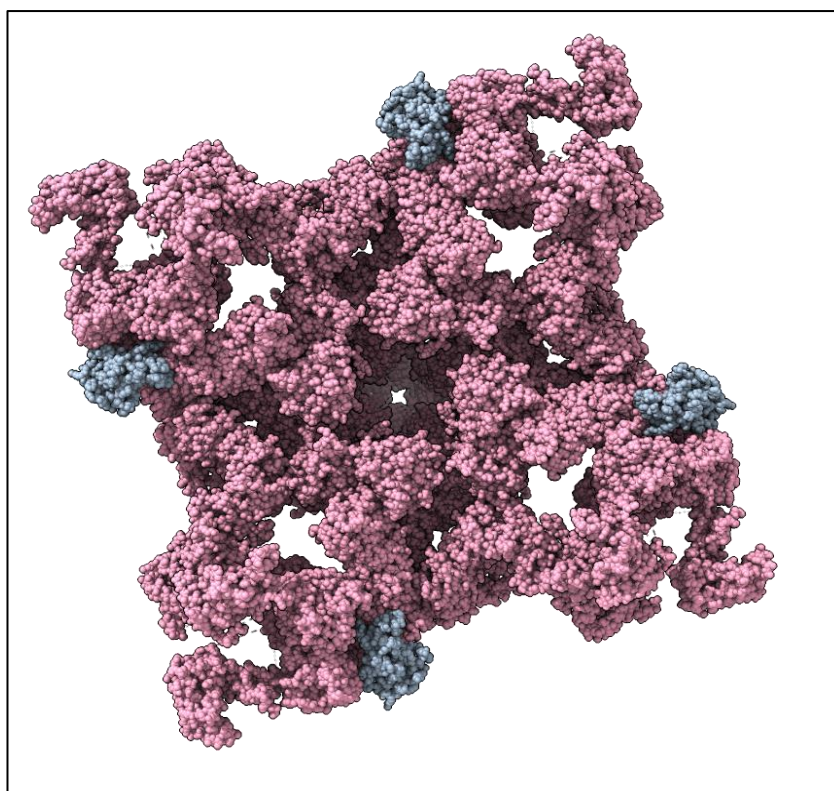
Fonte: Adaptado de PubChem

A modulação de LTCCs se mostrou extremamente importante uma vez que, como descrito por Eisenberg *et al.*, (2004), as DHPs por si só ou associados a outras drogas, estão presentes no tratamento de casos de angina, arritmia atrial e hipertensão. Além disso, existem estudos para o uso desses moduladores para situações para os quais ainda não estão descritas, o chamado uso *off label*. Apesar da popularidade e boa eficácia, bloqueadores de canal de cálcio acabam gerando efeitos adversos uma vez que existe mudança no transiente de cálcio, afetando a contratilidade do músculo cardíaco e conseqüentemente a vazão cardíaca (ELLIOTT *et al.*, 2011)

2.4 RECEPTOR DE RIANODINA DO TIPO 2 (RyR2)

O receptor de rianodina é uma estrutura proteica homotetramérica, que, nos mamíferos possui três isoformas já identificadas, sendo tais isoformas expressas por genes distintos, com a isoforma 2 tendo a maior presença no miocárdio e miócitos cardíaco. Esse receptor pode ser modulado diretamente pelos LTCCs, Ca^{2+} , íon bivalente magnésio (Mg^{2+}), proteína cinase A (PKA) e outros efetores (FIG 8) (RESENDE *et al.*, 2012).

Figura 8: Estrutura homotetramérica do RyR2 com vista da região superior do poro do canal e com FKBP em cinza



Fonte: Adaptado de Gong *et al.*, (2019)

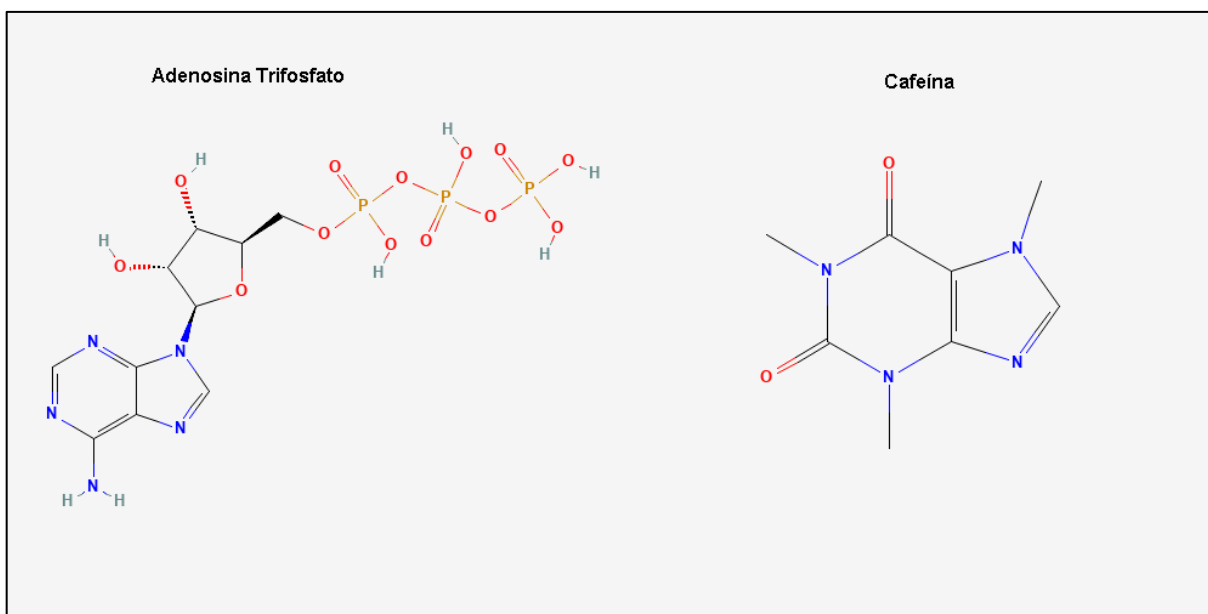
Presente neste receptor estão as chamadas proteínas de ligação FK ou FKBP (do inglês *FK binding protein*). Cada subunidade que compõe o homotetrâmero está ligada a uma FKBP, sendo essas as responsáveis por garantir a estabilidade, o acoplamento de forma adequada e sincronia destes componentes mediante ativação (ZALK *et al.*, 2007)

Modificações estruturais e/ou funcionais em RyR2 aparentam estar correlacionadas com o desenvolvimento potencial de múltiplos quadros cardíacos como taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica do tipo 1, displasia ventricular direita arritmogênica do tipo 2 e fibrilação ventricular idiopática. Essas e

outras doenças estão potencialmente ligadas as mais de 150 mutações no homotetrâmero (CHI *et al.*, 2019)

RyR2 apresenta a capacidade de ser modulado por diversos efetores, alguns íons e cinases, como citado anteriormente, mas também por outros efetores como a Calmodulina (CaM) e cafeína, e, apesar de se ter conhecimento da modulação, o completo mecanismos por trás das modificações causadas nessas interações ainda não estão bem elucidados como ressaltou Kong *et al.*, (2008), mas se tem conhecimento de que a cafeína promove a ativação de RyR2. Outro promotor de abertura do canal seria a adenosina trifosfato (ATP), entretanto só o efeito combinado de ATP e cafeína juntos conseguem promover a abertura do canal, enquanto nenhum dos ligante é capaz de promover tal ação de maneira individual (FIG 9)

Figura 9: Estrutura química de dois modulares da atividade do receptor de rianodina 2

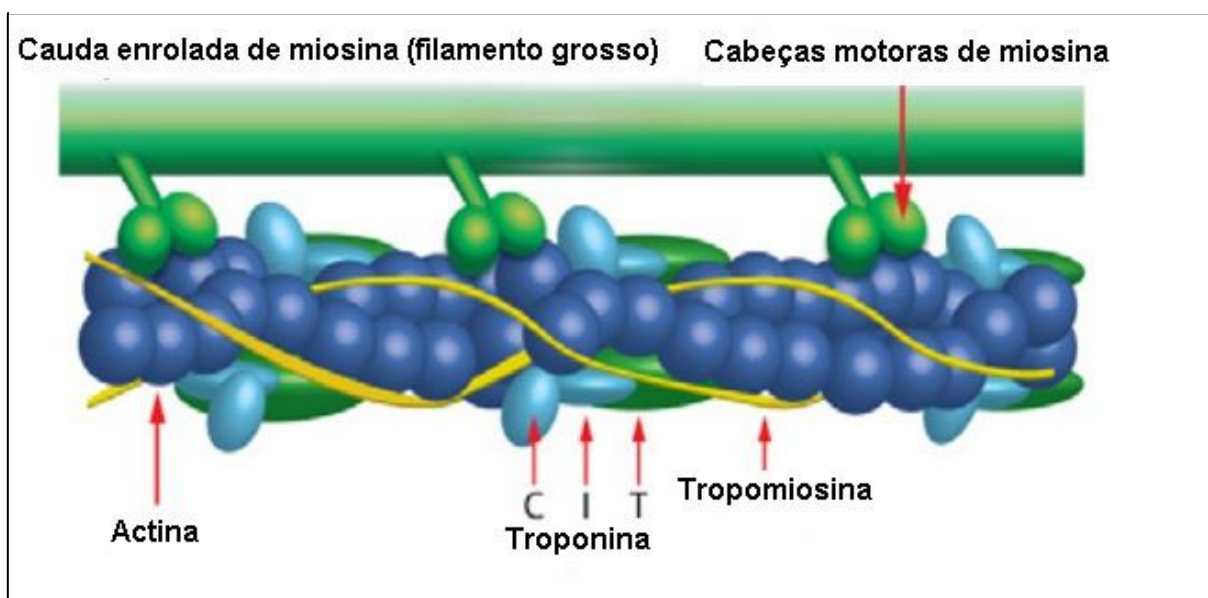


Fonte: Adaptado de PubChem

2.5 COMPLEXO TROPONINA

Por se tratar de um processo complexo, decorrente do aumento na concentração de Ca^{2+} descritos nos tópicos anteriores, a participação do complexo troponina é o principal evento que gera a força mecânica presente do acoplamento excitação-contração. O complexo troponina consiste de 3 subunidades, a troponina C (TnC), a troponina I (TnI) e a troponina T (TnT), tendo cada uma dessas subunidades genes específicos para expressão de isoformas presentes no músculo esquelético e no músculo cardíaco (cTnC, cTnI e cTnT) (FIG 10) (FARAH *et al.*, 1995; KATRUKHA, 2013)

Figura 10: Esquemática do complexo troponina acoplado a tropomiosina, actina e ao filamento de miosina



Fonte: Adaptado de cytoskeleton.com 2019)

A troponina C (cTnC) é uma proteína de massa molecular de 18.4 kDa, possuindo 161 aminoácidos. Essa proteína possui um domínio N-terminal (resíduos 1 a 13) formado pela primeira estrutura α -hélice e quatro proteínas de ligação ao Ca^{2+} (Mãos EF), sendo esta primeira estrutura emparelhada aos domínios globulares N-terminal (resíduos 14 a 87) e C-terminal (resíduos 92 a 161). A região C-terminal da cTnC (cCTnC), durante o acoplamento excitação-contração, se liga a dois cátions bivalentes ou Ca^{2+} , citado anteriormente e o íon magnésio (Mg^{2+}), tendo como

principal função, manter cTnC ligada aos filamentos finos (actina) através da região de ancoramento da cTnI (resíduos 34 a 71) (LI *et al.*, 1999;)

Durante o processo de sístole, o Ca^{2+} advindo do citosol e da liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , se liga a região N-terminal da cTnC (cNTnC), através de proteínas EF, o principal tipo proteína conhecido por se ligar ao Ca^{2+} , formando então um complexo (cNTnC • Ca^{2+}). A formação do complexo, resulta também na interação da região interruptor ou “switch” da cTnI (resíduos 147-163), o que causa a dissociação da região inibitória e C-terminal da cTnI (resíduos 128 a 147 e 163 a 181 respectivamente). O resultado da dissociação de cTnI dos filamentos de actina permite a mudança conformacional da tropomiosina, o que expõe o sítio de ligação para miosina presente na actina e a subsequente formação das pontes cruzadas (LEWIT-BENTLEY *et al.*, 2000; ROBERTSON *et al.*, 2010)

A troponina I (cTnI) é uma proteína com a massa molecular de 24 kDa, começando com 210 aminoácidos e ao fim da síntese possuindo 209 aminoácidos. Assim como cTnC, cTnI é subdividida em região C-terminal, a região inibitória, que é a responsável pela inibição da ATPase responsável pela contração e a região “switch” que desencadeia os eventos de dissociação que levam ao processo contrátil. Alguns estudos prévios sugerem que para cTnI desempenhar sua total capacidade inibitória, tanto o domínio inibitório quanto a presença de resíduos da região C-terminal são necessários. Esse modelo implica que a deleção de porções na região C-terminal, resulta na modificação da interação entre cNTnC e cCTnI (RARICK *et al.*, 1997; ROBERTSON *et al.*, 2010)

O último componente desse complexo é a troponina T (cTnT), responsável pela aderência do complexo troponina por inteiro nos filamentos de actina. No músculo cardíaco adulto a principal isoforma expressa é a TnT3, tendo massa molecular de aproximadamente 36 kDa e 287 aminoácidos. A cTnT se estende pelos filamentos de actina e é formada pela região N-terminal variável (resíduos 2 a 68), domínio conservativo central (resíduos 69 a 200) e região C-terminal (cCTnT) (resíduos 201 a 288). O domínio central forma o sítio de interação de cTnT com a tropomiosina (Tm), sendo esse sítio chamado de T1 (resíduos 98 a 136). Já cCTnT contém as estruturas α -hélices denominadas H1(resíduos 204 a 220) e H2 (resíduos 226 a 271), que participam da interação entre cTnT e cTnI (GOMES *et al.*, 2002)

No contexto atual, em um quadro bem estabelecido de DCV, sabe-se que a vazão produzida pelo ventrículo esquerdo é insuficiente para suprir a demanda

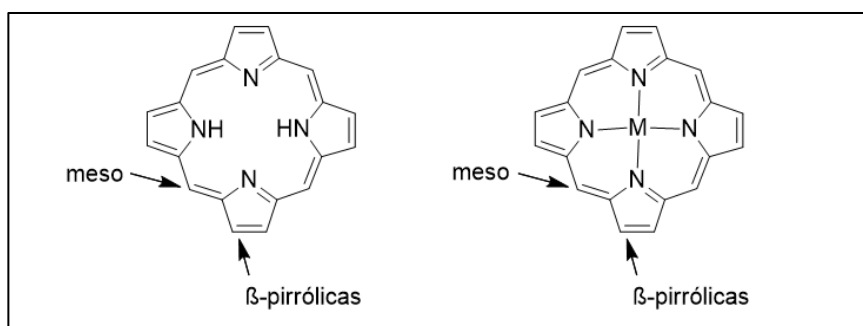
metabólica corporal. Para combater dado quadro, o uso de drogas com efeito inotrópico é implantado, entretanto, boa parte das drogas utilizadas para o tratamento desses quadros tem um fator comum, que é a alteração no transiente de Ca^{2+} , apesar de isso acontecer por mecanismos específicos para cada classe de substância (POLLESELLO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018).

Alterações no fluxo de Ca^{2+} desencadeiam um número significativo de efeitos adversos, o que faz com as estratégias terapêuticas em que se faz necessário o uso de agentes inotrópicos não sejam 100% benéficas para os usuários. Pensando numa estratégia onde não há a modulação no influxo de Ca^{2+} , a classe dos sensibilizadores do Ca^{2+} (SCs) surge como uma opção, uma vez que a ação dessa classe se daria no complexo troponina. Os compostos dessa classe, funcionam através da estabilização da ligação do Ca^{2+} no complexo $\text{cTnC} \cdot \text{Ca}^{2+}$, permitindo uma maior interação com cTnI, promovendo a ligação do com complexo com a região *switch* de cTnI e permitindo sua ativação (ARRIGO *et al.*, 2015; LINDERT *et al.*, 2015)

2.6 PORFIRINAS

As porfirinas e seus complexos metálicos compreendem uma classe com um grande número de compostos, sendo essas substâncias macrocíclicas presentes em diversas formas de vida. Por possuírem alta variedade estrutural, muitas porfirinas vêm sendo aplicadas em múltiplos campos da medicina (FIG 11) (MILGROM, 1997; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010;)

Figura 11: Estrutura das porfirinas. A esquerda o núcleo geral porfirínico e a direita a estrutura de um complexo metálico porfirínico ou metaloporfirina



Fonte: Sarmiento-Neto (2016)

O evento chamado estresse oxidativo é o resultado de um acúmulo das chamadas espécies reativas de oxigênio em contraste com os sistemas de defesa antioxidantes. O acúmulo das ROS está relacionado ao aparecimento de diversas

doenças. Em modelos experimentais e organismo humano, o acúmulo destas moléculas leva a lesões em proteínas, lipídeos e até mesmo no DNA. Mas apesar dos efeitos deletérios atribuídos as ROS, em quantidades apropriadas, elas desempenham papéis fisiológicos na sinalização redox (BARBOSA *et al.*, 2010; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010; WATANABE *et al.*, 2014).

Trazida à tona a relevância do estresse oxidativo na origem de diversos processos fisiopatológicos e tendo em consideração que um dos mecanismos de defesa mais relevantes contra esse evento trata-se da enzima superóxido dismutase (SOD), a busca por substâncias com propriedades similares trouxe à relevância o uso de complexos metálicos à base de Mn(III)-porfirinas. (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2010; WATANABE, 2014).

Apesar de se saber do seu potencial como um ótimo modulador redox, diversos estudos nos últimos anos visaram explorar o potencial terapêutico dessas substâncias como ligantes, ou seja, observando a interação dessas moléculas com potenciais alvos como DNA, Enzimas e proteínas funcionais. Esses estudos se aplicam não somente aos complexos metálicos como também as bases livres. Trabalhos como o de Ahmed *et al.* (2020) e Singh *et al.* (2016) utilizam dessa possibilidade para avaliar a atividade antitumoral, antioxidante e antifúngica de algumas porfirinas e complexos metálicos porfirínicos.

Barbosa *et al.*, (2020) analisaram os efeitos da metaloporfirina Mn(III) *meso*-tetrasquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfirina (MnTE-2-PyP⁵⁺) em cardiomiócitos isolados e corações de ratos. De forma interessante, esse estudo demonstrou que a MnTE-2-PyP⁵⁺ exercia um efeito de prevenção e tratamento de arritmias cardíacas, entretanto, não apresentando o principal efeito adverso dos principais fármacos anti-arrítmicos, que é a redução da força de contração cardíaca. De forma mais específica, verificou-se que MnTE-2-PyP⁵⁺ não alterava o perfil do miócito cardíaco isolado, do coração isolado e do coração *in vivo* sendo esses efeitos não atrelados, primariamente, a alterações no estado redox dos cardiomiócitos.

2.7 ATRACAMENTO MOLECULAR

O aumento no poder computacional observado nas últimas três décadas tem se mostrado como um grande facilitador no processo de descoberta de drogas assistida por computador (CADD do inglês *computer aided drug Discovery*). Esse crescimento facilitou também o desenvolvimento e acesso a grandes bancos de dados de proteínas e moléculas. Consequentemente, o acesso a essas plataformas, permitiu uma melhora do processo automatizado de *molecular docking* por meio do uso de softwares (MORRIS, 2008).

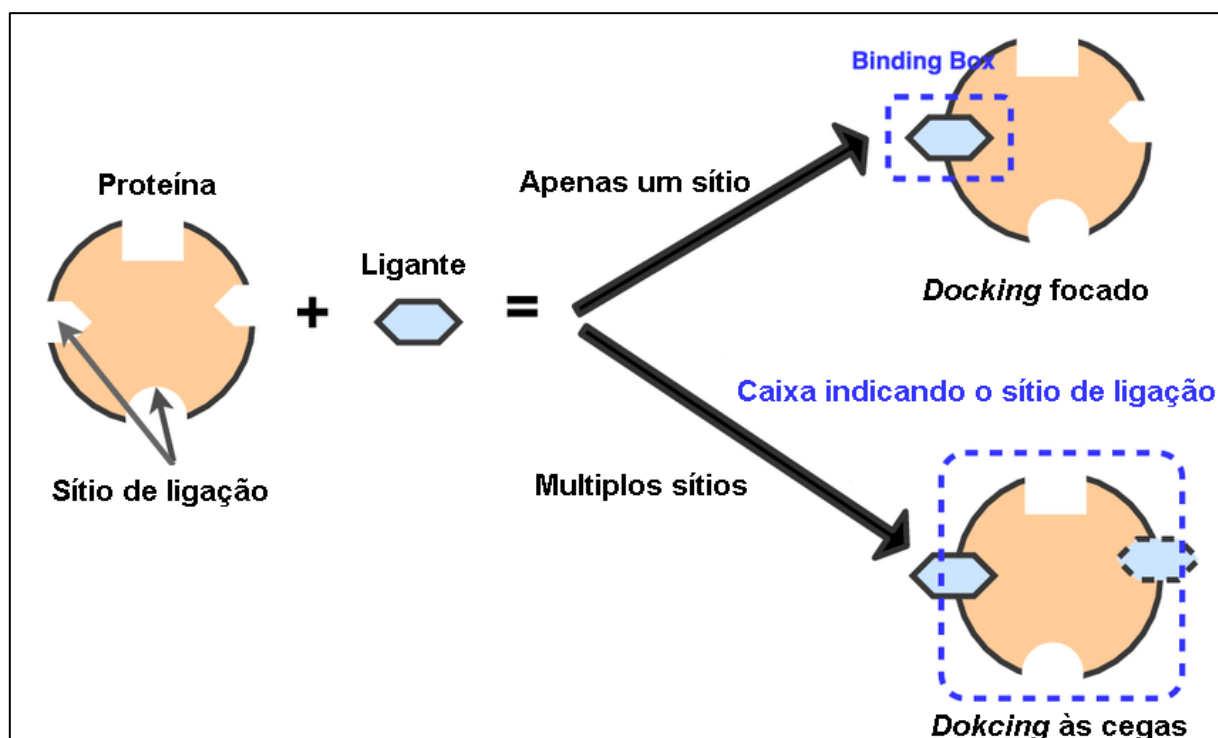
O atracamento molecular ou *molecular docking* visa simular *in silico* a melhor forma de interação entre um ligante e um receptor através da observação da afinidade da ligação e a pose do ligante diante de um alvo. A técnica possui uma quantidade vasta de usos, sendo bastante utilizada em: triagens virtuais, estudos da relação estrutura-atividade, otimização de drogas, predição de estudos mutagênicos e descoberta de mecanismos de ação (FAN *et al.*, 2019).

Durante o *docking* os algoritmos utilizados pelos programas investigam um grande número de poses ou conformações exercidas por um ligante após a complexação com uma proteína e avaliam essas conformações por meio da sua afinidade de ligação, também conhecida como energia livre de ligação ou energia livre de Gibbs (ΔG). Essa energia de ligação é estimada por dois tipos de método: o empírico e o semiempírico de cálculo de energia livre. Estes cálculos são feitos baseado em fatores como campo de força molecular ou baseados em função de conhecimento prévio. A predição da energia de ligação acontece através da avaliação dos fenômenos físico-químicos ligados à formação do complexo proteína-ligante, como as interações intermoleculares, dessolvatação e efeitos entrópicos. Logo, quanto maior o número de fenômenos a serem avaliados, maior a precisão no processo de *scoring*, e assim maior o custo computacional envolvido no processo (SLIWOSKI *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015).

Na implementação desta técnica computacional, é normal a utilização de sítios de ligação já conhecidos em toda a estrutura da proteína alvo, no entanto, em caso de testes ou da falta de informação sobre os sítios de ligação presentes, é possível a aplicação do chamado *blind docking* ou atracamento às cegas, onde será utilizada toda a superfície da proteína em busca de sítios ou cavidades cujo o ligante possa interagir. Esse método é considerado útil uma vez que é imparcial na descoberta de

supostos sítios de ligação. Outro método no caso de falta informação sobre os possíveis sítios de ligação, é a utilização de *softwares* que possam detectar essas cavidades. Ambas estratégias são validas, no entanto, o custo computacional de ambas operações difere significativamente (FIG 12) (SHARMA *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2019).

Figura 12: Ilustração representando o *docking* com sítio de ligação conhecido e o *Blind Docking*



Fonte: Adaptado de Saadi *et al.*, (2020)

3 OBJETIVO

3.1 GERAL

Analisar a interação de 2-*N*-alquilpiridilporfirinas catiônicas com proteínas envolvidas na dinâmica de Ca^{2+} em cardiomiócitos como contribuição para o entendimento das interações de MnTE-2-PyP5⁺ com proteínas do tecido cardíaco.

3.2 ESPECÍFICOS

Investigar a interação de *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirina (H₂TM-2-PyP⁴⁺) e *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfirina (H₂TE-2-PyP⁴⁺) com o tecido cardíaco levando em conta os seguintes alvos:

- Canal de cálcio do tipo L (LTCC)/CaV_{1.2};
- Troponina C cardíaca (cTnC).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para identificar como acontece o processo de interação entre as porfirinas e proteínas do tecido cardíaco, H₂TE-2-PyP⁴⁺) e H₂TE-2-PyP⁴⁺) foram utilizadas na técnica de atracamento molecular (*molecular docking*) como descrito no trabalho de Sharma *et al.* (2018) com ênfase no protocolo de *blind docking* (BD).

4.1 PROTEÍNAS/MACROMOLÉCULAS

Foram retirados do RCSB Protein Data Bank (PDB) os arquivos cristalográficos de CaVAb um modelo homotetramérico de origem bacteriana com inibição por DHPs, PAAs e BZTs e da região N-terminal da troponina C cardíaca com parte da região ativadora da troponina I cardíaca (resíduos 144 a 163) (Tabela 1). Todas as estruturas tiveram as moléculas de água, íons e ligantes retiradas e passaram por um processo de minimização de energia através do *software Swiss-PDB Viewer* (SPDBV).

Tabela 1: Lista macromoléculas/proteínas utilizadas com suas respectivas informações

NOME DA ESTRUTURA	AUTOR	ANO DE PUBLICAÇÃO	PDB ID
<i>Structure of CaVAb in complex with amlodipine</i>	Tang <i>et al.</i>	2016	5KMD
<i>Structure of CaVAb in complex with Br-verapamil</i>	Tang <i>et al.</i>	2016	5KMH
<i>Structure of CaVAb in complex with Diltiazem and Amlodipine</i>	Tang <i>et al.</i>	2019	6KE5
<i>A structural and functional perspective into the mechanism of Ca²⁺-sensitizers that target the cardiac troponin complex</i>	Robertson <i>et al.</i>	2010	2L1R

Fonte: Autor

4.2 LIGANTES

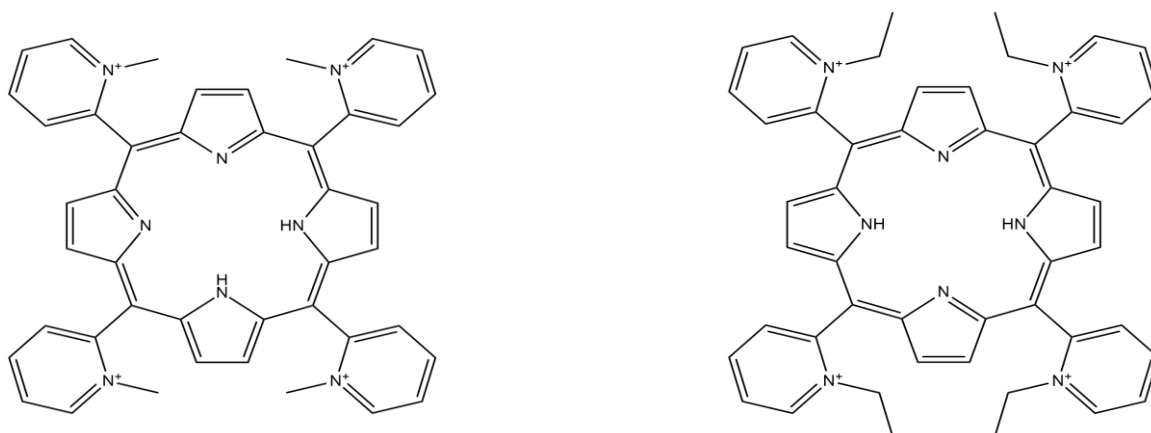
Para esse estudo foram utilizadas as estruturas das seguintes porfirinas: *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirina ($H_2TM-2-PyP^{4+}$) e *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfirina ($H_2TE-2-PyP^{4+}$). Essas estruturas planares e suas informações foram retiradas da base de dados PubChem (KIM *et al.*, 2021) no formato de extensão SDF e convertidas para o formato PDB através do *software* Open Babel (O'BOYLE *et al.*, 2011). Na tabela 2 e Figura 13 é possível observar as informações como as estruturas fórmula, peso molecular, aceptores para ligação de hidrogênio (HbA), doadores para ligação de hidrogênio (HbD) e números ligações rotacionáveis (nRB).

Tabela 2: Informações a respeito dos ligantes utilizados para execução do trabalho

NOME DO COMPOSTO	PUBCHEM ID	FORMULA QUÍMICA	PESO MOLECULAR	HBA	HBD	NRD
MESO-						
TETRAQUIS(<i>N</i>-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA	151599	$C_{44}H_{38}N_8^{4+}$	678.8	2	2	4
MESO-						
TETRAQUIS(<i>N</i>-ETILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA	135415934	$C_{48}H_{46}N_8^{4+}$	734.9	2	2	8

Fonte: Autor

Figura 13: Estruturas de *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirina e *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfirina



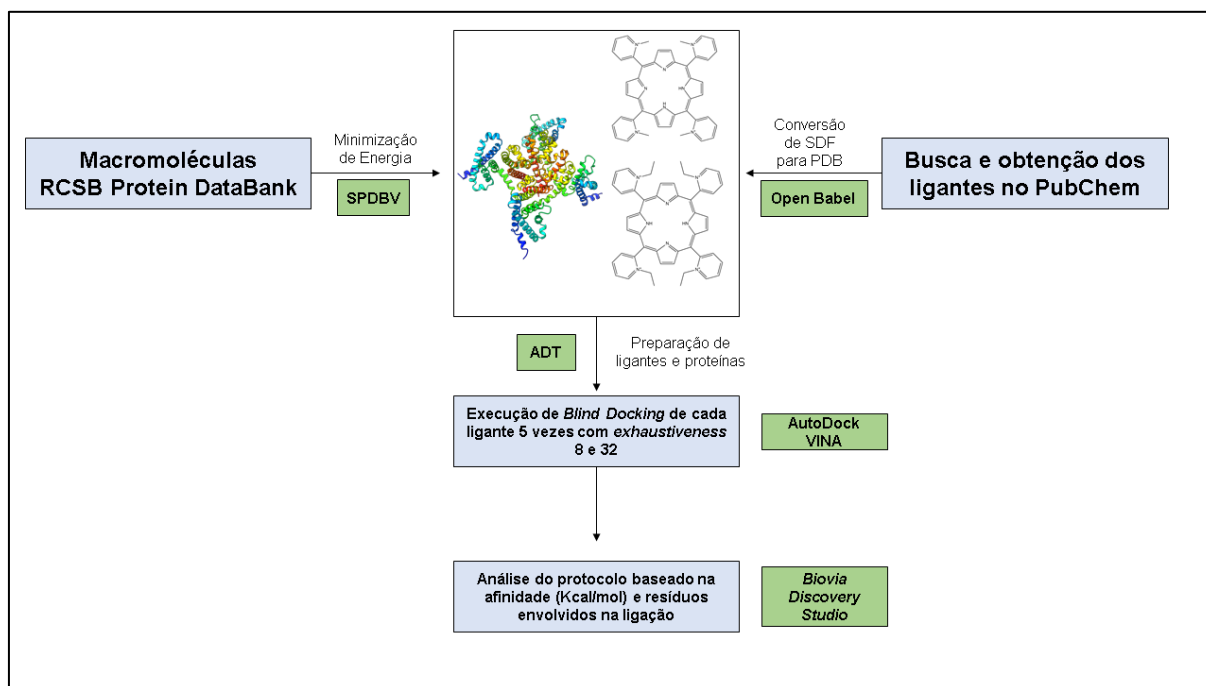
Fonte: PUBCHEM

4.3 PREPARAÇÃO DE PROTEÍNA E LIGANTES

A preparação das macromoléculas foi feita com através do pacote AutoDock Tools 4 (ADT4). Foram adicionadas as estruturas os hidrogênios, cargas de Kollman e calculadas as cargas de Gasteiger. ADT também foi utilizado no processamento dos ligantes.

4.4 MOLECULAR BLIND DOCKING

Figura 14: Fluxograma do protocolo utilizada para execução de Blind Docking



Fonte: Autor

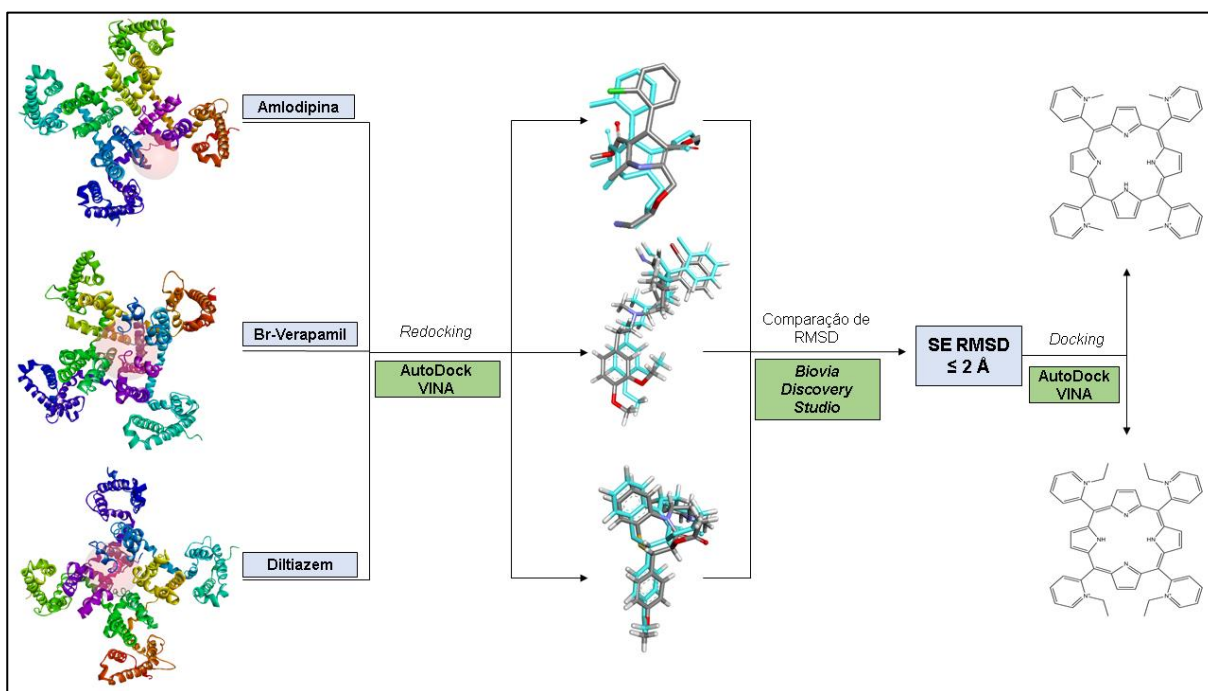
Para execução do *Blind Docking* (BD) foi definido um GRID de dimensões 104x102x70 com o espaçamento de 1 Å cobrindo toda a estrutura da proteína. Com as coordenadas definidas através do ADT, foram gerados dois arquivos de configuração para o AutoDock Vina, onde o primeiro continha o parâmetro *exhaustiveness* com valor 8 e o segundo com o valor 32. Com os arquivos prontos foram *dockings* em quintuplicata com *exhaustiveness* nos valores 8 e 32. A melhor conformação de cada tentativa, baseada na sua energia de ligação/afinidade, foi selecionada e as 5 tentativas de cada molécula, para ambos parâmetros, *exhaustiveness* foram visualizadas através do UCSF Chimera X (GODDARD *et al.*, 2018; PETTERSEN *et al.*, 2021), onde foram sobrepostas, visando observar se a região de atracamento foi a mesma durante as 5 tentativas. Além disso, as

conformações com melhor energia foram selecionadas para a visualização dos resíduos de interação com os ligantes tanto num plano 3D quanto 2D através do Biovia Discovery Studio Visualizer (FIG 14).

4.5 REDOCKING E DOCKING EM SÍTIO CONHECIDO

Uma vez que não foram encontradas referências para o *docking* porfirinas com componentes do tecido cardíaco, também foram feitos testes nos sítios de ligação para classes de moléculas conhecidas. Uma vez que os ligantes originais foram retirados durante a etapa de preparação das macromoléculas os mesmos foram preparados novamente por meio do ADT e um novo GRID foi gerado baseado nos resíduos que compõe os sítios de ligação para os mesmos com o auxílio da função *define site* do Biovia Discovery Studio Visualizer e então foi feito o *redocking* destes ligantes com *exhaustiveness* de valor 8 e 32. Para avaliar o *redocking* também foi utilizado o Biovia Discovery Studio Visualizer levando em consideração o valor do desvio quadrático médio (RMSD do inglês *root mean square deviation*), sendo aceito como um bom parâmetro um $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$.

Figura 15: Fluxograma da execução de redocking e docking com base no valor de RMSD



Fonte: Autor

Com os valores de RMSD dentro da margem aceita foi feito o *docking* de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ nos sítios de ligação das moléculas “redockadas”, visando observar a afinidade desses sítios com as moléculas, observar quais resíduos fazem parte do processo de interação e se a afinidade demonstrada é superior, inferior ou igual aos valores encontrados com o protocolo de *BD*. (FIG 15)

4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a visualização e obtenção das imagens adquiridas dos protocolos foram utilizados os softwares, Chimera X (GODDARD *et al.*, 2018; PETTERSEN *et al.*, 2021) e o Biovia Discovery Studio Visualizer, sendo o último também utilizado para calcular o RMSD e gerar os diagramas 2D de interação de ligantes e resíduos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO¹

5.1 BLIND DOCKING H₂TM-2-PyP⁴⁺ COM CaVAb

As diferentes afinidades das conformações obtidas no protocolo de *BD* (n=5) com o parâmetro *exhaustiveness* com valor 8 e 32 são representadas na tabela 3.

Tabela 3: Valores de afinidade obtidos no BD de CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TM-2-PyP⁴⁺

CaVAb (PDB ID:5KMD) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ (BD)			
Exhaustiveness 8 e 32			
NOME DO COMPOSTO	TENTATIVA	AFINIDADE (8) (KCAL/MOL)	AFINIDADE (32) (KCAL/MOL)
MESO-TETRAQUIS(N-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	1	-11.5	-12.4
	2	-12.4	-12.4
	3	-12.4	-12.4
	4	-12.2	-12.2
	5	-12.2	-12.2

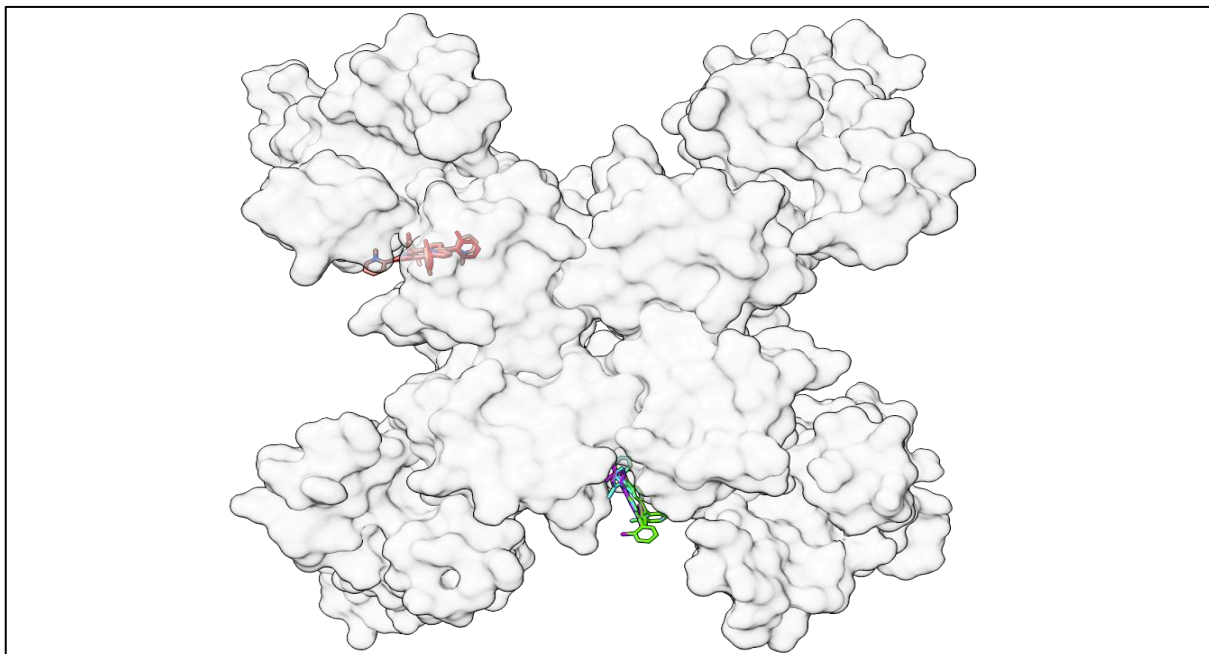
Fonte: Autor

Foi observado que, no uso de *exhaustiveness* no valor 8, que é o padrão utilizado pelo AutoDock Vina, houve uma flutuação maior no valor da afinidade, tendo elas aparecido no valor de -11.5 kcal/mol na primeira tentativa (estrutura em vermelho), -12.4 kcal/mol nas duas tentativas subsequentes (estrutura em ciano e verde respectivamente), -11.3 na quarta tentativa (estrutura em laranja) de -12.4 kcal/mol na última simulação (estrutura em roxo). Nas duas tentativas onde houve mudança no valor da afinidade, foi possível notar que a molécula se ligou em outra cavidade de CaVAb (FIG 17).

Quando o valor de *exhaustiveness* utilizado foi 32, nas três primeiras simulações o valor de afinidade obtido foi de -12.4 kcal/mol (estruturas em vermelho, ciano e verde respectivamente) enquanto nas duas últimas tentativas o valor foi de -12.2 kcal/mol (estruturas em laranja e roxo) (FIG 16).

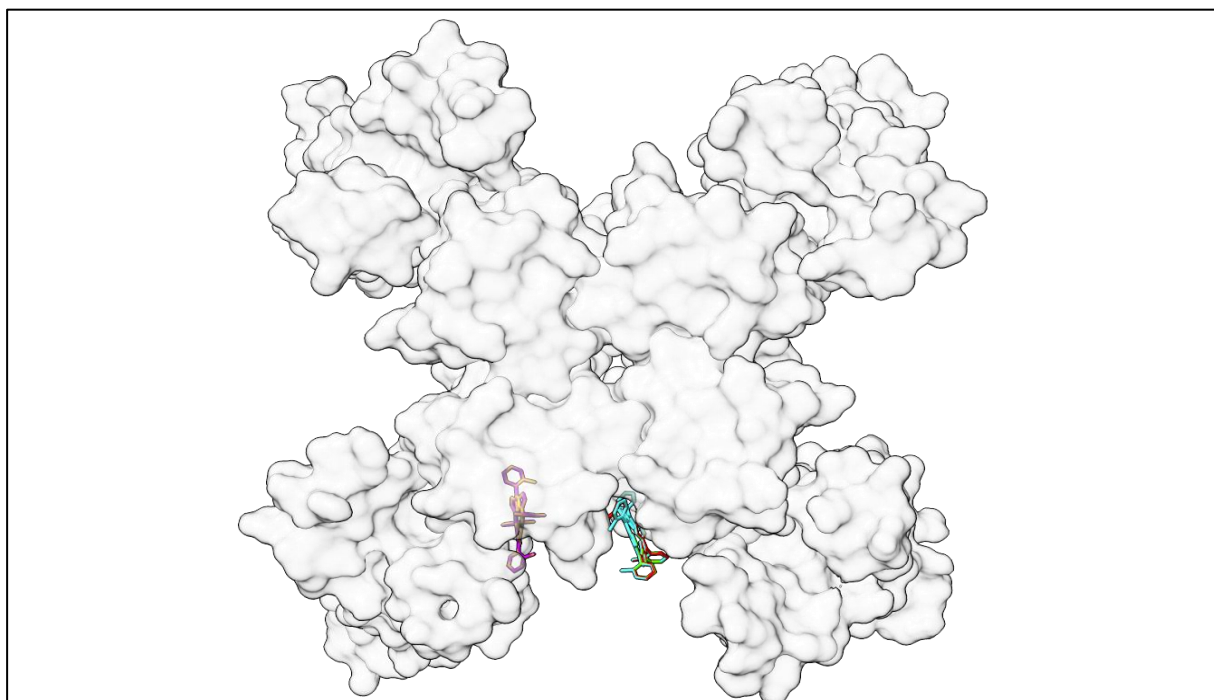
¹ Todos os resultados a partir desse ponto se apresentam coordenados de acordo com relação entre tentativa e cor, onde a estrutura vermelha é a de número 1, ciano número 2, verde número 3, laranja número 4 e roxo número 5.

Figura 17: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8



Fonte: Autor

Figura 16: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 32

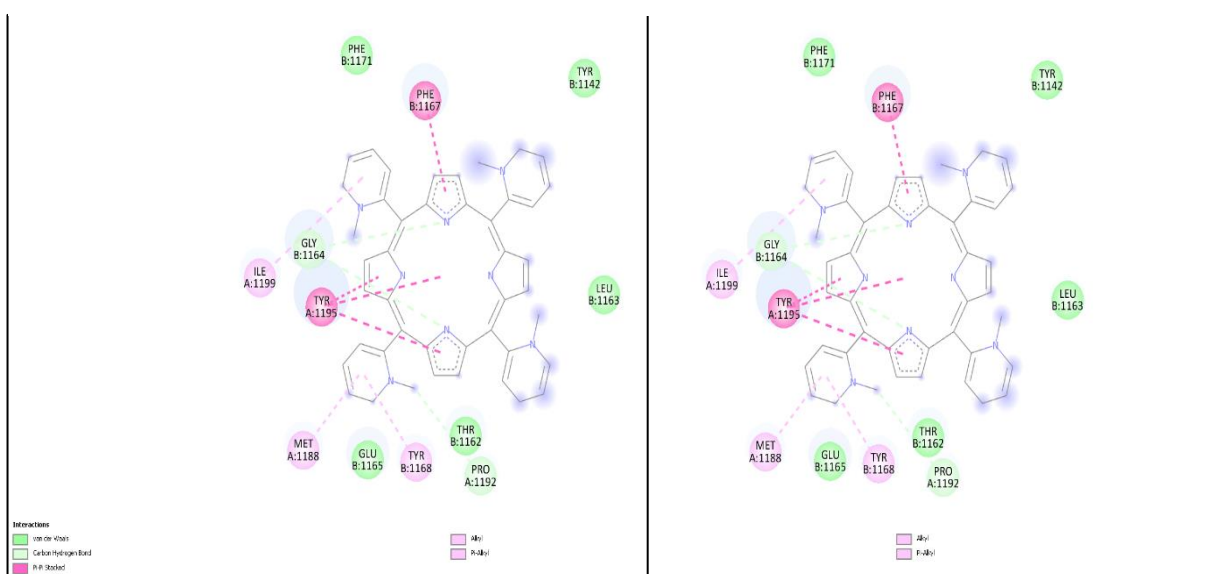


Fonte: Autor

O sítio de ligação de CaVAb (PDB ID: 5KMD) onde há prevalência de ocupação corresponde ao sítio de ligação para drogas da classe DHPs, como relata Tang *et al.*, (2016) nos seus resultados, onde é mostrado que os resíduos de tirosina 1195 (TYR 1195), isoleucina 1199 (ILE1199), fenilalanina 1167 (PHE 1167), tirosina 1168 (TYR 1168) e fenilalanina 1171 (PHE1171) são os responsáveis por acomodar os ligantes nessa região.

A conformação da tentativa 3 com *exhaustiveness* 8 foi selecionada para análise visualização da interação entre H₂TM-2-PyP⁴⁺ e CaVAb, uma vez que o RMSD quando comparada as estruturas 2 e 5 possui um valor muito baixo (0.004 Å e 0.005 Å respectivamente). Na figura 18 podemos observar que H₂TM-2-PyP⁴⁺ interage com os 5 resíduos (apêndice A e B) que formam o bolso hidrofóbico que acomoda as dihidropiridinas.

Figura 18: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8 e 32 interações



Fonte: Autor

5.2 BLIND DOCKING H₂TE-2-PyP⁴⁺

As diferentes afinidades das conformações obtidas no protocolo de *BD* (n=5) com o parâmetro *exhaustiveness* com valor 8 e 32 são representadas na tabela 4.

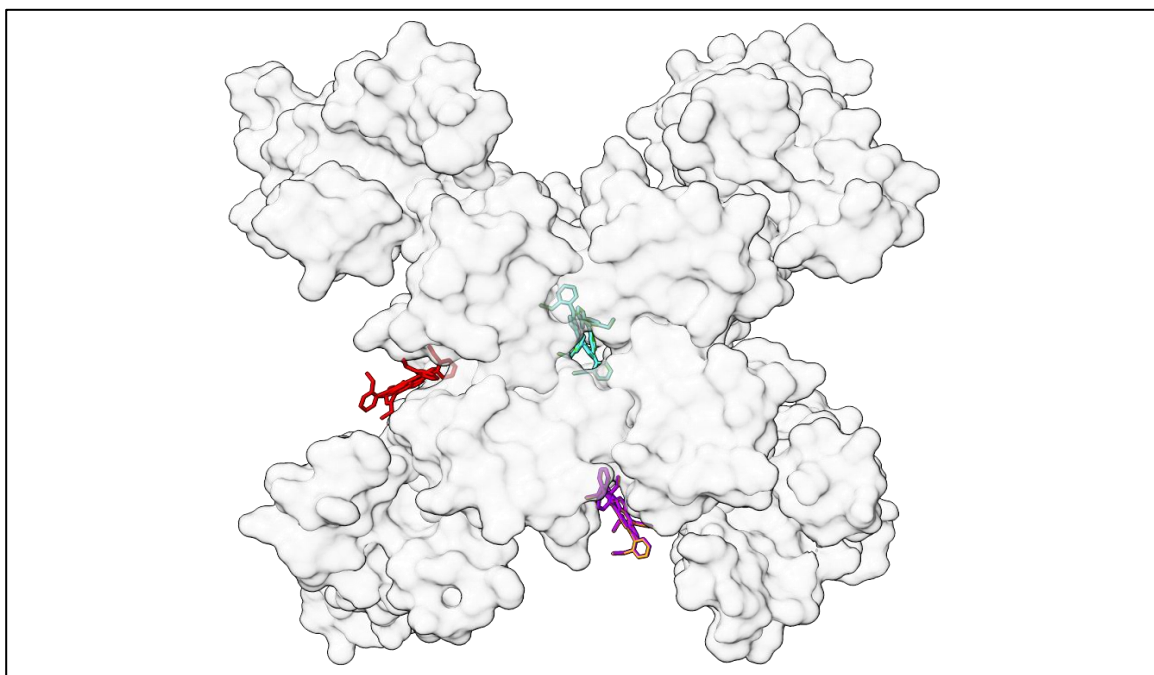
Tabela 4: Valores de afinidade obtidos no BD de CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TE-2-PyP⁴⁺

CaVAb (PDB ID:5KMD) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ (BD)			
<i>Exhaustiveness</i> 8 e 32			
NOME DO COMPOSTO	TENTATIVA	AFINIDADE (8) (KCAL/MOL)	AFINIDADE (32) (KCAL/MOL)
MESO-	1	-11.4	-12.3
TETRAQUIS(N-	2	-12.8	-12.3
ETILPIRIDÍNIO-2-	3	-12.8	-12.3
IL)PORFIRINA	4	-12.3	-12.3
(H ₂ TE-2-PYP4+)	5	-12.3	-12.3

Com *exhaustiveness* em 8 observou-se uma variação elevada nos valores de afinidade. O primeiro valor encontrado foi de -11.4 kcal/mol (Estrutura em vermelho), o segundo e terceiro foram de -11.8 kcal/mol (estruturas em ciano e verde respectivamente), já a quarta e quinta de -12.3 kcal/mol (estruturas em laranja e roxo respectivamente) (apêndice C). Junta da variação de afinidade, foi observado também a variação nos sítios de ligação, sendo eles três, com dois localizados nas bordas dos domínios e um no centro do canal (FIG 19).

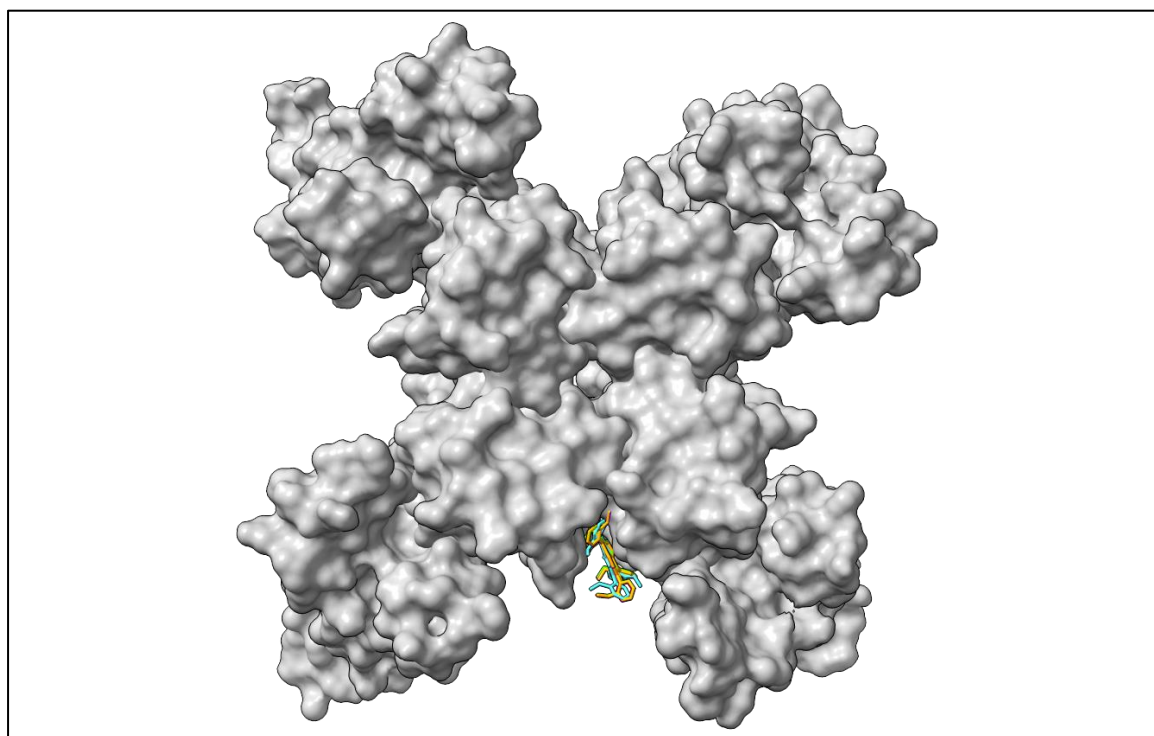
Com 32 no valor *exhaustiveness* foi possível observar que não houve variação nos valores de afinidade encontrados e nas cavidades (FIG20) ocupadas na proteína, entretanto, a tentativa de número 5 apresentou algumas interações diferentes das demais (apêndice D), juntamente de um RMSD maior quando comparado as outras conformações (0,357 Å, 0356 Å, 0356 Å e 0,358 Å).

Figura 19: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8



Fonte: Autor

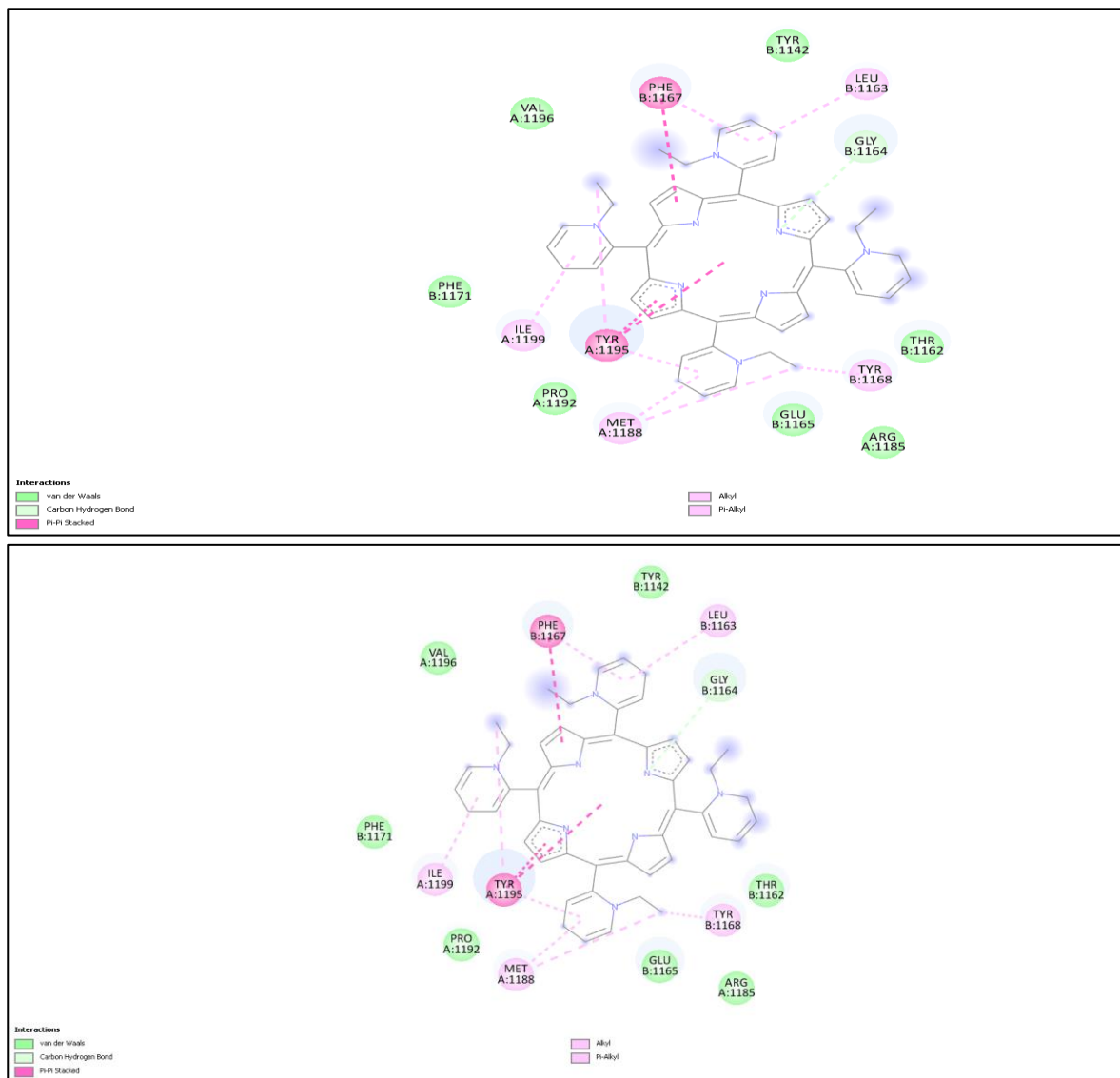
Figura 20: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 32



Fonte: Autor

Seguindo no mesmo padrão que H₂TM-2-PyP⁴⁺, H₂TE-2-PyP⁴⁺ apresentou uma maior interação e afinidade com os resíduos que compõe o sítio de ligação para compostos da classe dihidropiridinas (Tang *et al.*, 2014, 2016). É possível observar na figura 21 os resíduos que compõe o *pocket* e suas interações com H₂TE-2-PyP⁴⁺. Esse padrão é válido tanto para melhor conformação obtida com *exhaustiveness* 8 e 32.

Figura 21: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8 e 32 interações (2D)

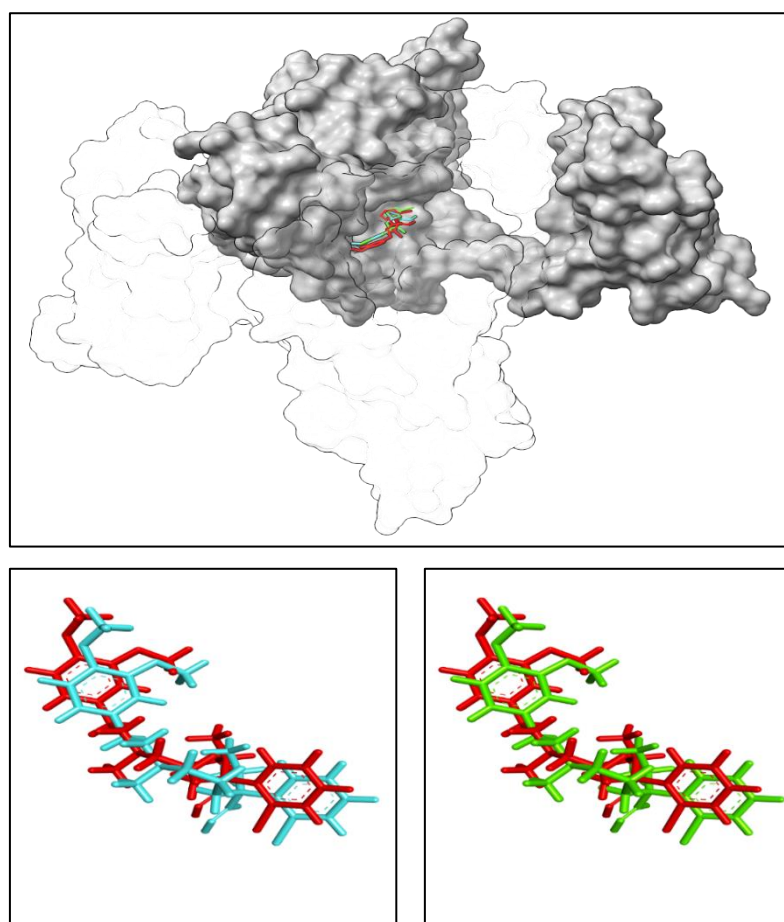


Fonte: Autor

5.3 REDOCKING E DOCKING H₂TM-2-PYP4⁺ E H₂TE-2-PYP4⁺ NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE PAAs

Levando em conta as conformações 2 e 3 com o parâmetro *exhaustiveness* em 8 no BD de H₂TE-2-PYP4⁺, foi observada a interação desta estrutura em proximidade ao sítio de ligação para compostos da classe das fenilalquilaminas (PAAs). Baseado nessa informação foi feito o *docking* de H₂TM-2-PYP4⁺ e H₂TE-2-PYP4⁺ neste sítio, mas antes de executar o protocolo, foi feito o procedimento de *redocking*, ainda levando em conta o parâmetro *exhaustiveness*, do Br-Verapamil, previamente inserido na estrutura original (PDB ID: 5KMH). Com o *redocking* executado, uma comparação da estrutura nativa e da entre as estruturas/poses foi feita, onde pode-se observar um RMSD de 1.2557 Å (*exhaustiveness* 8) e 1.3101 Å (*exhaustiveness* 32) (FIG 22).

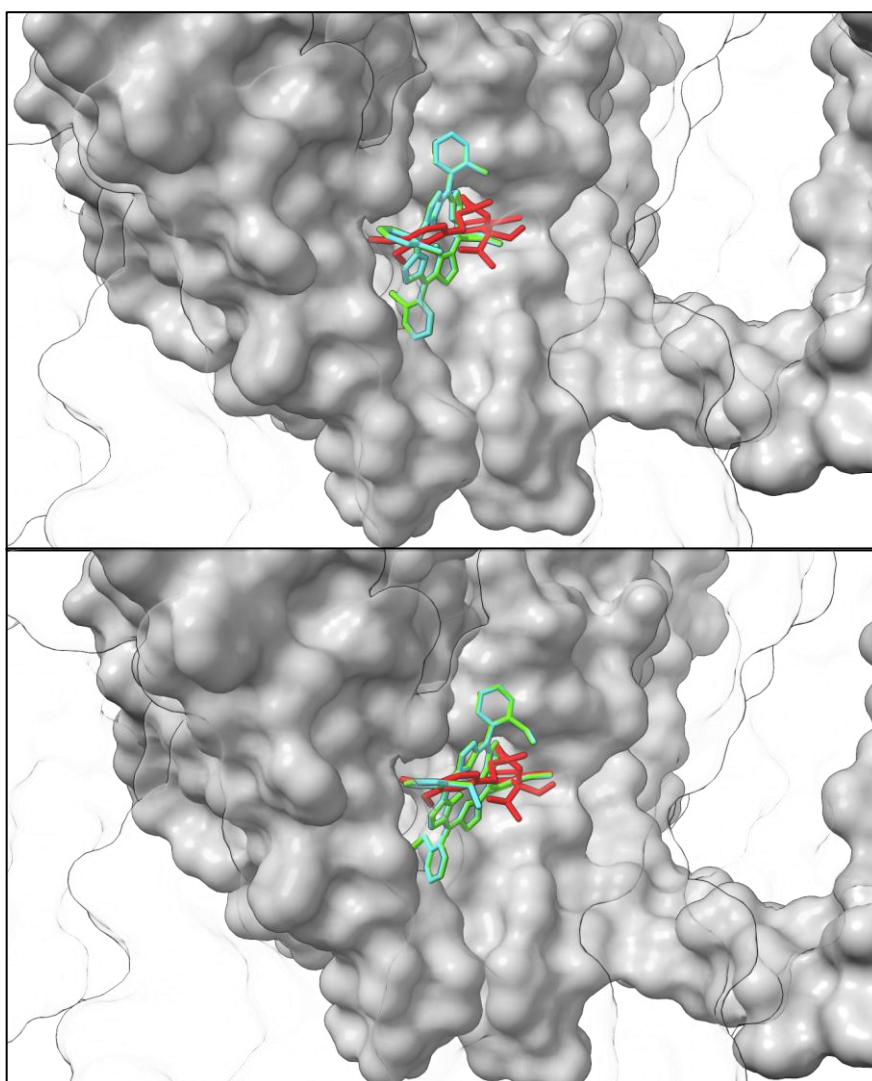
Figura 22: CaVAb (PDB ID:5KMH) – Br-Verapamil + *redockings* (*exhaustiveness* 8 e 32)



Fonte: Autor

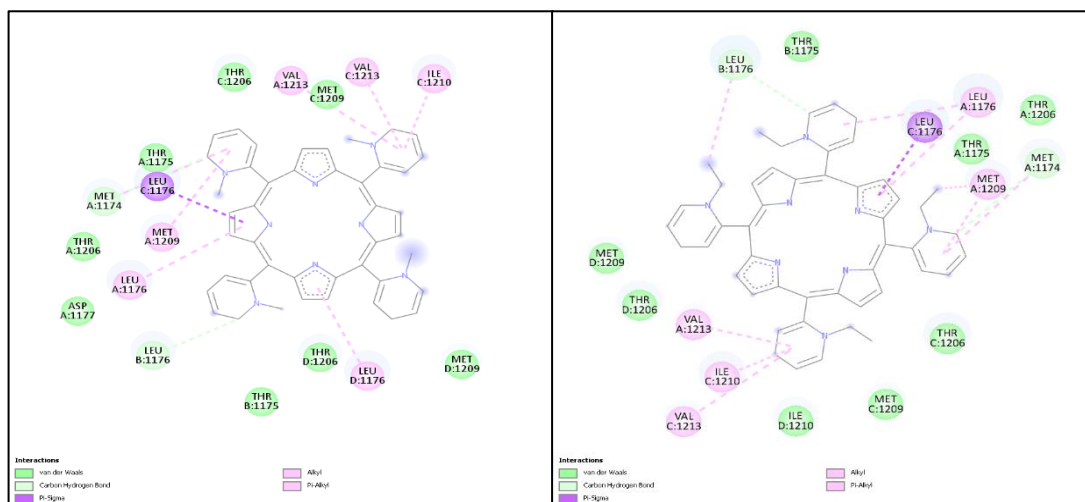
Com RMSD inferior a 2 Å, foi utilizado o mesmo GRID para executar o *docking* de H₂TM-2-PYP4⁺ e H₂TE-2-PYP4⁺, onde foi possível observar uma afinidade de -11.5 kcal/mol com *exhaustiveness* em 8 e 32 para H₂TM-2-PYP4⁺ e -11.8 kcal/mol para H₂TE-2-PYP4⁺. Observando as interações dos ligantes com os resíduos observou-se que H₂TM-2-PYP4⁺ se liga com 5 resíduos e H₂TE-2-PYP4⁺ com 4 dos 14 que fazem parte do processo de interação entre o BR-Verapamil e CaVAb (Apêndices E e F) destacando que Tang *et al* (2016) relata que tirosina 1206 (TYR 1206), metionina 1209 (MET 1208), tirosina 1175 (TYR 1175), metionina 1174 (MET1174) e leucina 1176 (LEU 1176) compõe as principais interações dessa PAA (FIG 23 e 24) (Tabela 5).

Figura 23: CaVAb (PDB ID: 5KMH) + Br-Verapamil + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (Sítio PAAs)



Fonte: Autor

Figura 24: CaVAb (PDB ID:5KMH) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8 e 32 interações (2D) (Sítio PAAs)



Fonte: Autor

Tabela 5: Valores de afinidade obtidos no *redocking* de BR-Verapamil em CaVAb (PDB ID:5KMH) e *docking* + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (sítio PAAs)

CaVAb (PDB ID:5KMH) + H ₂ TM-2-PyP ⁴ E H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ (Sítio PAAs)		
<i>Exhaustiveness</i> 8 e 32		
NOME DO COMPOSTO	AFINIDADE (KCAL/MOL)	AFINIDADE (KCAL/MOL)
BR-VERAPAMIL (Redocked)	-7.5	-7.5
H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺	-11.5	-11.5
H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺	-11.8	-11.8

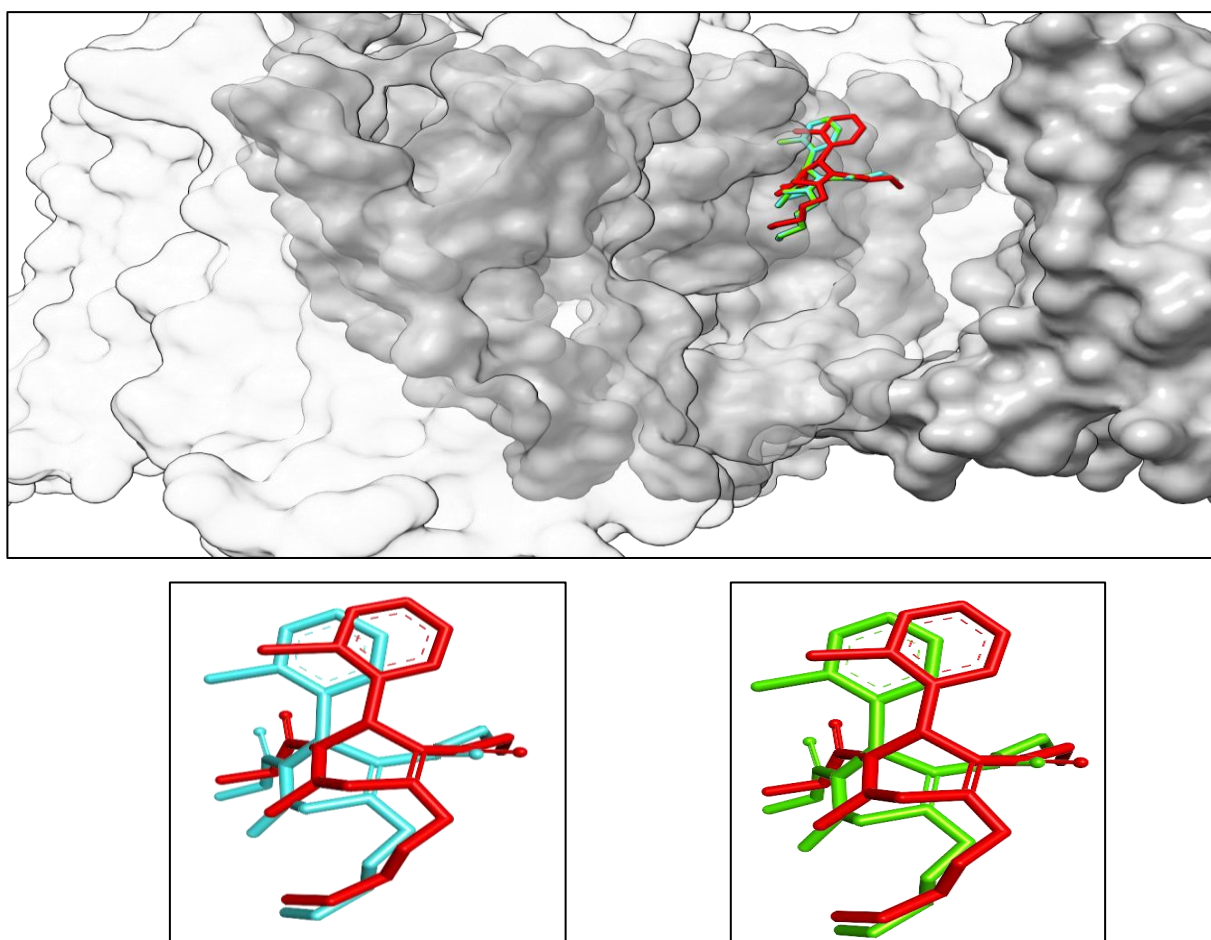
Fonte: Autor

Como sugerido por Hondegheem e Katzung (1984) verapamil bloqueia canal de cálcio após atravessar a membrana, impedindo a passagem de Ca²⁺ pelo lado de dentro do poro e nos resultados de SPASOJEVIĆ *et al.*, (2008) é relatada que MnTE-2-PyP⁵⁺, um composto similar a H₂TE-2-PyP⁴⁺, é capaz de se internalizar e se acumular no citosol, como também migrar para outros compartimentos celulares como núcleo e mitocôndria. Esses fatores podem sugerir a possibilidade de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ atravessarem a membrana e se ligar de forma similar ao Br-Verapamil em CaVAb.

5.4 REDOCKING E DOCKING H₂TM-2-PyP⁴⁺ E H₂TE-2-PyP⁴⁺ NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE DHPs

Por ter se destacado no protocolo de *Blind Docking*, o sítio de ligação para DHPs também foi utilizado para o *docking* de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ com a finalidade de observar as possíveis mudanças nas interações quando comparadas com os resultados obtidos em BD. O *redocking* foi executado utilizando o amlodipino em sua conformação nativa em CaVAb (PDB ID: 5KMD) juntamente com as informações dos resíduos de interação para geração de um GRID específico para o sítio. O *redocking* foi feito ainda utilizando os parâmetros de *exhaustiveness* em 8 e 32, gerando assim duas conformações que foram comparadas a estrutura original presente em 5KMD com base no seu RMSD. No primeiro *redocking* foi obtida uma conformação com RMSD de 1.3947Å e no segundo 1.3566 Å (FIG 25)

Figura 25: CaVAb (PDB ID:5KMD) – Amloddipino + *redockings* (*exhaustiveness* 8 e 32)



Fonte: Autor

O mesmo GRID foi utilizado para “dockar” H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺, onde foram obtidos os valores de afinidade expostos e tabela 6.

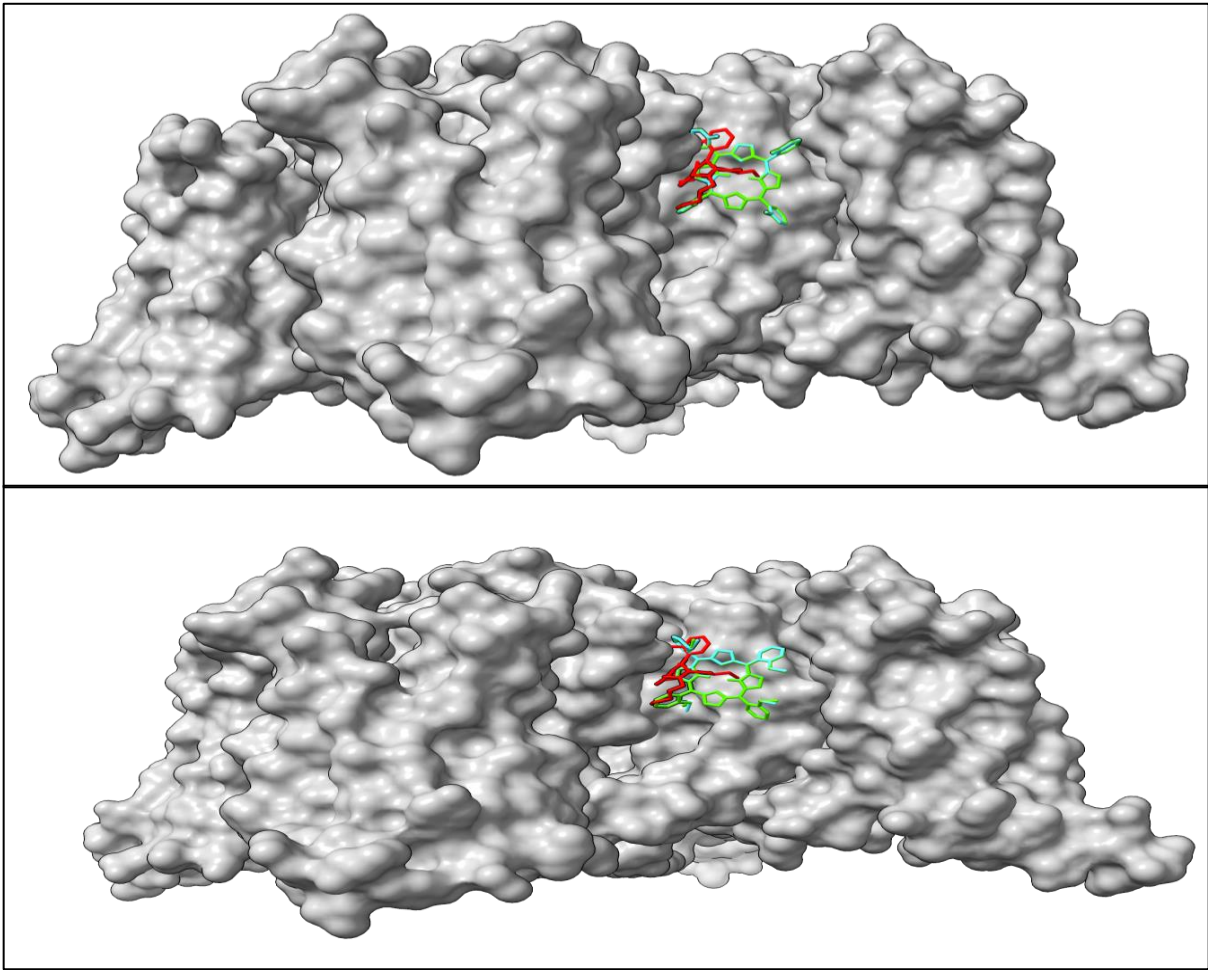
Tabela 6:Valores de afinidade obtidos no *redocking* de CaVAb (PDB ID:5KMD) e *docking* + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (sítio DHPs)

CaVAb (PDB ID:5KMH) + H ₂ TM-2-PyP ⁴ E H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ (Sítio DHPs)		
Exhaustiveness 8 e 32		
NOME DO COMPOSTO	AFINIDADE (KCAL/MOL)	AFINIDADE (KCAL/MOL)
AMLODIPINE (REDOCKED)	-8.3	-8.0
H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺	-8.4	-8.3
H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺	-8.4	-8.6

Fonte: Autor

Foi possível observar que H₂TM-2-PyP⁴⁺ interagiu com resíduos que compõe a interação de amlodipino com CavAb (apêndices G e H), o mesmo comportamento pôde ser observado em H₂TE-2-PyP⁴⁺ (FIG 26 e 27)

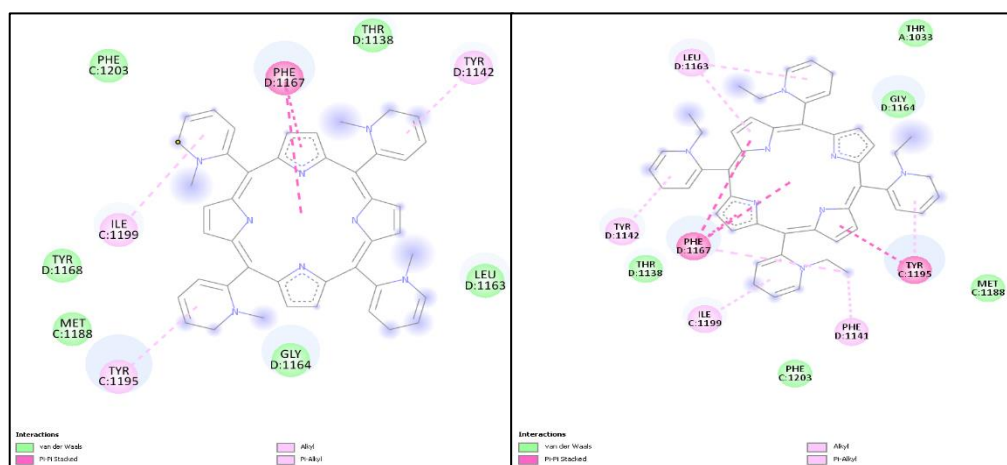
Figura 26: CaVAb (PDB ID:5KMD) – Amlodipino + H₂TM-2-PyP⁴⁺ + H₂TE-2-PYP⁴⁺ (Sítio DHPs)



Fonte: Autor

Tendo em mente que o acúmulo de porfirinas ou metaloporfirinas em regiões como citosol ou mitocôndria está diretamente relacionado ao tamanho dos grupos substituintes alquil juntamente ao fato de que fármacos da classe das dihidropiridinas se ligam pelo lado interno da membrana enquanto o canal está aberto ou inativo, H₂TE-2-PyP⁴⁺ teria mais condições de se ligar em uma estrutura proteica de CaVAb, uma vez que apresentou uma afinidade um pouco maior com os resíduos do sítio para DHPs (FIG)(SPASOJEVIĆ *et al.*, 2011; GOODMAN, 2012; TANG *et al.*, 2016; KATZUNG *et al.*, 2017)

Figura 27: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8 e 32 interações (2D) (Sítio DHPs)

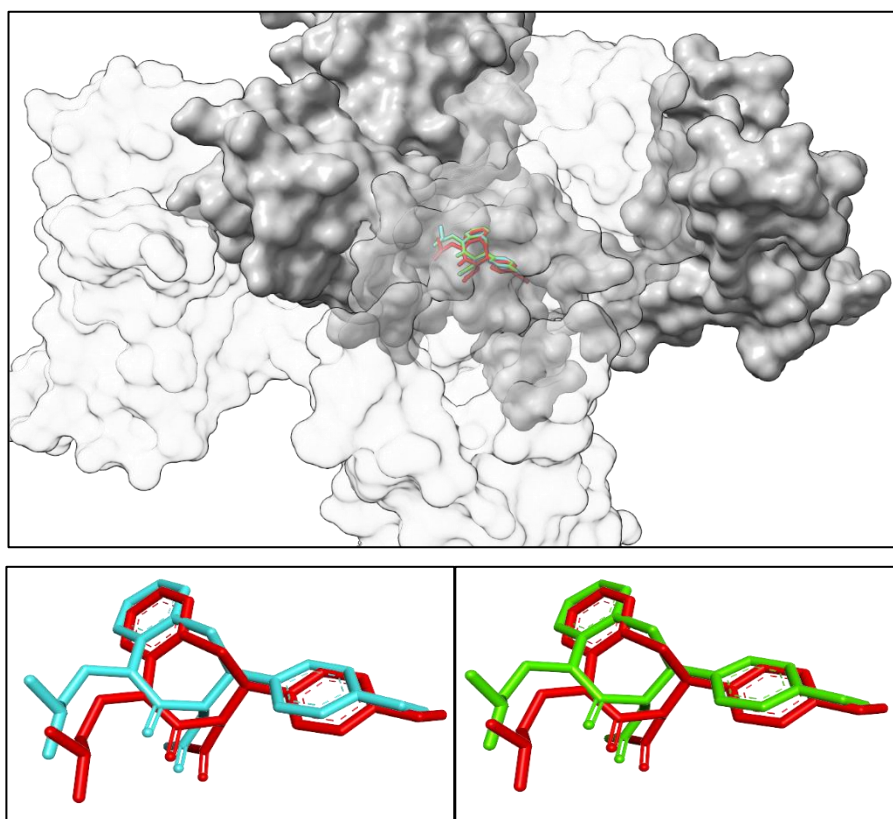


Fonte: Autor

5.5 REDOCKING E DOCKING H₂TM-2-PyP⁴⁺ E H₂TE-2-PyP⁴⁺ NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE BZTs

Em CavAb o sítio de ligação para compostos da classe benzodiazepínicos encontra-se próximo ao sítio de ligação para as fenilaquilaminas. Visando maximizar as informações a respeito de como H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ interagem com com CaVAb foi feito o *docking* destes ligantes com base na resíduos de interação que compõe o sítio de ligação para BZTs. O diltiazem, presente nativamente na estrutura cristalográfica utilizada (PDB ID: 6KE5), que havia sido previamente removido na preparação do protocolo de BD, foi “redockado” duas vezes (*exhaustiveness* 8 e 32) com um GRID criado a partir das informações do seu sítio de ligação (TANG *et al.*, 2019). As conformações obtidas do *redocking* foram comparadas com o diltiazem presente em 6KE5 através do seu RMSD e foram observados os valores de RMSD de 0.9750 Å e 0.9793 Å (*exhasutiveness* 8 e 32 respectivamente) (FIG 28)

Figura 28: CaVAb (PDB ID:6KE5) – Diltiazem + *redockings* (*exhaustiveness* 8 e 32)



Fonte: Autor

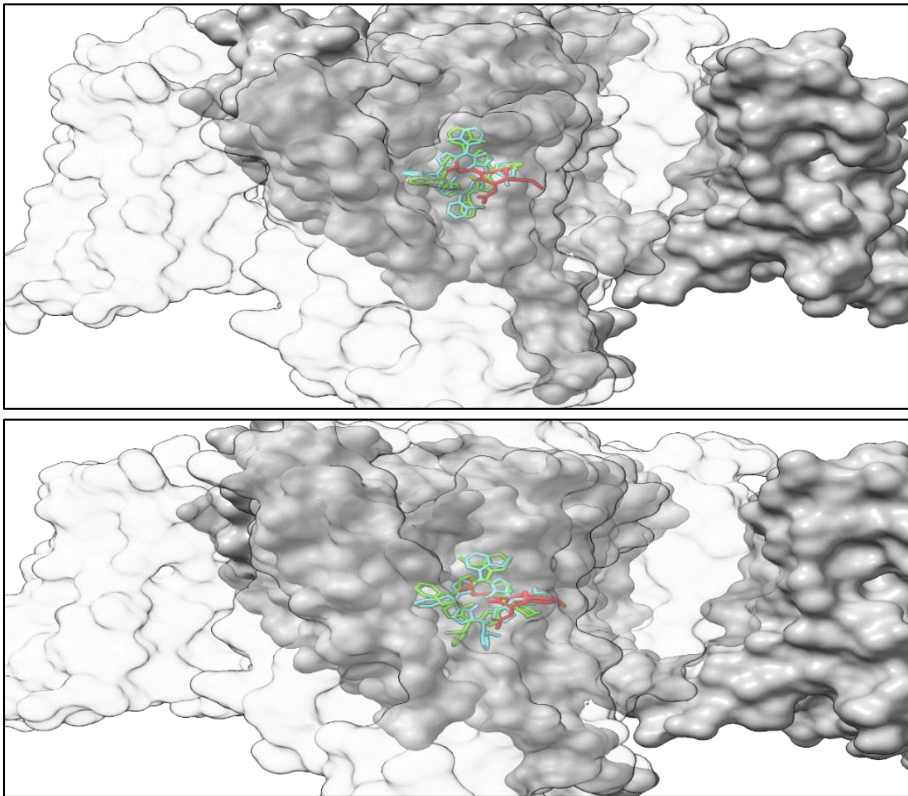
Após o *redocking* o mesmo GRID foi utilizado para o *docking* de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (FIG 29), com *exhaustiveness* 8 e 32, porém dos resíduos que fazem parte da interação com o diltiazem, apenas LEU 1176 se mostrou presente na interação com H₂TM-2-PyP⁴⁺ (apêndice I). Já H₂TE-2-PyP⁴⁺ apresentou uma baixa afinidade com CaVAb, nos valores de -2.5 kcal/mol e -2.7 kcal/mol e apenas um resíduo em comum com interação entre Diltiazem e CavAb (apêndice J)(Tabela 7).

Tabela 7:Valores de afinidade obtidos no *redocking* de CaVAb (PDB ID:6KE5) e *docking* + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (sítio BZTs)

CaVAb (PDB ID:6KE5) + H ₂ TM-2-PyP ⁴ E H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ (Sítio BZTs)		
Exhaustiveness 8 e 32		
NOME DO COMPOSTO	AFINIDADE (KCAL/MOL)	AFINIDADE (KCAL/MOL)
DILTIAZEM (REDOCKED)	-6.9	-6.9
H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺	-4.9	-6.4
H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺	-2.5	-2.7

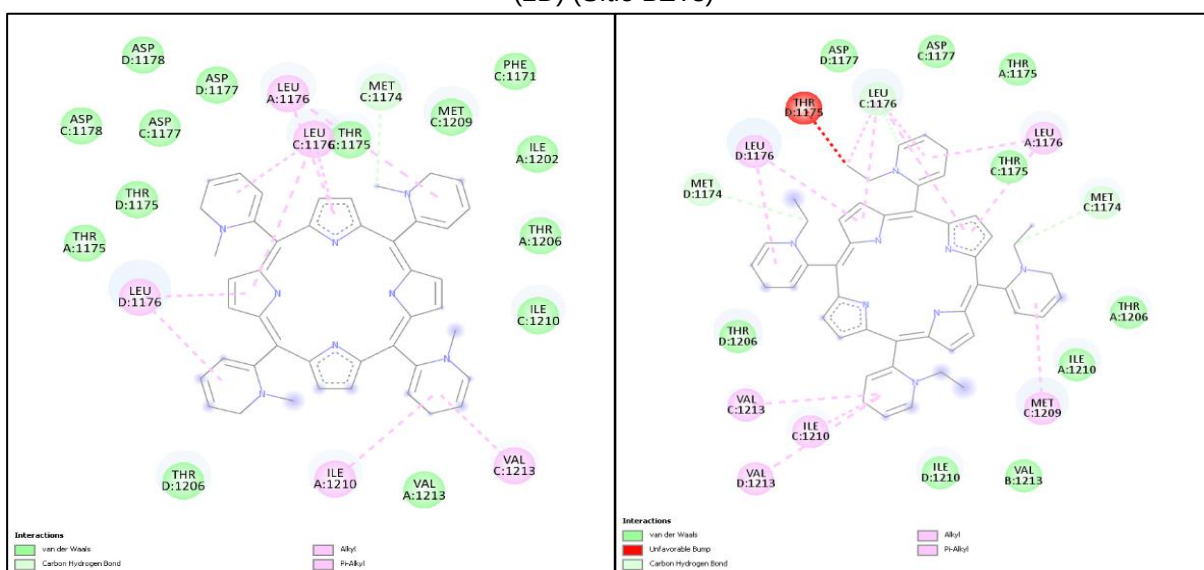
Fonte: Autor

Figura 29: CaVAb (PDB ID:5KMD) – Diltiazem + H₂TM-2-PyP⁴⁺ + H₂TE-2-PYP⁴⁺ (Sítio BZTs)



Por sobrepor parcialmente o sítio para PAAs, o resíduo treonina 1206 (THR 1206 OU T206) ganha alta relevância uma vez que é um resíduo chave para inativação do canal (GAMAL EL-DIN *et al.*, 2019). Logo, a interação com esse resíduo é esperada durante a utilização desse sítio de ligação, entretanto tanto H₂TM-2-PyP⁴⁺ quanto H₂TE-2-PyP⁴⁺ (FIG 30) tiveram apenas interações fracas do tipo van der Waals com esses resíduos, o que sugere pouca capacidade de modulação por H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ nesse sítio (Tang *et al.*, 2019)

Figura 30: CaVAb (PDB ID:5KMD) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8 e 32 interações (2D) (Sítio BZTs)



Fonte: Autor

5.6 BLIND DOCKING H₂TM-2-PyP⁴⁺ COM cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃

Os valores de afinidade *BD* (n=5) com o parâmetro *exhaustiveness* com valor 8 e 32 são representadas na tabela 8.

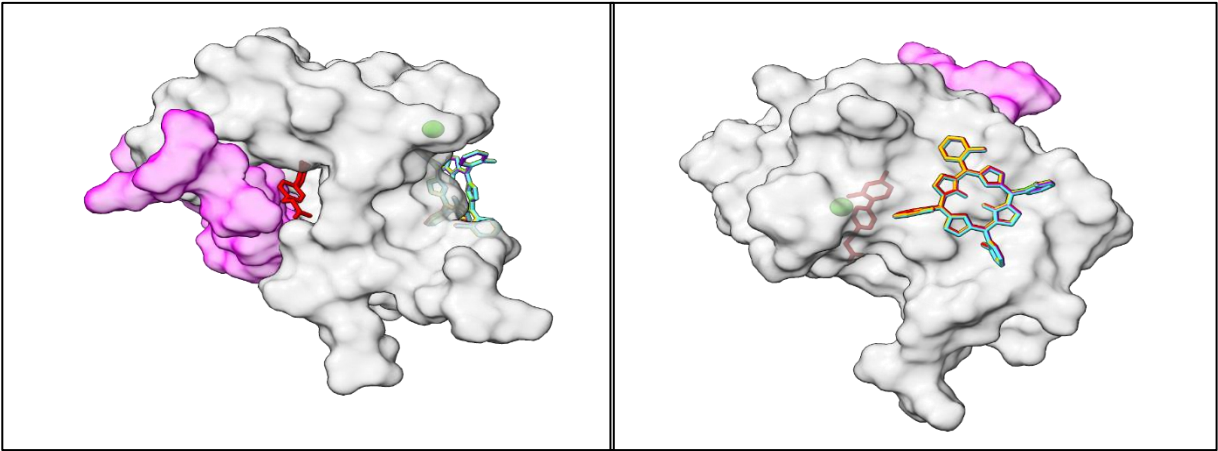
Tabela 8:Valores de afinidade obtidos no BD de cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TM-2-PyP⁴⁺

cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺ (BD)			
Exhaustiveness 8 e 32			
NOME DO COMPOSTO	TENTATIVA	AFINIDADE (8) (KCAL/MOL)	AFINIDADE (32) (KCAL/MOL)
MESO-TETRAQUIS(N-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	1	-9.1	-9.1
	2	-9.1	-9.1
	3	-9.1	-9.1
	4	-9.1	-9.1
	5	-9.1	-9.1

Fonte: Autor

Como pode ser observado na tabela, em ambas situações com o parâmetro *exhaustiveness* em 8 e 32, foi observada obtenção do valor de afinidade de -9.1 kcal/mol. Entretanto, nas tentativas 2 e 5 (*exhaustiveness* 8) há a presença de interações não presentes (apêndice K) nas conformações das tentativas de número 1, 3 e 4 (Estruturas levemente fora de sobreposição) (FIG 31).

Figura 31: cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8

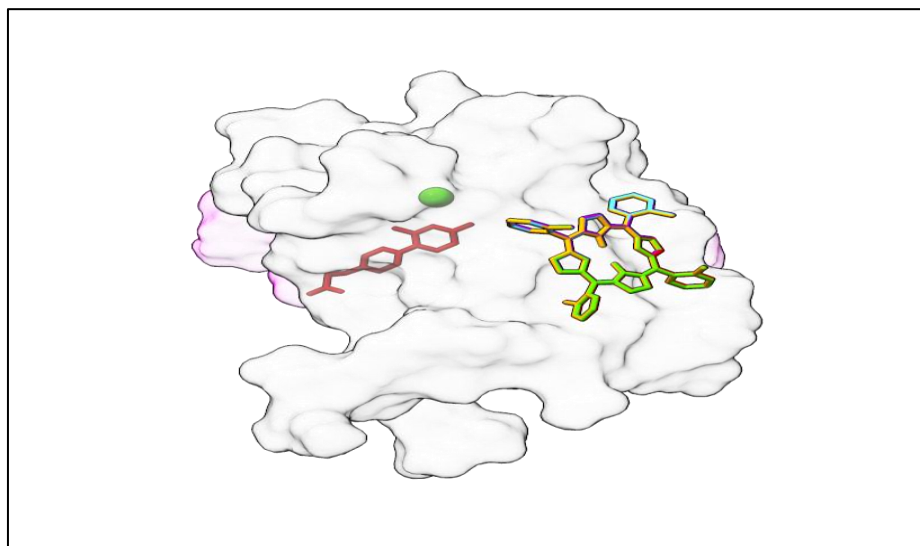


Fonte: Autor

Nas tentativas 1, 3 e 4 (*exhaustiveness* 8) foram observadas interações com os resíduos VAL 9, LYS 21, PHE 24, PHE 74 e ASP 75 enquanto a tentativa de número 2 teve duas interações a mais com os resíduos GLU 10 e LYS 17 e não interagiu com ASP 75 com um RMSD de 0,1525 Å em relação a tentativa 1 e a tentativa de número 5 não apresentou interações com LYS 17 e ASP 75 com um RMSD 0,1298 Å em relação a tentativa número 1.

Com o parâmetro *exhaustiveness* de valor 32, apenas a conformação de número 3 (Estrutura verde levemente fora de sobreposição) (FIG 32) apresentou divergência nas interações (apêndice L). Mesmo com uma conformação diferente, os valores de afinidade obtidos também foram de – 9.1 kcal/mol.

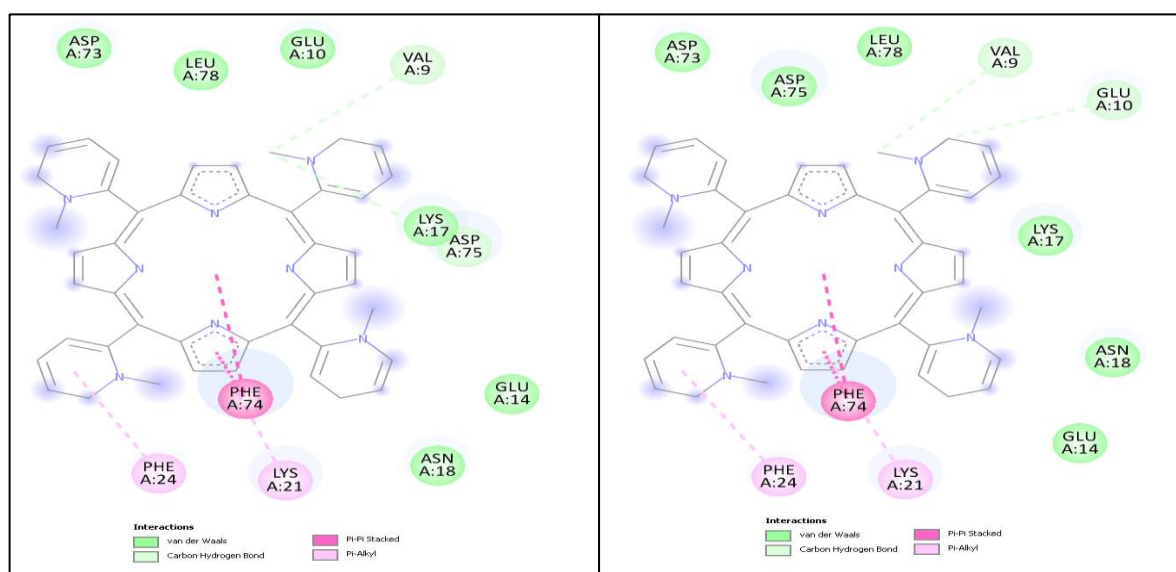
Figura 32: cNTnC-cTnl₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 32



Fonte: Autor

Nas execuções onde o valor de *exhaustiveness* foi 32, pode-se observar uma maior constância quanto as interações com os resíduos de proteína, onde quatro das cinco tentativas, demonstraram a mesma sequência de interações com somente a tentativa de número 4 apresentando uma interação a mais com LYS 17 e um RMSD de 0,0399 Å quando comparada a tentativa de número 1. Esses dados sugerem que VAL 9, GLU 10, LYS 21, PHE 24 e PHE 74 (FIG 33) são os maiores responsáveis pela entre H₂TM-2-PyP⁴⁺ e cNTnC.

Figura 33: cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8 e 32 interações (2D)



Fonte: Autor

Baseando-se nas informações obtidas foi possível observar que a interação de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e cNTnC ocorre de uma maneira não similar às moléculas da classe dos sensibilizadores do Ca²⁺. De acordo com Pollesello *et al* (1994), o levosimendan, um sensibilizador de Ca²⁺, tem seu sítio de ligação presente em cNTnC e esse seria formado pelos resíduos MET 81, MET 85 e PHE 77. Levijoki *et al* (2000) relatou em seus resultados, que mutações em resíduos próximos ao sítio de ligação, levariam a diminuição da interação do levosimendan e análogos com cNTnC. Já Robertson *et al* (2010) demonstraram que o análogo do levosimendan, dfpb-o, interage no mesmo sítio de ligação do sensibilizador do Ca²⁺, mas além das interações com cNTnC, foram observadas interações com a região *switch* da cTnI₁₄₄₋₁₆₃. Essa interação ressaltada se dá através do resíduo de arginina (ARG) 147 e seria uma das interações chave para o processo de sensibilização ao Ca²⁺ desencadeado por moléculas que interagem nesse sítio de ação. Apesar da sua alta hidrofiliicidade, H₂TM-2-PyP⁴⁺ possivelmente não apresentaria capacidade sensibilizadora ao Ca²⁺ por meio desse conhecido mecanismo uma vez que de acordo com Coldrean *et al* (2020) alta lipofiliicidade é um fator que facilita a interação de moléculas com sítio para sensibilização.

5.7 BLIND DOCKING H₂TE-2-PyP⁴⁺ COM cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃

Na execução do protocolo de BD com H₂TE-2-PyP⁴⁺ e cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ foi possível observar um comportamento semelhante ao encontrado no processo feito com H₂TM-2-PyP⁴⁺. Em ambas as execuções com os distintos valores de *exhaustiveness* foi possível observar uma constância na afinidade, sendo o valor encontrado em todas as tentativas de -8.8 kcal/mol (Tabela 9).

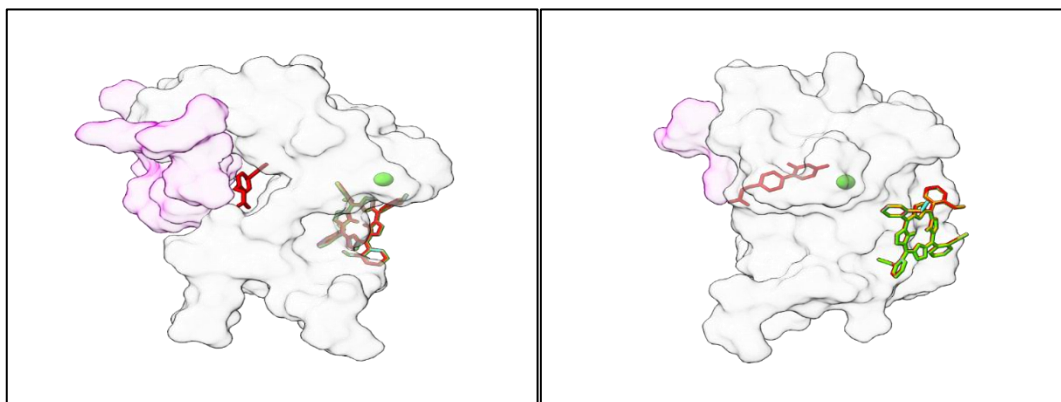
Tabela 9: Valores de afinidade obtidos no BD de cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TE-2-PyP⁴⁺

cNTnC-cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TE-2-PyP ⁴ (BD)			
<i>Exhaustiveness</i> 8 e 32			
NOME DO COMPOSTO	TENTATIVA	AFINIDADE (8) (KCAL/MOL)	AFINIDADE (32) (KCAL/MOL)
MESO-TETRAQUIS(N-ETILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	1	-8.8	-8.8
	2	-8.8	-8.8
	3	-8.8	-8.8
	4	-8.8	-8.8
	5	-8.8	-8.8

Fonte: Autor

Com *exhaustiveness* no valor 8, apenas a conformação da tentativa de número 4 apresentou uma certa distinção por ter algumas interações diferentes (apêndice M), no entanto levando em conta o RMSD desta quando comparado as outras conformações obtidas nas tentativas de número 1, 2, 4 e 5 (RMSD = 0.0693 Å, 0.0690 Å, 0.0684 Å e 0.0688 Å respectivamente) (FIG 34) demonstra que ela ainda ocupa um local similar na estrutura proteica.

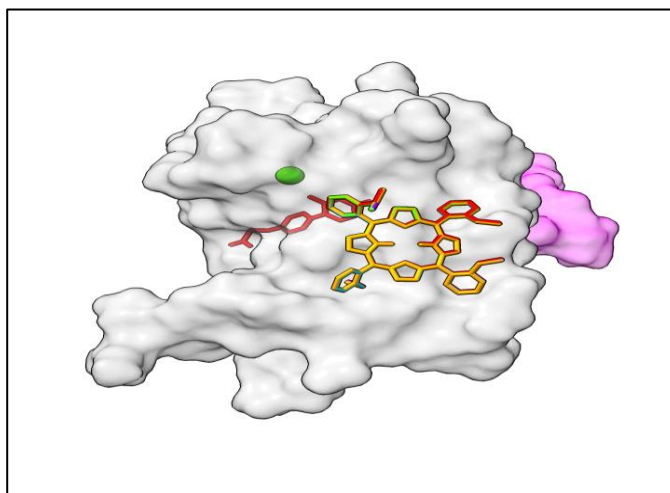
Figura 34: cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8



Fonte: Autor

Também é possível notar que PHE 74, VAL 9, LYS 17, LYS 21 e LEU 78 compõe os principais responsáveis pela interação de H₂TE-2-PyP⁴⁺ com cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (Tabela). Durante a análise dos resultados com *exhaustiveness* no valor 32 todas as 5 conformações se mostraram similares (FIG 35) até mesmo levando em conta suas interações (apêndice N), o que ressalta ainda mais a participação dos cinco resíduos de proteína citados anteriormente como os principais responsáveis pelo processo de interação do ligante com a região N-terminal da troponina C cardíaca.

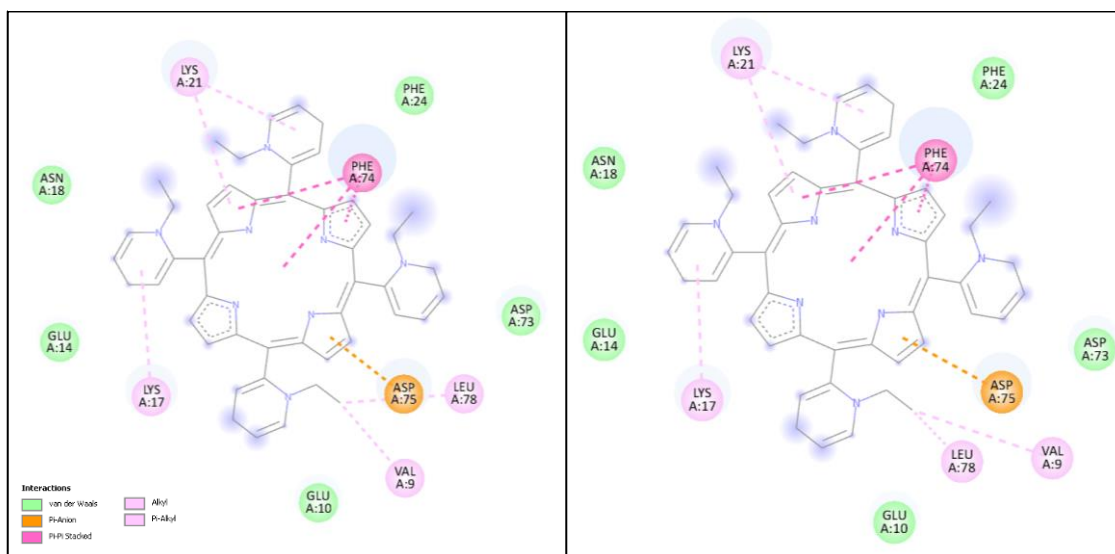
Figura 35: cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 32



Fonte: Autor

Como H₂TM-2-PyP⁴⁺, esse processo de interação entre H₂TE-2-PyP⁴⁺ e cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ se mostra não similar aos SCs no que diz respeito a interação com resíduos, o que pode resultar na não sensibilização do complexo ao íon Ca²⁺. Nos estudos de Wang *et al* (2002) o bepridil, uma das moléculas conhecidas por se ligar na região ou domínio N-terminal de TnC promovendo a dessensibilização de cTnI₁₄₇₋₁₆₃ tem sua ação através da interação com os resíduos ILE 36, LEU 41, VAL 44, MET 45, LEU 48, MET 60, ILE 61, VAL 64 e VAL 72, o que estabiliza a estrutura numa conformação que favorece a interação com o Ca²⁺, mas observando a o processo de interação visto no *blind docking* de H₂TE-2-PyP⁴⁺ não há nenhum resíduo de proteína em comum com a interação entre o bepridil e cNTnC (FIG 36). Descrito no trabalho de Varughese *et al* (2011) como um dos resíduos chave para o processo de ligação, o resíduo ILE 148 também está ausente do processo de interação de H₂TE-2-PyP⁴⁺ com cNTnC (Tabela).

Figura 36: cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8 e 32 interações (2D)

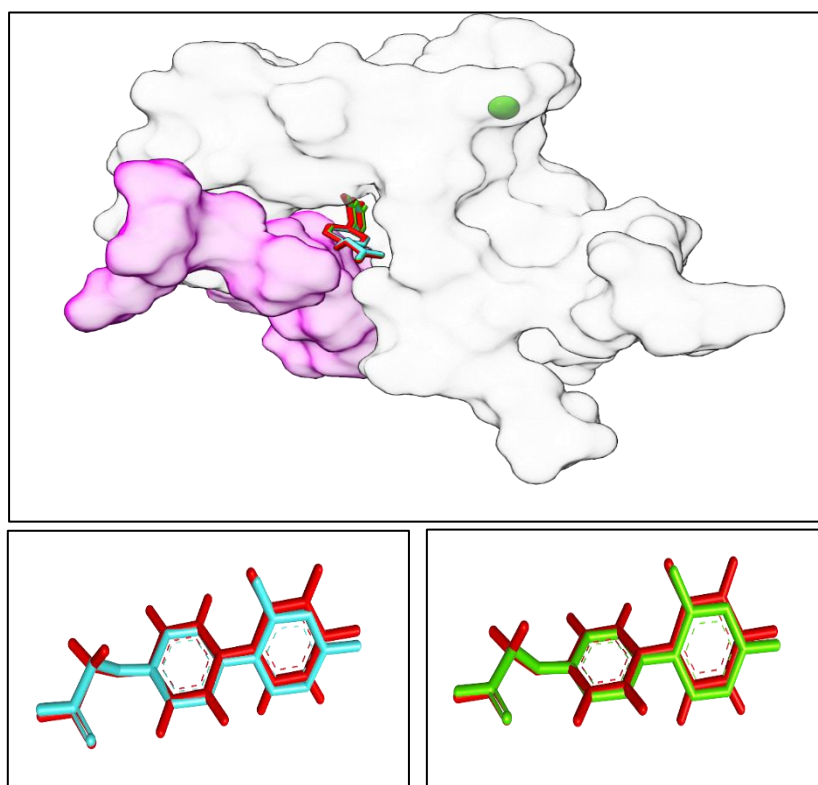


Fonte: Autor

5.8 REDOCKING E DOCKING H₂TM-2-PyP⁴⁺ E H₂TE-2-PyP⁴⁺ NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE SCs

Apesar do protocolo de BD não ter gerado conformações próximas ao sítio de ligação para sensibilizadores do Ca²⁺ em cNTnC, esse sítio foi utilizado como referência para tentativa de *docking* de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺. Para isso foi feito o *redocking* do DFPB-O, um análogo do levosimendami, presente na estrutura original utilizada (PDB ID: 2L1R) ainda levando em conta o parâmetro *exhaustiveness*. Com as estruturas obtidas foi feita a comparação dos resultados com a estrutura original e foi observado um RMSD de 0.2646 Å (*exhaustiveness* 8) e 0.2286 Å (*exhaustiveness* 32) (FIG 37)

Figura 37: cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) – DFPB-O + *redockings* (*exhaustiveness* 8 e 32)



Fonte: Autor

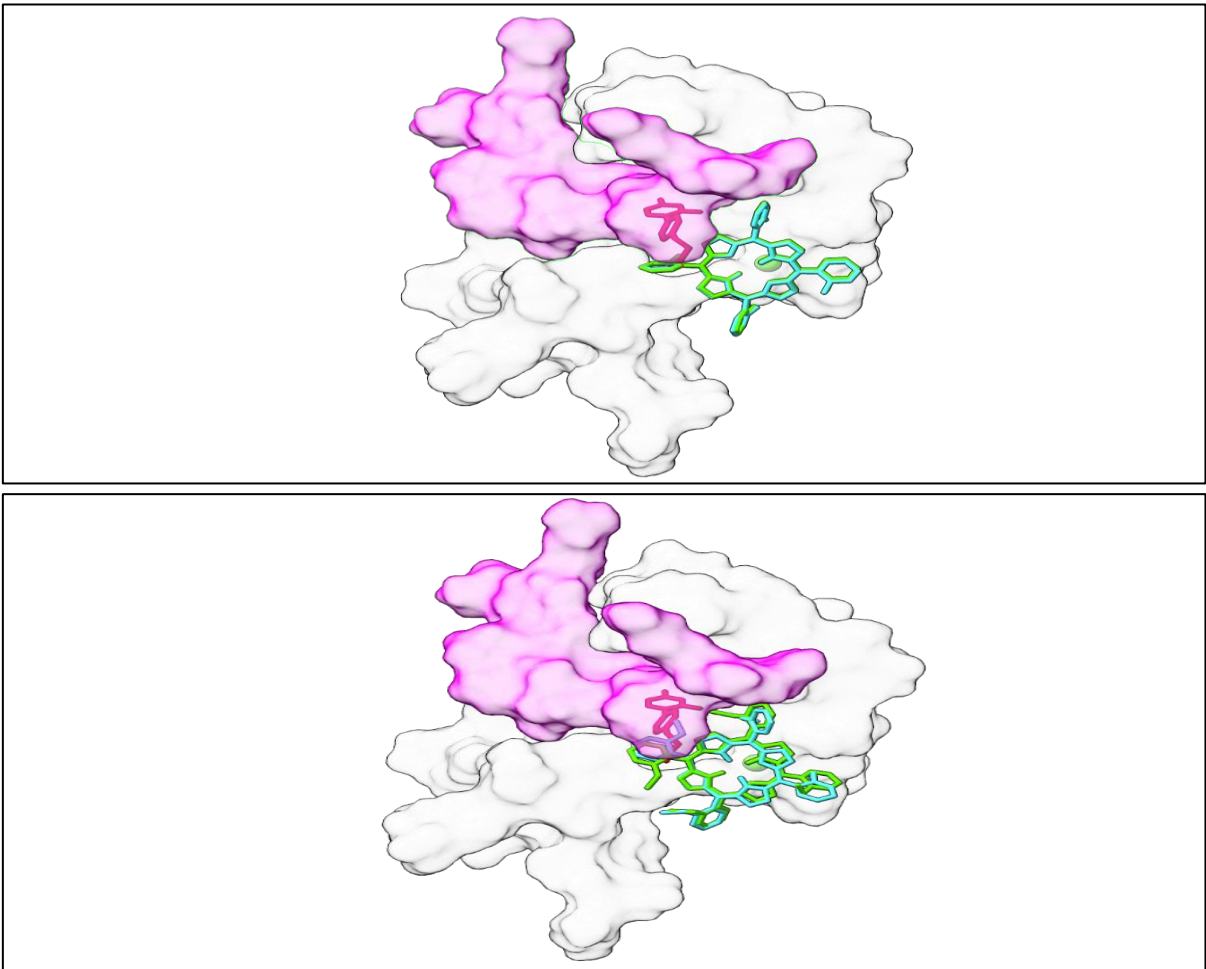
O grid utilizado para o *redocking* foi então selecionado para o *docking* de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (FIG 38) no sítio, uma vez que o RMSD foi inferior a 2 Å e os valores de afinidade apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Valores de afinidade obtidos no *redocking* de cNTnC-cTnl₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) e *docking* + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (sítio SCs)

cNTnC-cTnl ₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H ₂ TM-2-PyP ⁴ E H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺ (Sítio SCs)		
Exhaustiveness 8 e 32		
NOME DO COMPOSTO	AFINIDADE (KCAL/MOL)	AFINIDADE (KCAL/MOL)
DFPB-O (REDOCKED)	-8.5	-8.6
H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺	1.5	0.9
H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺	5.9	9.8

Fonte: Autor

Figura 38: cNTnC-cTnl₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) – DFPB-O + H₂TM-2-PyP⁴⁺ + H₂TE-2-PYP⁴⁺ (Sítio SCs)



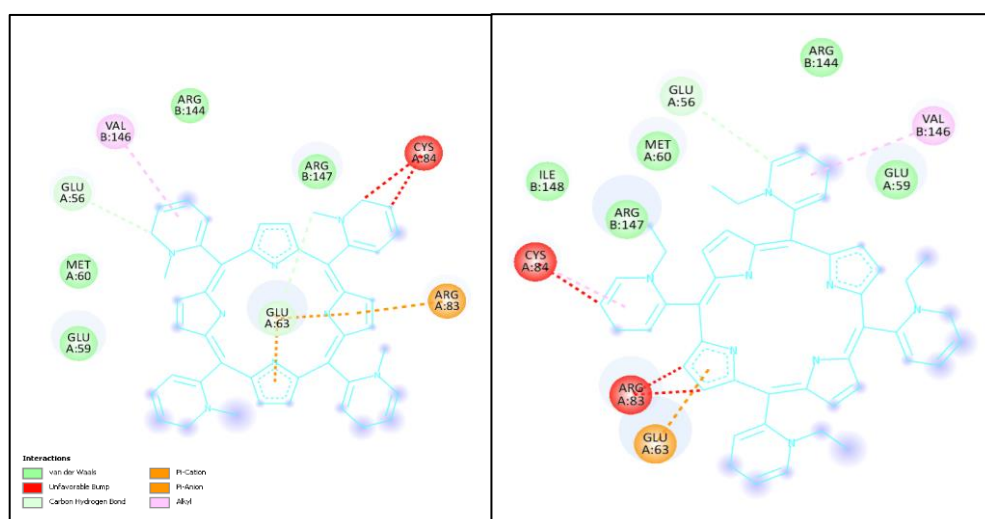
Fonte: Autor

Mesmo utilizando o GRID do *redocking* as interações feitas por H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ são bem distintas das que ocorrem entre cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ e DFPB-O e além disso, as tentativas apresentaram um valor de afinidade positivo, o que sugere que essas moléculas seriam incapazes de interagir nesse sítio de ligação baseado no alto valor encontrado (BRONOWSKA, 2011).

Alguns fatores devem ser levados em consideração ao observar os *dockings* executados. Apesar do GRID ter sido adequado para o protocolo de *redocking*, foi notável a disparidade nos tamanhos das moléculas, uma vez que o DFPB-O é uma molécula pequena quando comparada com H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (FIG 38) o que dificulta o contato da estrutura principal da porfirina como também dos grupamentos alquil que poderiam ser responsáveis por uma possível interação (STOJANOVIC *et al.*, 2009).

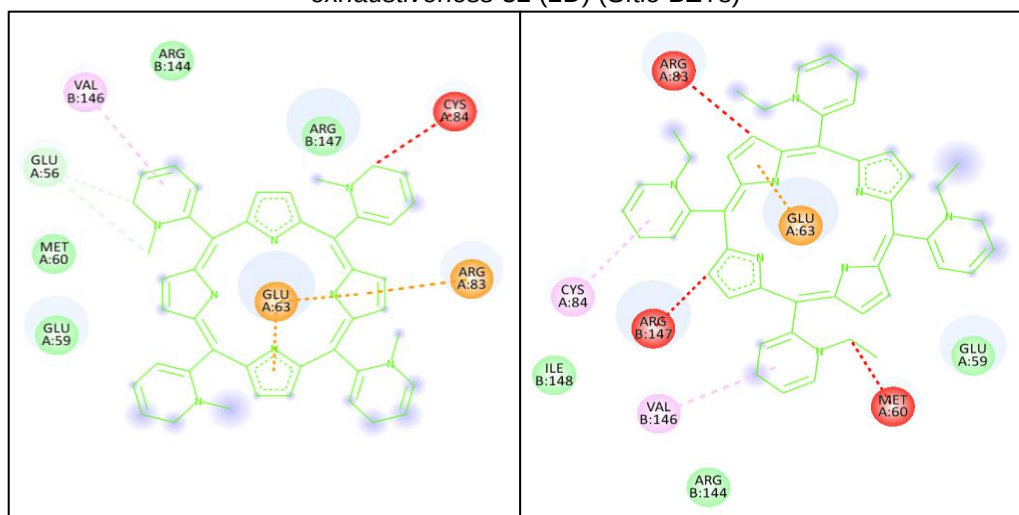
É necessário destacar as presenças de *bumps* (FIG 39 e 40) ou colisões presentes nos atracamentos de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ entrando em choque com os resíduos MET 60, CYS 84, ARG 83 e ARG 147 do sítio de ligação e essas colisões, como descrito por Ramachandran *et al* (2011) ocorrem quando há a sobreposição de átomos que não interagem com a estrutura proteica. A presença de *bumps* associada ao valor de afinidade positivo e levando em consideração as conformações obtidas nas tentativas do protocolo de *blind docking* sugerem que H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ (apêndices O e P) não possuem uma boa interação com cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ e possivelmente não seria capaz de agir como SCs.

Figura 39: cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺ *exhaustiveness* 8 (2D) (Sítio BZTs)



Fonte: Autor

Figura 40: cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ (PDB ID:2L1R) + H₂TM-2-PyP⁴⁺ e H₂TE-2-PyP⁴⁺
exhaustiveness 32 (2D) (Sítio BZTs)



Fonte: Autor

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho, foi possível observar que tanto *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirina ($H_2TM-2-PyP^{4+}$) quanto *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfirina ($H_2TE-2-PyP^{4+}$) apresentam potencial de interação com componentes proteicos do tecido cardíaco. CaVAb se mostrou como um alvo mais favorável para interação, como resultados de boa afinidade tanto nos sítios para moléculas das classes das fenilaquilaminas (PAAs) quanto para diidropiridinas (DHPs). Já o sítio para BZTs não se mostrou tão propício para interações uma vez que há sobreposição com o sítio para PAAs assim como também uma menor afinidade em relação as outras duas classes.

Foi viável também observar que $H_2TM-2-PYP^{4+}$ e $H_2TE-2-PYP^{4+}$ interagem majoritariamente com resíduos da região N-terminal da troponina cardíaca C, entretanto quando analisada para a possível interação com o sítio de ligação responsável por promover a sensibilização ao Ca^{2+} no complexo cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃ não foram observadas interações com os resíduos responsáveis por esta capacidade, como também foi possível constatar que $H_2TM-2-PYP^{4+}$ e $H_2TE-2-PYP^{4+}$ colidem com resíduos importantes próximos ou localizadas no sítio de ligação. Essas informações associadas ao valor de afinidade positivo encontrado no *docking* favorecem a ideia de que $H_2TM-2-PYP^{4+}$ e $H_2TE-2-PYP^{4+}$ não possuem capacidade de interação ideal com cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃.

Apesar dos resultados encontrados, é de suma importância destacar que mesmo com os avanços tecnológicos obtidos na data atual, ainda há a necessidade verificação por meio de experimentação *in vitro/in vivo*, uma vez que existem múltiplos fatores, como a flexibilidade das proteínas e ligantes, moléculas de água e presença de solvente que podem modificar significativamente os resultados encontrados *in silico*.

6.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Algumas perspectivas do que pode ser executado a partir dos resultados obtidos no trabalho:

- I) Execução da dinâmica molecular (MD) com os resultados obtidos para cNTnC-cTnI₁₄₄₋₁₆₃. Essa possibilidade se mostra mais interessante que a utilização dos resultados de CaVAb pelo fato de que o complexo troponina não está atrelado a membranas o que diminui significativamente o custo computacional do processo.
- II) Execução de testes *in vitro* e *in vivo* para melhor avaliação dos resultados no que diz respeito a modulação do Ca²⁺. Tang *et al* (2019) apresentaram resultados onde o diltiazem e o amlodipino interagem juntos em CaVAb, o que abre a possibilidade para testes utilizando porfirinas ou metaloporfirinas juntamente a um desses moduladores.
- III) Utilizar dos resultados como base de partida para *docking* de MnTE-2-PyP⁵⁺, que foi a molécula original do ponto de partida para este trabalho. Uma vez que o entendimento de como pode ser feito a execução do *docking* com as porfirinas foi obtido, entender como o íon manganês pode mudar o processo de interação com ambas as proteínas permitiria um melhor entendimento de como essas moléculas podem de fato levar a respostas farmacológicas com objetivos terapêuticos.

7 REFERENCIAS

- AHMED, Asmaa et al. Docking studies, antitumor and antioxidant evaluation of newly synthesized porphyrin and metalloporphyrin derivatives. **Dyes and Pigments**, v. 183, p. 108728, 2020.
- AITKEN, Jade B. et al. Intracellular targeting and pharmacological activity of the superoxide dismutase mimics MnTE-2-PyP5+ and MnTnHex-2-PyP5+ regulated by their porphyrin ring substituents. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 4121-4123, 2013.
- ARCHAMBEAU, John O. et al. Superoxide dismutase mimic, MnTE-2-PyP5+ ameliorates acute and chronic proctitis following focal proton irradiation of the rat rectum. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 599-607, 2013.
- ARRIGO, Mattia; MEBAZAA, Alexandre. Understanding the differences among inotropes. **Intensive care medicine**, v. 41, n. 5, p. 912-915, 2015.
- BAPTISTA-HON, Daniel T.; ELLIOTT, Austin C.; DIAZ, Mary E. Iron (II) Modulation of the Cardiac Ryanodine Receptor (RyR2). **Biophysical Journal**, v. 96, n. 3, p. 113a-114a, 2009.
- BARBOSA, Andrezza M. et al. Redox-Active Drug, MnTE-2-PyP5+, Prevents and Treats Cardiac Arrhythmias Preserving Heart Contractile Function. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- ILVA, Camila Tainah da; JASIULIONIS, Miriam Galvonas. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.
- BATINIĆ-HABERLE, INES; REBOUÇAS, JÚLIO S.; SPASOJEVIĆ, IVAN. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 6, p. 877-918, 2010.
- BERS, Donald M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002.
- BIOVIA, Dassault Systèmes, [Discovery Studio Visualizer] [20.1.0], San Diego: Dassault Systèmes, [2022]
- BIRD, S. D. et al. The human adult cardiomyocyte phenotype. **Cardiovascular research**, v. 58, n. 2, p. 423-434, 2003.

BRONOWSKA, Agnieszka K. Thermodynamics of ligand-protein interactions: implications for molecular design. In: **Thermodynamics-Interaction Studies-Solids, Liquids and Gases**. IntechOpen, 2011.

BRUNET, Sylvain; SCHEUER, Todd; CATTERALL, William A. Cooperative regulation of Cav1.2 channels by intracellular Mg²⁺, the proximal C-terminal EF-hand, and the distal C-terminal domain. **Journal of General Physiology**, v. 134, n. 2, p. 81-94, 2009.

BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012 CALVETE, MÁRIO JOSÉ F.; GOMES, ANA TERESA P.C; MOURA, NUNO M.M. Clorinas em Terapia Fotodinâmica–Síntese e aplicações. **Revista virtual de química**, v. 1, n. 2, p. 92-103, 2009

BRUNTON, Laurence L.; LAZO, John S.; PARKER, Keith L. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. In: **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 2006. p. 1819-1819.

CATTERALL, William A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 16, n. 1, p. 521-555, 2000.

CHI, Ximin et al. Molecular basis for allosteric regulation of the type 2 ryanodine receptor channel gating by key modulators. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 51, p. 25575-25582, 2019.

COLDREN, William H. et al. Discovery of novel small-molecule calcium sensitizers for cardiac troponin C: a combined virtual and experimental screening approach. **Journal of chemical information and modeling**, v. 60, n. 7, p. 3648-3661, 2020.

DAHLÖF, Björn. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. **The American journal of cardiology**, v. 105, n. 1, p. 3A-9A, 2010.

EISENBERG, Mark J.; BROX, Anya; BESTAWROS, Alain N. Calcium channel blockers: an update. **The American journal of medicine**, v. 116, n. 1, p. 35-43, 2004.

EISNER, David A. et al. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. **Circulation research**, v. 121, n. 2, p. 181-195, 2017.

ELLIOTT, William J.; RAM, C. Venkata S. Calcium channel blockers. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 13, n. 9, p. 687, 2011.

EVANS, Myron et al. Manganese porphyrins in combination with ascorbate act as pro-oxidants and mediate caspase-independent cancer cell death. 2013. **(G.A)**

FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, p. 1-7, 2019.

FARAH, Chuck S.; REINACH, Fernando C. The troponin complex and regulation of muscle contraction. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 9, p. 755-767, 1995.

FERREIRA, Leonardo G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

GAD, Shayne C. et al. A nonclinical safety assessment of MnTE-2-PyP, a manganese porphyrin. **International journal of toxicology**, v. 32, n. 4, p. 274-287, 2013.

GAMAL EL-DIN, Tamer M. et al. Molecular dissection of multiphase inactivation of the bacterial sodium channel NaVAb. **Journal of General Physiology**, v. 151, n. 2, p. 174-185, 2019.

GAO, Shuai; YAN, Nieng. Structural Basis of the Modulation of the Voltage-Gated Calcium Ion Channel Cav1. 1 by Dihydropyridine Compounds. **Angewandte Chemie**, v. 133, n. 6, p. 3168-3174, 2021.

GODDARD, Thomas D. et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 14-25, 2018.

GODFRAIND, Theophile. Calcium channel blockers in cardiovascular pharmacotherapy. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 19, n. 6, p. 501-515, 2014.

GOMES, Aldrin V. et al. Cardiac troponin T isoforms affect the Ca²⁺ sensitivity and inhibition of force development: insights into the role of troponin T isoforms in the heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35341-35349, 2002.

GONG, Deshun et al. Modulation of cardiac ryanodine receptor 2 by calmodulin. **Nature**, v. 572, n. 7769, p. 347-351, 2019.

GONZALEZ-MARTINEZ, David et al. Structural and functional impact of troponin C-mediated Ca²⁺ sensitization on myofilament lattice spacing and cross-bridge mechanics in mouse cardiac muscle. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 123, p. 26-37, 2018.

HARVEY, Robert D.; HELL, Johannes W. CaV1. 2 signaling complexes in the heart. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 58, p. 143-152, 2013.

HONDEGHEM, L. M.; KATZUNG, B. G. Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 24, n. 1, p. 387-423, 1984.

HU, Zhenyu; LIANG, Mui Cheng; SOONG, Tuck Wah. Alternative splicing of L-type CaV1. 2 calcium channels: implications in cardiovascular diseases. **Genes**, v. 8, n. 12, p. 344, 2017.

IBRAHIM, Michael et al. The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1719, p. 2714-2723, 2011.

KATRUKHA, I. A. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 13, p. 1447-1465, 2013.

KATZ, Arnold M. **Physiology of the Heart**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. **Farmacologia Básica e Clínica-13**. McGraw Hill Brasil, 2017.

KIM, Sunghwan et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. D1388-D1395, 2021.

KONG, Huihui et al. Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. **Biochemical Journal**, v. 414, n. 3, p. 441-452, 2008.

LAMB, Graham Douglas. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 27, n. 3, p. 216-224, 2000.

LANDSTROM, Andrew P.; DOBREV, Dobromir; WEHRENS, Xander HT. Calcium signaling and cardiac arrhythmias. **Circulation research**, v. 120, n. 12, p. 1969-1993, 2017.

LEVIJOKI, Jouko et al. Further evidence for the cardiac troponin C mediated calcium sensitization by levosimendan: structure-response and binding analysis with analogs of levosimendan. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 32, n. 3, p. 479-491, 2000.

LEWIT-BENTLEY, Anita; RÉTY, Stéphane. EF-hand calcium-binding proteins. **Current opinion in structural biology**, v. 10, n. 6, p. 637-643, 2000.

LI, Monica X. et al. The calcium sensitizer drug MCI-154 binds the structural C-terminal domain of cardiac troponin C. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 16, p. 145-151, 2018.

LI, Monica X.; SPYRACOPOULOS, Leo; SYKES, Brian D. Binding of cardiac troponin-I147-163 induces a structural opening in human cardiac troponin-C. **Biochemistry**, v. 38, n. 26, p. 8289-8298, 1999.

LINDERT, Steffen et al. Computer-Aided Drug Discovery Approach Finds Calcium Sensitizer of Cardiac Troponin. **Chemical biology & drug design**, v. 85, n. 2, p. 99-106, 2015.

MILGROM, L. R.; DEMPSEY, P. J. F.; YAHIOUGLU, G. **Tetrahedron**, 52, 9877, 1996.

MONFARED, Seyed Sajad Mohseni Salehi; LARIJANI, Bagher; ABDOLLAHI, Mohammad. Islet transplantation and antioxidant management: a comprehensive review. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 15, n. 10, p. 1153, 2009.

MONTE-NIETO, Gonzalo del; HARVEY, Richard Paul. Embryology of the Heart. In: **Skin and the Heart**. Springer, Cham, 2021. p. 11-30.

MORRIS, Garrett M.; LIM-WILBY, Marguerita. Molecular docking. In: **Molecular modeling of proteins**. Humana Press, 2008. p. 365-382.

MUKHERJEE, Rupak; SPINALE, Francis G. L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 30, n. 10, p. 1899-1916, 1998.

NAKAGAKI, Shirley et al. The Research on Porphyrins and Analogues in Brazil: A Small Review Covering Catalytic and other Applications since the Beginning at Universidade de São Paulo in Ribeirão Preto until the Joint Venture between Brazilian Researchers and Colleagues from Universidade de Aveiro, Portugal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2501-2535, 2019.

NERY, Luiz Eduardo Maia et al. Propriedades funcionais do coração [Teoria]. 2012.

O'BOYLE, Noel M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2011.

PARMACEK, Michael S.; SOLARO, R. John. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 47, n. 3, p. 159-176, 2004.

PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70-82, 2021.

POLLESELLO, P.; PAPP, Zoltán; PAPP, J. Gy. Calcium sensitizers: what have we learned over the last 25 years? **International journal of cardiology**, v. 203, p. 543-548, 2016.

POLLESELLO, Piero et al. Binding of a new Ca²⁺ sensitizer, levosimendan, to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modelling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 28584-28590, 1994.

RAMACHANDRAN, Srinivas et al. Automated minimization of steric clashes in protein structures. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. 1, p. 261-270, 2011.

RARICK, Helen M. et al. The C terminus of cardiac troponin I is essential for full inhibitory activity and Ca^{2+} sensitivity of rat myofibrils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 43, p. 26887-26892, 1997.

RESENDE, Rodrigo R; GUATIMOSIM, Silvia; LEITE, Maria de. **Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares**. São Paulo: Sarvier, 2012.

ROBERTSON, Ian M. et al. A structural and functional perspective into the mechanism of Ca^{2+} -sensitizers that target the cardiac troponin complex. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 49, n. 6, p. 1031-1041, 2010.

ROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.]

SAADI, Hocine et al. Efficient GPU-based parallelization of solvation calculation for the blind docking problem. **The Journal of Supercomputing**, v. 76, n. 3, p. 1980-1998, 2020.

SARMENTO-NETO, José Ferreira. Síntese de complexos de Mn (III) à base de porfirinas tricatiónicas do tipo A_3B ($\text{A} = 2\text{-N-metilpiridínio}$; $\text{B} = 3\text{-metoxi-4-hidroxifenil}$ ou $3,4\text{-dimetoxifenil}$) como potenciais mímicos das enzimas sueroxido dismutase (SOD). 2016. 108p. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Universidade Federal da Paraíba.

SHARMAR, S. et al. Comparative analysis of blind docking reproducibility. **Res J Life Sci BioinforPharm Chem Sci**, v. 4, n. 3, p. 211-222, 2018.

SILVA, Camila Tainah da; JASIULIONIS, Miriam Galvonas. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7ª Edição, Artmed editora, 2017.

SINGH, Urvashi et al. Synthesis, molecular docking and evaluation of antifungal activity of Ni (II), Co (II) and Cu (II) complexes of porphyrin core macromolecular ligand. **Microbial pathogenesis**, v. 93, p. 172-179, 2016.

SLIWOSKI, Gregory et al. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 334-395, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Mortes por doenças cardiovasculares no brasil. **CARDIÔMETRO**. Rio de Janeiro, c2015-2020. Disponível em <cardioetro.com.br>. Acesso em: 20 de agosto de 2021.

SONG, Long-Sheng et al. Calcium biology of the transverse tubules in heart. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1047, p. 99, 2005.

SPASOJEVIC, Ivan et al. Lipophilicity of Mn (III) N-alkylpyridylporphyrins dominates their accumulation within mitochondria and therefore in vivo efficacy: a mouse study. **Free Radical Biology and medicine**, v. 51, p. S98-S99, 2011.

SPASOJEVIĆ, Ivan et al. Pharmacokinetics of the potent redox-modulating manganese porphyrin, MnTE-2-PyP5+, in plasma and major organs of B6C3F1 mice. **Free Radical Biology and medicine**, v. 45, n. 7, p. 9, 2008

SPASOJEVIĆ, Ivan et al. Rotational isomers of N-alkylpyridylporphyrins and their metal complexes. HPLC separation, ¹H NMR and X-ray structural characterization, electrochemistry, and catalysis of O₂•-disproportionation. **Inorganic chemistry**, v. 41, n. 22, p. 5874-5881, 2002.

STEENMAN, Marja; LANDE, Gilles. Cardiac aging and heart disease in humans. **Biophysical reviews**, v. 9, n. 2, p. 131-137, 2017.

STOJANOVIC, Srdan Đ.; ZARIC, Snežana D. Hydrogen bonds and hydrophobic interactions of porphyrins in porphyrin-containing proteins. **The Open Structural Biology Journal**, v. 3, n. 1, 2009.

TALREJA, Om; CASSAGNOL, Manouchkathe. Diltiazem. **StatPearls [Internet]**, 2020

TANG, Lin et al. Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 56-61, 2014.

TANG, Lin et al. Structural basis for diltiazem block of a voltage-gated Ca²⁺ channel. **Molecular pharmacology**, v. 96, n. 4, p. 485-492, 2019.

TANG, Lin et al. Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca²⁺ channel by Ca²⁺ antagonist drugs. **Nature**, v. 537, n. 7618, p. 117-121, 2016.

TORRES, Pedro HM et al. Key topics in molecular docking for drug design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TOVMASYAN, Artak et al. Anticancer therapeutic potential of Mn porphyrin/ascorbate system. **Free Radical Biology and medicine**, v. 89, p. 1231-1247, 2015.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

VAFIADAKI, Elizabeth et al. The role of SERCA2a/PLN complex, Ca²⁺ homeostasis, and anti-apoptotic proteins in determining cell fate. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 457, n. 3, p. 687-700, 2009.

VARUGHESE, Jayson F.; LI, Yumin. Molecular dynamics and docking studies on cardiac troponin C. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 29, n. 1, p. 123-135, 2011.

VASSALLO, D. V.; DE OLIVEIRA, E. M.; STEFANON, I. **Contratilidade Miocárdica**. In: AIRES, M. M. Fisiologia. 4^a edição. Rio de Janeiro

WANG, Xu; LI, Monica X.; SYKES, Brian D. Structure of the regulatory N-domain of human cardiac troponin C in complex with human cardiac troponin I147–163 and bepridil. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 31124-31133, 2002.

WATANABE, Kenji et al. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

WEITNER, Tin et al. Comprehensive pharmacokinetic studies and oral bioavailability of two Mn porphyrin-based SOD mimics, MnTE-2-PyP5⁺ and MnTnHex-2-PyP5⁺. **Free Radical Biology and medicine**, v. 58, p. 73-80, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases**. c2021. Disponível em <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 20 agosto de 2021

YANG, Lin et al. Cardiac L-type calcium channel (Cav1. 2) associates with γ subunits. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 3, p. 928-936

ZALK, Ran; LEHNART, SH2TE-2-PYP4⁺ han E.; MARKS, Andrew R. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. **Annual review of biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 367-385, 2007.

APÊNDICE A – lista de resíduos e tipos de interação presentes no docking de H₂TM-2-PyP⁴⁺ e CaVAb com *exhaustiveness* no valor 8

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – <i>Blind Docking</i>) <i>EXHAUSTIVENESS</i> = 8						
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÃO	π – π OU π – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)
	TENTATIVA					
MESO-TETRAQUIS(N-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H₂TM-2-PyP⁴⁺)	1	PHE1079 PHE 1107	PRO 1075* TRP 1076 LEU 1104* PHE 1107 LEU 1136* PHE 1140 PHE1144	-	PHE 1082 VAL 1110 ILE 1124 MET 1147 PRO 1200 VAL 1204	-11.5
	2	PHE 1167 TYR 1195	TRP 1076 MET 1188* ILE 1199*	GLY 1164 PRO 1192	TYR 1142 THR 1162 LEU 1163 GLU 1165 PHE 1171	-12.4
	3	PHE 1167 TYR 1195	TYR 1168 MET 1188 ILE 1199*	GLY 1164 PRO 1192	TYR 1142 THR 1162 LEU 1163 GLU 1165 PHE 1171	-12.4
	4	PHE 1107	TRP 1076 VAL 1120 LEU 1104* LEU 1136* PHE 1140 PHE 1144 VAL 1204*	-	PRO 1075 PHE 1079 ILE 1124 MET 1147 PRO 1200	-12.2
	5	PHE 1167 TYR 1195	LYS 21 PHE 24	GLY 1164 PRO 1192	TYR 1142 THR 1162 LEU 1163 GLU 1165 PHE 1171	-12.2

APÊNDICE B – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e CaVAb com *exhaustiveness* no valor 32

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – <i>Blind Docking</i>)						
EXHAUSTIVENESS = 32						
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÃO TENTATIVA	$\pi - \pi$ OU $\pi - \pi$ (T)*	$\pi - \text{ALQUIL}$ OU ALQUIL (*)	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)
MESO- TETRAQUIS(N- METILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H₂TM-2-PyP⁴⁺)	1	PHE 1167 TYR 1195	TYR 1168 MET 1188* ILE 1199*	GLY 1164 PRO 1192	TYR 1142 THR 1162 LEU 1163 GLU 1165 PHE 1171	-12.4
	2	PHE 1167 TYR 1195	TRP 1076 MET 1188* ILE 1199*	GLY 1164 PRO 1192	TYR 1142 THR 1162 LEU 1163 GLU 1165 PHE 1171	-12.4
	3	PHE 1167 TYR 1195	TYR 1168 MET 1188 ILE 1199*	GLY 1164 PRO 1192	TYR 1142 THR 1162 LEU 1163 GLU 1165 PHE 1171	-12.4
	4	PHE 1079*	TRP 1076 LEU 1104 VAL 1120 LEU 1136* PHE 1140 PHE 1144 VAL 1204	-	PRO 1075 PHE 1082 PHE 1107 VAL 1110 THR 1111 ILE 1124 PRO 1200	-12.2
	5	PHE 1079*	TRP 1076 LEU 1104 VAL 1120 LEU 1136* PHE 1140 PHE 1144 VAL 1204	-	PRO 1075 PHE 1082 PHE 1107 VAL 1110 THR 1111 ILE 1124 PRO 1200	-12.2

Fonte: Autor

APÊNDICE C – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *docking* de H₂TE-2-PYP⁴⁺ e CaVAb com *exhaustiveness* no valor 8

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – <i>Blind Docking</i>)							
EXHAUSTIVENESS = 8							
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÃO TENTATIVA	π – π OU – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	π – SIGMA	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)
MESO- TETRAQUIS(N- ETILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H₂TE-2-PYP⁴⁺)	1	PHE 1167	PHE 1171 MET 1188* PRO 1192* ILE 1199*	GLY 1164	TYR 1195	TYR 1142 THR 1162 LEU 1163 GLU 1165 TYR 1168 PRO 1200	-11.4
	2	-	MET 1174* LEU 1176 (2X) MET 1209* (2X) ILE 1210* VAL 1213*(2X)	-	-	THR 1206 (4X) THR 1175 (2X) LEU 1176 (2X) VAL 1205 MET 1209	-11.8
	3	-	MET 1174* LEU 1176 (2X) MET 1209* (2X) ILE 1210* VAL 1213*(2X)	-	-	THR 1206 (4X) THR 1175 (2X) LEU 1176 (2X) VAL 1205 MET 1209	-11.8
	4	PHE 1167 TYR 1195	TYR 1168 MET 1188* ILE 1199*	-	GLY 1164	TYR 1142 THR 1162 GLU 1165 PHE 1171 ARG 1185 PRO 1192 VAL 1196	-12.3
	5	PHE 1167 TYR 1195	TYR 1168 MET 1188* ILE 1199*	-	GLY 1164	TYR 1142 THR 1162 GLU 1165 PHE 1171 ARG 1185 PRO 1192 VAL 1196	-12.3

APÊNDICE D – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *docking* de H₂TE-2-PYP⁴⁺ e CaVAb com *exhaustiveness* no valor 32

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – <i>Blind Docking</i>)							
EXHAUSTIVENESS = 32							
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÃO TENTATIVA	π – π OU π – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	π – SIGMA	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)
MESO- TETRAQUIS(N- ETILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H₂T-2-PYP⁴⁺)	1	PHE 1167 TYR 1195	LEU 1163* TYR 1168 MET 1188* ILE 1199*	-	GLY 1164	TYR 1142 THR 1162 GLU 1165 PHE 1171 ARG 1185 PRO 1192 VAL 1196	-12.3
	2	PHE 1167 TYR 1195	<u>LEU 1163*</u> <u>TYR 1168</u> <u>MET 1188*</u> <u>ILE 1199*</u>	-	GLY 1164	TYR 1142 THR 1162 GLU 1165 PHE 1171 ARG 1185 PRO 1192 VAL 1196	-12.3
	3	PHE 1167 TYR 1195	LEU 1163* TYR 1168 MET 1188* ILE 1199*	-	GLY 1164	TYR 1142 THR 1162 GLU 1165 PHE 1171 ARG 1185 PRO 1192 VAL 1196	-12.3
	4	PHE 1167 TYR 1195	TYR 1168 MET 1188* ILE 1199*	-	GLY 1164	TYR 1142 THR 1162 GLU 1165 PHE 1171 ARG 1185 PRO 1192 VAL 1196	-12.3
	5	PHE 1167 TYR 1195	TYR 1168 MET 1188* ILE 1199*	-	GLY 1164	TYR 114 THR 1162 GLU 1165 LEU 1163 PHE 1171 PRO 1192 VAL 1196 PRO 1200	-12.3

APÊNDICE E – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *redocking* de BR-Verapamil e *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e H₂TE-2-PYP⁴⁺ em CaVAb no sítio para PAAs com *exhaustiveness* no valor 8

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – SÍTIO DE LIGAÇÃO DE PAAs)							
EXHAUSTIVENESS = 8 (RMSD = 1.2557 Å) E 32 (RMSD = 1.3101 Å)							
INTERAÇÕES							
NOME DO COMPOSTO	π – π OU – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	π – SIGMA	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)	
BR-VERAPAMIL (REDOCKED)	-	-	-	-	MET 1174 (2X) THR 1175 (2X) LEU 1176 (4X) THR 1206 (3X) VAL 1205 MET 1209 (2X)	-7.5	
MESO-TETRAQUIS(N- METILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	-	LEU 1176 (2X) MET 1209* ILE 1210* VAL 1213* (2X)	LEU 1176	MET 1174 LEU 1176	THR 1175 (2X) ASP 1177 THR 1206 (3X) MET 1209 (2X)	-11.5	
MESO-TETRAQUIS(N- ETILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	-	LEU 1176 MET 1174* MET 1209* ILE 1210* VAL 1213* (2X)	LEU 1176	LEU 1176	THR 1175 (2X) LEU 1176 THR 1206 (3X) MET 1209 (2X) ILE 1210	-11.8	

Fonte: Autor

APÊNDICE F – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *redocking* de BR-Verapamil e *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e H₂TE-2-PYP⁴⁺ em CaVAb no sítio para PAAs com *exhaustiveness* no valor 32

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – SÍTIO DE LIGAÇÃO DE PAAs)						
EXHAUSTIVENESS = 32 (RMSD = 1.3101 Å)						
NOME DO COMPOSTO	π – π OU – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	π – SIGMA	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)
BR-VERAPAMIL (REDOCKED)	-	-	-	-	MET 1174 (2X) THR 1175 (2X) LEU 1176 (4X) THR 1206 (3X) VAL 1205 MET 1209 (2X)	-7.5
MESO-TETRAQUIS(N-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	-	LEU 1176 (2X) MET 1209* ILE 1210* VAL 1213* (2X)	LEU 1176	MET 1174 LEU 1176	THR 1175 (2X) ASP 1177 THR 1206 (3X) MET 1209 (2X)	-11.5
MESO-TETRAQUIS(N-ETILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	-	LEU 1176 MET 1174* MET 1209* ILE 1210* VAL 1213* (2X)	LEU 1176	LEU 1176	THR 1175 (2X) LEU 1176 THR 1206 (3X) MET 1209 (2X) ILE 1210	-11.8

Fonte: Autor

APÊNDICE G – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *redocking* de amlodipine e *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e H₂TE-2-PYP⁴⁺ em CaVAb no sítio para DHPs com *exhaustiveness* no valor 8

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – SÍTIO DE LIGAÇÃO DE DHPs)						
EXHAUSTIVENESS = 8 (RMSD = 1.3947 Å)						
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÕES					
	π – π OU – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	AMIDA- π	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)
AMLODIPINE (REDOCKED)	TYR 1195	LEU 1163 PHE 1167* ILE 1199*	GLY 1164	-	TYR 1168 MET 1188 VAL 1196	-8.3
MESO-TETRAQUIS(N- METILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	PHE 1167	TYR 1142 TYR 1195 ILE 1199*	-	-	THR 1138 LEU 1163 GLY 1164 TYR 1168 MET 1188 PHE 1203	-8.4
MESO-TETRAQUIS(N- ETILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	PHE 1167	LEU 1163 TYR 1142 TYR 1195	-	-	LEU 1031 THE 1033 SER 1034 THR 1138 PHE 1141 GLY 1164 ILE 1199 PHE 1203	-8.4

Fonte: Autor

APÊNDICE H – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *redocking* de amlodipine e *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e H₂TE-2-PYP⁴⁺ em CaVAb no sítio para DHPs com *exhaustiveness* no valor 32

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – SÍTIO DE LIGAÇÃO DE DHPs)							
EXHAUSTIVENESS = 32 (RMSD 1.3566 Å)							
INTERAÇÕES							
NOME DO COMPOSTO	π – π OU – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	AMIDA- π	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)	
AMLODIPINE (REDOCKED)	TYR 1195	LEU 1163 PHE 1167* ILE 1199*	GLY 1164	-	TYR 1168 MET 1188 VAL 1196	-8.0	
MESO-TETRAQUIS(N- METILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	PHE 1167	TYR 1142 TYR 1195 ILE 1199*	-	-	THR 1138 LEU 1163 GLY 1164 TYR 1168 MET 1188 PHE 1203	-8.3	
MESO-TETRAQUIS(N- ETILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	PHE 1167 TYR 1195	PHE 1141 TYR 1142 LEU 1163* ILE 1199*	-	-	THR 1138 GLY 1164 MET 1188 PHE 1203	-8.6	

Fonte: Autor

APÊNDICE I – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *redocking* de diltiazem e *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e H₂TE-2-PYP⁴⁺ em CaVAb no sítio para BZTs com *exhaustiveness* no valor 8

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – SÍTIO DE LIGAÇÃO DE BZTs)							
EXHAUSTIVENESS = 8 (RMSD = 0.9750 Å)							
INTERAÇÕES							
NOME DO COMPOSTO	π – π OU π – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	π – SIGMA	Ligação C - H	VDW	π - SULFUR	AFINIDADE (KCAL/MOL)
DILTIAZEM (REDOCKED)	-	PHE 1203 MET 1209*	LEU 1176	THR 1175	PHE 1171 THR 1175 LEU 1176 (2X) ILE 1202 THR 1206 ILE 1210	MET 1174	-6.9
MESO-TETRAQUIS(N- METILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	-	LEU 1176 ILE 1210* VAL 1213*	LEU 1176	MET 1174	PHE 1171 THR 1175 (2X) ASP 1177 (2X) ASP 1178 (2X) ILE 1202 THR 1206 (2X) MET 1209 ILE 1210 VAL 1213	-	-4.9
MESO-TETRAQUIS(N- ETILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	-	MET 1174* LEU 1176 (2X) MET 1209* ILE 1210* VAL 1213*	LEU 1176	-	THR 1175 (2X) ASP 1177 (2X) THR 1206 (2X) ILE 1210 (2X) VAL 1213		-2.5

Fonte: Autor

APÊNDICE J – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *redocking* de diltiazem e *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e H₂TE-2-PYP⁴⁺ em CaVAb no sítio para BZTs com *exhaustiveness* no valor 32

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (CaVAb – SÍTIO DE LIGAÇÃO DE BZTs)							
EXHAUSTIVENESS = 32 (RMSD = 0.9793 Å)							
INTERAÇÕES							
NOME DO COMPOSTO	π – π OU π – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	π – SIGMA	Ligação C - H	VDW	π - SULFUR	AFINIDADE (KCAL/MOL)
DILTIAZEM (REDOCKED)	-	PHE 1203 MET 1209*	LEU 1176	THR 1175	PHE 1171 THR 1175 LEU 1176 (2X) ILE 1202 THR 1206 ILE 1210	MET 1174	-6.9
MESO-TETRAQUIS(N- METILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	-	LEU 1176	-	MET 1174 (2X) LEU 1176(A 2X)	THR 1175 ASP 1177 (3X) THR 1206 (2X) MET 1209 ILE 1210 (2X) VAL 1213 (2X)	-	-6.4
MESO-TETRAQUIS(N- ETILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	-	LEU 1176* (2X) ILE 1209* ILE 1210* VAL 1213* (2X)	-	MET 1174 (2X) LEU 1176	THR 1175 ASP 1177 (2X) THR 1206 (2X) ILE 1210 (2X) VAL 1213	-	-2.7

Fonte: Autor

APÊNDICE K – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e cNTnC – cTnl₁₄₄₋₁₆₃ com *exhaustiveness* no valor 8

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (cNTnC - cTnl ₁₄₄₋₁₆₃ – <i>Blind Docking</i>)						
EXHAUSTIVENESS = 8						
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÃO	π – π OU π – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)
	TENTATIVA					
MESO-TETRAQUIS(N-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	1	PHE 74	LYS 21 PHE 24	VAL 9 ASP 75	GLU 10 GLU 14 LYS 17 ASN 18 ASP 73 LEU 78	-9.1
	2	PHE 74	LYS 17 LYS 21 PHE 24*	VAL 9 GLU 10	GLU 14 ASN 18 ASP 73 ASP 75 LEU78	-9.1
	3	PHE 74	LYS 21 PHE 24	VAL 9 ASP 75	GLU 10 GLU 14 LYS 17 ASN 18 ASP 73 LEU 78	-9.1
	4	PHE 74	LYS 21 PHE 24	VAL 9 ASP 75	GLU 10 GLU 14 LYS 17 ASN 18 ASP 73 LEU 78	-9.1
	5	PHE 74	LYS 21 PHE 24	VAL 9 ASP 75	GLU 10 GLU 14 LYS 17 ASN 18 ASP 73 LEU 78	-9.1

APÊNDICE L – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e cNTnC – cTnl₁₄₄₋₁₆₃ com *exhaustiveness* no valor 32

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (cNTnC - cTnl ₁₄₄₋₁₆₃ – <i>Blind Docking</i>)						
EXHAUSTIVENESS = 32						
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÃO TENTATIVA	π – π OU π – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	Ligação C - H	VDW	AFINIDADE (KCAL/MOL)
MESO-TETRAQUIS(N-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	1	PHE 74	LYS 21 PHE 24	VAL 9 GLU 10	GLU 14 LYS 17 ASN 18 ASP 73 ASP 75 LEU 78	-9.1
	2	PHE 74	LYS 21 PHE 24	VAL 9 GLU 10	GLU 14 LYS 17 ASN 18 ASP 73 ASP 75 LEU 78	-9.1
	3	PHE 74	LYS 21 PHE 24	VAL 9 GLU 10	GLU 14 LYS 17 ASN 18 ASP 73 ASP 75 LEU 78	-9.1
	4	PHE 74	LYS 17* LYS 21 PHE 24	VAL 9 GLU 10	GLU 14 ASN 18 ASP 73 ASP 75 LEU 78	-9.1
	5	PHE 74	LYS 21 PHE 24	VAL 9 GLU 10	GLU 14 LYS 17 ASN 18 ASP 73 ASP 75 LEU 78	-9.1

Fonte: Autor

APÊNDICE M – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *docking* de H₂TE-2-PYP⁴⁺ e cTnI₁₄₄₋₁₆₃ com *exhaustiveness* no valor 8

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ – <i>Blind Docking</i>)							
EXHAUSTIVENESS = 8							
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÃO TENTATIVA	π – π OU π – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	Ligação C - H	VDW	π – ÂNION	AFINIDADE (KCAL/MOL)
MESO-TETRAQUIS(N- ETILPIRIDÍNIO-2- IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	1	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8
	2	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8
	3	PHE 74	VAL 9* LYS 17* LYS 21* PHE 24 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 ASP 73	ASP 75	-8.8
	4	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8
	5	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8

Fonte: Autor

APÊNDICE N – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *docking* de H₂TE-2-PYP⁴⁺ e cNTnC – cTnI₁₄₄₋₁₆₃ com *exhaustiveness* no valor 32

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (cNTnC - cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ – <i>Blind Docking</i>)							
EXHAUSTIVENESS = 32							
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÃO TENTATIVA	π – π OU π – π (T)*	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	Ligação C - H	VDW	π – ÂNION	AFINIDADE (KCAL/MOL)
MESO-TETRAQUIS(N-ETILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	1	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8
	2	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8
	3	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8
	4	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8
	5	PHE 74	VAL 9 LYS 17* LYS 21 LEU 78*	-	GLU 10 GLU 14 ASN 18 PHE 24 ASP 73	ASP 75	-8.8

Fonte: Autor

APÊNDICE O – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *redocking* de DFPB-O e *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e H₂TE-2-PYP⁴⁺ em cNTnC – cTnI₁₄₄₋₁₆₃ no sítio para SCs com *exhaustiveness* no valor 8

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (cNTnC - cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ – SÍTIO DE LIGAÇÃO DE SC)							
EXHAUSTIVENESS = 8 (RMSD = 0.2646 Å)							
NOME DO COMPOSTO	INTERAÇÕES						
	π – SULFUR	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	PONTE SALINA	LIGAÇÃO DE H OU C-H*	VDW	π – CÁTION OU π – ÂNION	AFINIDADE (KCAL/MOL)
DFPB-O (REDOCKED)	MET 60	LEU 41 MET 80 ILE 148 MET 153	ARG 83 ARG 147	ARG 83	PHE 27 ILE 36 MET 45 GLU 63 PHE 77 MET 81 CYS 84	-	-8.5
MESO-TETRAQUIS(N-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	-	VAL 146*	-	GLU 56 GLU 63	GLU 59 MET 60 ARG 144 ARG 147	ARG 83	1.5
MESO-TETRAQUIS(N-ETILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	-	VAL 146*	-	GLU 56	GLU 59 MET 60 ARG 144 ARG 147 ILE 148	GLU 63	5.9

APÊNDICE P – lista de resíduos e tipos de interação presentes no *redocking* de DFPB-O e *docking* de H₂TM-2-PYP⁴⁺ e H₂TE-2-PYP⁴⁺ em cNTnC – cTnI₁₄₄₋₁₆₃ no sítio para SCs com *exhaustiveness* no valor 32

RESÍDUOS DE INTERAÇÃO E AFINIDADE (cNTnC - cTnI ₁₄₄₋₁₆₃ – SÍTIO DE LIGAÇÃO DE SC)							
EXHAUSTIVENESS = 32 (RMSD = 0.2286 Å)							
INTERAÇÕES							
NOME DO COMPOSTO	π – SULFUR	π – ALQUIL OU ALQUIL (*)	PONTE SALINA	LIGAÇÃO DE H OU C-H*	VDW	π – CÁTION OU π – ÂNION	AFINIDADE (KCAL/MOL)
DFPB-O (REDOCKED)	MET 60	LEU 41 MET 80 ILE 148 MET 153	ARG 83 ARG 147	ARG 83	PHE 27 ILE 36 MET 45 GLU 63 PHE 77 MET 81 CYS 84	MET 60	-8.6
MESO-TETRAQUIS(N-METILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TM-2-PyP ⁴⁺)	-	VAL 146*	-	GLU 56	GLU 59 MET 60 ARG 144 ARG 147	GLU 63 ARG 83	0.9
MESO-TETRAQUIS(N-ETILPIRIDÍNIO-2-IL)PORFIRINA (H ₂ TE-2-PYP ⁴⁺)	-	CYS 8 VAL 146	-	-	GLU 56 GLU 59 ARG 144 ILE 148	GLU 63	9.8