



Construção do Receptor CYSLTR1 por Modelagem Comparativa

José Jorge Silva Júnior¹, Moacyr Comar Jr², Beatriz Alves Ferreira², Alex Gutterres Taranto^{2*}

¹PPGBiotec UEFS/CPqGM/FIOCRUZ, UEFS, Feira de Santana, BA, Brasil.

²Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia, Ciências Farmacêuticas, Ciências da Saúde, Laboratório de Modelagem Molecular, UFSJ, Divinópolis, MG, Brasil.

RESUMO

A asma é caracterizada como um distúrbio inflamatório crônico das vias aéreas, provocada pela contração da musculatura lisa dos bronquíolos, ocasionando obstrução parcial dos mesmos e dificultando a respiração. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 300 milhões de pessoas atualmente sofram de asma, sendo que as crianças estão entre as mais acometidas. Somente em 2005, 255.000 pessoas morreram de asma. Dentre os mediadores envolvidos no processo asmático, os leucotrienos cisteínicos, derivados do ácido araquidônico, são considerados os mais potentes entre aqueles envolvidos no processo asmático, indicados como principais mediadores da inflamação reversível das vias aéreas. Nos últimos 20 anos, grandes esforços têm sido realizados para identificar e desenvolver antagonistas dos receptores de leucotrienos na busca de melhorar o tratamento da asma, limitar a sua morbidade, e reduzir os efeitos dos medicamentos atuais. Portanto, o presente estudo propôs a construção de um modelo teórico do receptor do leucotrienos cisteínicos denominado CysLT1 por Modelagem Comparativa. Conclui-se que o modelo obtido através das metodologias computacionais e apresentado no presente estudo pode auxiliar em futuros testes, principalmente em metodologias que empregam ancoragem molecular e de novo design testando, *in silico*, ligantes de diversas fontes contra o receptor CysLT1.

Palavras-Chave: Asma. Modelagem comparativa. CysLTR1.

INTRODUÇÃO

A asma é um distúrbio inflamatório crônico das vias aéreas provocada pela contração da musculatura lisa dos

bronquíolos, ocasionando obstrução parcial dos mesmos e dificultando a respiração. Apresenta episódios recorrentes de sibilância, falta de ar, rigidez torácica e tosse à noite e/ou no início da manhã (Guyton, 2006), sendo classificada por grau de gravidade (Silva, 2001), denominadas asma leve, moderada e grave. A asma leve apresenta sintomas esporádicos e leves, assintomáticos entre as exacerbações, podendo apresentar tosse, sibilos e dispnéia leve, que ocorrem no máximo duas vezes por semana. A forma moderada apresenta crises frequentes de sibilância e dispnéia moderada a cada 30 dias ou sintomas mais leves como tosse ou sibilos discretos, três ou mais vezes por semana. Na forma grave os sintomas são contínuos com limitação de atividade física, crises severas com episódios de internações hospitalares e visitas frequentes às salas de emergência.

Este distúrbio inflamatório crônico é um problema de saúde pública que é somente controlado através de medicamentos que aliviam os sintomas melhorando a qualidade de vida do paciente. No caso de pacientes crônicos, a OMS preconiza que medicamento deve ser de uso diário e em longo prazo para controlar a inflamação subjacente e prevenir os sintomas e exacerbações. Ainda de acordo com a OMS, a asma é subnotificada e subtratada. (OMS, 2011).

No processo asmático, os leucotrienos cisteínicos são mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, os quais são considerados os mais potentes dentre os mediadores da inflamação reversível das vias aéreas (Funk, 2001). Seu papel na inflamação tem sido intensamente estudado, tendo como principal foco a asma humana. Tais investigações concentram-se sobre a atuação dos leucotrienos na inflamação crônica e no remodelamento das vias aéreas, que se manifesta como espessamento das mesmas, aumento da massa muscular lisa, fibrose subepitelial, deposição de matriz protéica, dano celular epitelial, hiperplasia de células caliciformes, infiltração de eosinófilos no epitélio da submucosa, e produção de citocinas, que se atribui também quando ocorre em conjugação com outros mitógenos. Entretanto, a função dos leucotrienos cisteínicos e seus receptores não se limitam à etiologia da asma, tendo como prova o envolvimento desses mediadores em modulações cardiovasculares e neurológicas (Hui & Funk, 2002). Estes mediadores são representados pelos leucotrieno C4 (LTC4), leucotrieno

Autor correspondente: Alex Gutterres Taranto - Universidade Federal de São João del Rei, (UFSJ) - Av Sebastião Gonçalves Coelho, 400 - Bairro Chanadour - CEP.35501-296 - Divinópolis - MG - tel. +55 37 3221 1392 e-mail: taranto@ufsj.edu.br

D4 (LTD4) e o leucotrieno E4 (LTE4). O LTD4 é cerca de 1.000 vezes mais potente que a histamina como broncoconstritor, devido a interação com o seu receptor denominado *cysteinyl leukotriene receptor 1* (CysLTR1) (Limbird & Ruddon, 2001).

A clonagem genética permitiu a identificação de dois receptores distintos nos seres humanos, CysLTR1 e CysLTR2 (Lynch et al., 1999; Sarau, 1999), substancialmente confirmada em observações farmacológicas anteriores, com base na sua sensibilidade para antagonistas específicos (Hui & Funk, 2002). Estes receptores pertencem à subfamília de receptores da rodopsina acopladas à proteína G (GPCRs), em particular, a um aglomerado de receptores filogeneticamente relacionados aos purínicos P2Y (Constanzi, 2004; Capra 2004). Os receptores CysLTRs também podem conter algumas características dos purinoreceptores em homologia com P2Y, pois são proteínas da mesma família (Mello et al., 2001). O CysLTR1 é expressado no tecido pulmonar e em células do sangue periférico, enquanto que CysLTR2 está presente nos tecidos cardíaco, nervoso e em glândulas adrenais (Hui & Funk, 2002).

Apesar dos estudos, atualmente não existe nenhuma estrutura resolvida disponível para os receptores de leucotrienos obtida por métodos experimentais (raios-X e/ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN)). A análise da hidrofobicidade das estruturas primárias revela que os receptores CysLTR1 e CysLTR2 apresentam sete domínios transmembrânicos (TM) hidrofóbicos ligados por seis alças hidrofílicas, típico dos GPCRs. Com base na estrutura do ligante, é muito provável que estes se liguem aos receptores CysLTRs através dos domínios TM, especialmente TM3, TM6, e TM7 (Funk et al., 1993; Kobayashi et al., 1997). A identidade sequencial entre CysLTR1 e CysLTR2 é elevada em TM3 e TM7, embora seja menor em TM4-6, o que pode resultar em diferença de especificidade ligante-receptor (Suissa et al., 1997; Moro et al., 1998). Adicionalmente, as alças extracelulares 2 e 3 e duas pontes dissulfeto são importantes para interação e estabilidade entre o ligante e a estrutura do receptor P2Y1. Entretanto, estes achados não foram descritos para os receptores CysLTR (Moro et al., 1999).

Estudos de modelagem molecular do LTD4, fundamentados por dados da relação estrutura química e atividade biológica (SAR) de uma série de antagonistas de receptor CysLTR1, propuseram a primeira representação esquemática do sítio do receptor CysLTR1, evidenciando as principais interações químicas envolvidas na formação do complexo ligante-receptor. O ligante deve apresentar como requisitos estruturais essenciais para a interação com receptor CysLTR1: a) uma âncora lipofílica que se interage na bolsa lipofílica do receptor, b) uma região central lipofílica e plana, que acredita-se mimetizar o sistema trieno do agonista natural e c) um ou dois grupamentos ácidos que mimetizam a unidade ácido carboxílico do LTD4 (Harper et al., 1992; Sprecher et al., 1993). Além disso, trabalhos posteriores mostraram a participação de um resíduo de arginina no receptor como local para a interação do grupamento ácido ou aromático dos de antagonistas CysLTR1 através de interações eletrostáticas (Lima et al., 2002; Zwaagstra et al., 1998).

Nos últimos anos, grandes esforços têm sido realizados para identificar e desenvolver antagonistas dos receptores de leucotrienos com objetivo de melhorar o tratamento da asma, limitar a sua morbidade e reduzir os efeitos indesejados dos medicamentos atuais (Capra, 2004). A fase clínica do desenvolvimento de fármacos antileucotrienos teve início em meados da década de 1980, mas os primeiros compostos testados no homem apresentaram níveis de biodisponibilidade não aceitáveis. A partir de 1990, uma série de estudos com diferentes antileucotrienos foram publicados, apoiados no conceito da broncoconstrição, comum na asma, que é desencadeada por leucotrienos, alergênicos e inalação de ar frio seco (Danlen, 2006).

A primeira aprovação de antagonistas de leucotrienos como uma nova classe de medicamentos para o tratamento da asma ocorreu em 1995 no Japão e anos seguintes nos Estados Unidos e Europa. Durante os primeiros anos deste milênio, os antagonistas de leucotrienos também foram registrados em muitos países para o tratamento da rinite alérgica (Danlen, 2006). Cerca de 25 anos após a descoberta dos leucotrienos é que seus antagonistas foram estabelecidos como um novo tratamento da asma e da rinite alérgica. A experiência clínica acumulada com esta classe de fármacos é, no entanto, inferior a dez anos e, na maioria dos países do mundo, está limitada ao uso do montelukast ou pranlukast. Os antileucotrienos apresentam efeitos anti-inflamatórios e broncodilatador, os quais aliviam os sintomas da asma e rinite em adultos e crianças. Os antileucotrienos podem ser utilizados como monoterapia ou associados com glicocorticoides de uso inalatório. Existem estudos que incentivam o uso dos antileucotrienos em todos os níveis de asma terapêutica, desde casos muito leves a muito graves. Nos casos leves é indicada monoterapia, nos casos mais graves terapia combinada com glicocorticoides (Danlen, 2006). Embora um grande número de antagonistas de receptor CysLTR1 tenha sido desenvolvido, apenas três chegaram ao mercado, montelukast (Singulair™), pranlukast (Onon™) e zafirlukast (Accolate™) (Danlen, 2006).

Assim, a elucidação estrutural do receptor CysLTR1 é importante para auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos como alternativas terapêuticas contra a asma (Evans et al., 1996). De posse de um modelo 3D do biorreceptores CysLTR1 será possível fornecer informações que poderão auxiliar no desenho de novos ligantes mais seletivos e potentes. Esta etapa é considerada primordial no planejamento racional de novos fármacos antiastmáticos, antagonistas de CysLTR1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, a sequência primária do receptor CysLTR1 foi obtida através do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2011). A seguir, a sequência da proteína foi submetida ao programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1997) contra as proteínas presentes no *Protein Data Bank* (PDB) (RSCB, 2000). O BLAST ordena as proteínas pela identidade entre a sequência alvo e problema. De posse da proteína com maior grau de identidade, deu-se

início a construção 3D do receptor CysLTR1 através da metodologia de modelagem comparativa utilizando o programa SWISS-MODEL (Lorenza, 2009). A seguir, o modelo foi preparado pelo *leap*, e refinado pelo *sander* através do campo de força *ff03* (Duan et al., 2003), ambos implementados no programa AMBER 11 (Case et al., 2010) com 1000 ciclos. Os algoritmos *steepest descent*, seguido de gradiente conjugado (Lipkowitz & Boyd, 1990), foram utilizados para remoção do efeito de empacotamento cristalino entre os átomos entre os átomos utilizando um valor de 14 Å para a interação de átomos não ligados, e um modelo de solvatação implícita (Still et al., 1990). O programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (Humphrey et al., 1996) foi utilizado para visualizar o resultado do modelo refinado. Finalmente, o modelo foi validado através dos programas PROCHECK 3.4 e *Atomic Non-Local Environment Assessment* (ANOLEA) (Melo & Feytans, 1998), que geram, respectivamente, o Gráfico de Ramachandran (Ramachandran et al., 1963) e cálculos de energia sobre todos os átomos pesados da cadeia lateral.

RESULTADOS

O banco de dados NCBI forneceu a sequência primária do CysLTR1 presente no cromossomo X do genoma humano (Fig. 1), a qual possui uma sequência de 337 aminoácidos. Adicionalmente, o NCBI classifica esta proteína como membro da superfamília de receptores acoplados a proteína G ativada pelo LTD4, resultando na contração do músculo liso, edema, migração de eosinófilo e formação de muco no pulmão.

```

ORIGIN
      1 mdetgnltvs satchdtidd frnqvystly smisvvgffg ngfvlyvik tyhkksafqv
      61 yminlavadl lcvctlplrv vyyvhkgiwl fgdflcrlst yalyvnlcys iffmtamsff
     121 rciaivfpvq nlnlvtgkka rfvcvgiwif viltsspflm akpqkdekn tkcfpeppqdn
     181 qtknhvlvlh yslfvfgfii pfviiivcvt miiltllkks mknlsshkk aigmimvnta
     241 aflvsvfmpyh iqrtihlhfl hnetkpcdsv lrmqksvvit lslaasnccf dpilyffsgg
     301 nfrkrilstfr khslssvtyv prkkaaslpk geeickv
  
```

Figura 1: Sequência primária do receptor CysLTR1 humano depositada no NCBI.

A sequência primária do CysLTR1 foi submetida ao programa BLAST que ranqueou as proteínas com maior grau de identidade depositadas no PDB. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos pela busca BLAST. Dentre as possíveis proteínas apresentadas pelo programa, as estruturas cristalográficas sob código PDB 2RH1, 1L9H, 1HZX e 1F88 são candidatas a moldes para construção do modelo. No entanto, dentre estas, a proteína molde que apresentou melhor pontuação, resolução e identidade foi 2RH1, cuja estrutura cristalizada é do receptor β_2 -adrenérgico humano, receptor ligado a proteína G. A Tabela 1 mostra que o receptor apresentou o maior grau de identidade (25%) com a sequência primária do CysLTR1. Apesar deste valor de identidade ser considerado limite na metodologia de modelagem comparativa (Lorenza, 2009; Pinheiro et al., 2012), o modelo gerado pode ser refinado e validado em etapas posteriores, as quais mostram a acurácia necessária para ser utilizado em estudos de ancoragem molecular (Andrade et al., 2009; Andrade et al., 2012). A Figura 2 mostra o alinhamento sequencial entre CysLTR1

(*query*) e 2RH1 (*sbjct*). O alinhamento inicia-se entre as serinas de ambas as proteínas, Ser10 e Ser24 para CysLTR1 e 2RH1, respectivamente, e termina com o alinhamento entre Ile212 e Val229. Apenas quatro *gaps* foram gerados neste alinhamento, os quais podem ser eliminados com processo de refinamento de geometria.

Tabela 1: Pontuação, resolução, e identidade de proteínas depositadas no PDB obtidos pela busca BLAST contra a sequência primária do receptor CysLTR1.

Código PDB	Pontuação	Resolução (Å)	Identidade (%)
2RH1	6e-07	2,40	25
1L9H	1e-06	2,60	18
1HZX	1e-06	2,80	18
1F88	1e-05	2,80	18

```

Score = 53.9 bits (128), Expect = 7e-08, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 54/211 (25%), Positives = 95/211 (45%), Gaps = 13/211 (6%)

Query 10  SSATCHDTIDDFRNQVY----STLYSMISVVGFFGNGFVLYVLIKTYHKKSAPQVVMINL 65
          S A HD R++V+ +S+I + FGN V+ +K ++ ++ +L
Sbjct 24  SHAPDHDVTQQ-RDEWVWVGIGVMSLVLAIVFGNVLVITAIKFERLQVTVMYFITSL 82

Query 66  AVADL-LCVCTLPLRVVYVYVHKGWLFQDFLCLRLSTYALYVNLVYCSIFPMTAMSFRCIA 124
          A ADL ++ +P ++ +K +W PG+P C T ++ SI + ++ R A
Sbjct 83  ACADLVMSGLAVVPPGAHILMK-MWTPGNFWCFEFTSIDVLCVTASLETLCVIAVDRIFA 141

Query 125 IVFPVQINLWVTKKARFVCGIWIPIVILTS-SFPLMKRPQKDEKNYKCFEPPQ--DNQ 181
          I P + +L+T+ KAR ++ +NI LTS P M + + C+ D
Sbjct 142 ITSPPRYQSLLTKNKARVILMNVIVSGLTSFLPIQMHVYRATHQEAINCVAEETCCDFP 201

Query 182  TKNHVLVLYVSLFVGFIIIPFVIIIVCYTMI 212
          T + S V F +P VI++ Y+ +
Sbjct 202  TNQAYAI---ASSIVSYFVPLVIMVYISRV 229
  
```

Figura 2: Alinhamento sequencial da proteína homóloga à proteína CysLTR1.

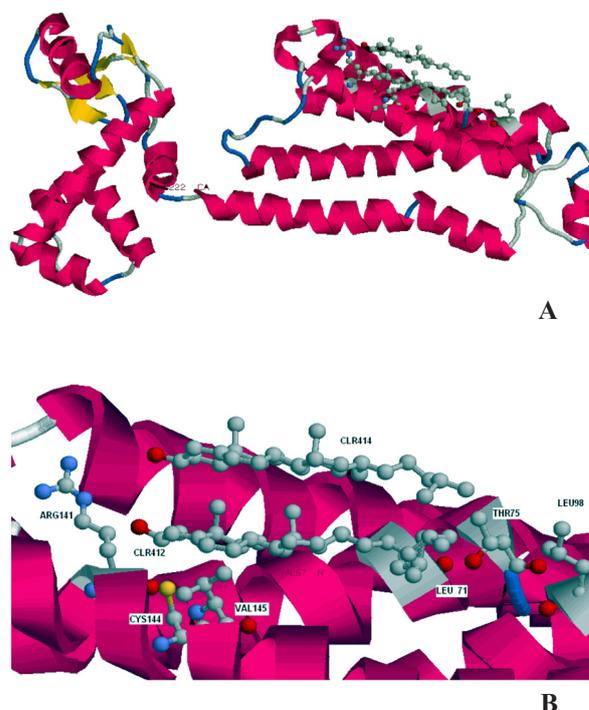


Figura 3: A) Modelo do receptor CysLTR1 complexado com os ligantes CLR412 e CLR414; B) Descrição detalhada do sítio ativo.

A sequência primária do receptor foi submetida ao programa SWISS-MODEL que utilizando a estrutura 3D do 2RH1 promoveu a geração do modelo para CysLTR1. A seguir, as coordenadas atômicas dos leucotrienos CLR412 e CLR414 presentes na estrutura 2RH1 foram transferidas para o modelo, formando um complexo ligante-receptor (CysLTR1-CLR412/CLR414). Finalmente, o complexo CysLTR1-CLR412/CLR414 foi refinado pelo programa AMBER 11. A Figura 3 mostra o complexo refinado gerado pela metodologia de modelagem comparativa. Como pode ser observado, este modelo possui cinco α -hélice e quatro β -antiparalelas (Fig. 3A). Com a inclusão dos ligantes CLR412 e CLR414, é possível estudar as interações intermoleculares presente no sítio ativo através da seleção de aminoácidos que distam 6Å dos ligantes (Fig. 3B). Os aminoácidos Arg141, Cys144, Val145, Leu71, Leu98, Thr75 são os responsáveis pela interação entre CysLTR1 e CLR412/CLR414. Além disso, a Arg141 interage com os ligantes através de uma interação eletrostática entre o grupamento guanidínico com grupos carboxilatos dos ligantes, enquanto as demais interações são predominantemente de caráter hidrofóbico.

A seguir, o modelo foi validado quanto à qualidade da stereoquímica da cadeia lateral através do Gráfico de Ramachandran gerado pelo programa PROCHECK (Fig. 4). Este modelo apresenta 91,2%, 6,8%, 1% e 1%, em regiões mais favoráveis, regiões adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e regiões não permitidas, respectivamente. Segundo análise da qualidade do modelo, este deve ter no mínimo 90% dos aminoácidos nas regiões mais favoráveis. Os aminoácidos presentes no sítio ativo do 2RH1, como Ser326, Ala231, Asn131, Arg141 e Cys144 (Cherezov et al., 2007), estão conservados no modelo do CysLTR1. Adicionalmente, nenhum destes encontra-se em regiões não permitidas.

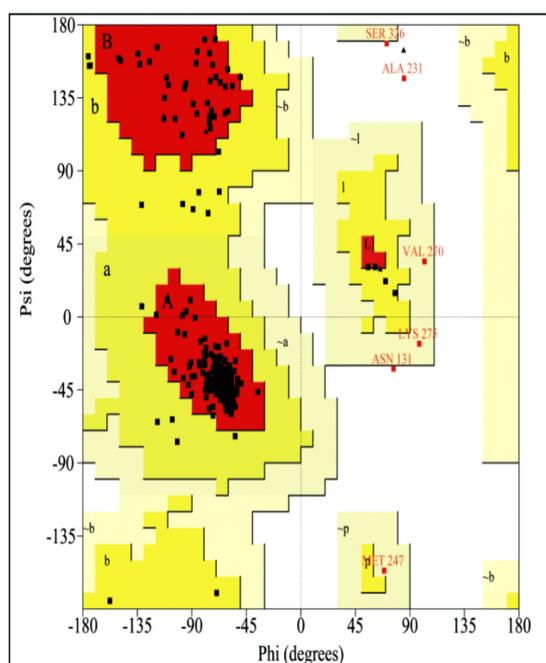


Figura 4: Gráfico de Ramachandran do modelo de proteínas CysLTR1 obtido a partir da estrutura cristalográfica PDB: 2RH1.

Além disso, o modelo foi validado quanto aos “choques” dos átomos pesados (carbono, oxigênio, nitrogênio, e enxofre) da cadeia lateral através do programa ANOLEA. O ANOLEA assume que valores negativos de energia representam um ambiente favorável para estes átomos e valores positivos representam ambiente de energia desfavorável, sendo caracterizado pelas cores em verde e vermelho, respectivamente. Assim, foi realizada uma validação do modelo antes e após o refinamento pelo campo de força AMBER. A Figura 5A mostra que a maior parte dos átomos do modelo encontram-se em ambiente não favorável. Após o refinamento, a estrutura foi novamente submetida à análise. Como pode ser observado na Figura 5B, houve uma melhora significativa, pois, a maioria dos átomos está em regiões energeticamente mais favoráveis, assumindo valores negativos de energia.

A energia de ligação entre receptor e ligante foi determinada pela diferença entre a energia potencial do complexo com o receptor e o ligante separadamente (energia do complexo ligante-proteína = proteína sem ligante, e somente o ligante). Assim a energia do complexo CysLTR1-CLR412/CLR414 é igual a -3,46 kcal/mol, mostrando que o ligante estabiliza a proteína modelo através de interações favoráveis.

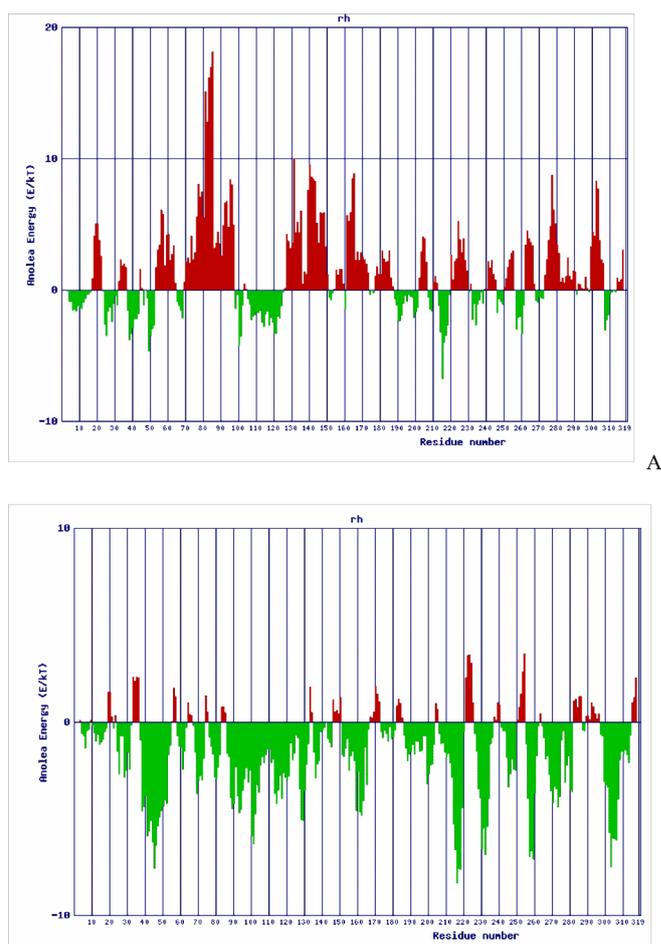


Figura 5: Gráficos de avaliação do modelo obtido através do software ANOLEA. A) antes do refinamento; B) avaliação após o refinamento.

DISCUSSÃO

O emprego da metodologia *in silico* demonstra ser extremamente importante na tentativa de auxiliar no planejamento de ligantes para diferentes alvos moleculares e contribuir para a identificação de compostos ativos de diferentes classes terapêuticas (Carregal et al., 2012; Leite et al., 2012). Esse fato se deve a redução significativa do tempo e custo das pesquisas. Utilizando as ferramentas computacionais, foi possível obter um modelo de estrutura 3D do CysLTR1. A qualidade deste modelo foi avaliada por três metodologias diferentes, ou seja, quanto à estereoquímica, ao empacotamento e à geometria do sítio ativo. Adicionalmente, o valor negativo de energia de ligação sugere que o ligante está acomodado na cavidade catalítica. Embora o modelo construído tenha sido gerado por um molde com um valor limite para a metodologia de modelagem comparativa por homologia (25%); a combinação de distintos métodos de validação sugere que este modelo poderá ser empregado nas metodologias de ancoragem molecular e *de novo design*, dando continuidade no processo de desenvolvimento racional de fármacos contra a asma. Como resultado final de todo o processo, novos ligantes capazes de se ligarem ao receptor de forma mais efetiva e seletiva poderão ser racionalmente planejados.

Neste trabalho ressaltamos ainda a importância da modelagem comparativa por homologia como uma ferramenta útil para resolver questões nas quais os métodos experimentais ainda apresentam limitações, como no caso da estrutura do CysLTR1, que até o presente momento não foi resolvida pelos métodos convencionais como Ressonância Magnética Nuclear e cristalografia de raios-X.

ABSTRACT

Building of CYSLTR1 Receptor by
Comparative Modeling

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways characterized by contraction of the smooth muscle of the bronchioles, causing their partial obstruction and making it difficult to breathe. The World Health Organization (WHO) estimates that 300 million people currently suffer from asthma, which is more common among children. In 2005 alone, 255,000 people died of asthma. The cysteinyl leukotrienes, derived from arachidonic acid, are considered the most potent mediators of the asthmatic process, being indicated as key mediators of reversible airway inflammation. In the past 20 years, great efforts have been made to identify and develop leukotriene receptor antagonists, in the quest to improve the treatment of asthma, limit its morbidity and reduce the side-effects of current drugs. Therefore, the objective of this study was to build a theoretical model of the cysteinyl leukotriene receptor, CysLT1, by Comparative Modeling. We conclude that the model generated by computational methods and presented in this paper may help in future studies, especially where docking and *de novo design*

are involved, in which new ligands from diverse sources are tested *in silico* against the CysLT1 receptor.

Keywords: Asthma. Comparative modeling. CysLTR1.

REFERÊNCIAS

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402.

Andrade BS, Taranto AG, Góes-Neto A, Duarte AA. Comparative modeling of DNA and RNA polymerases from *Moniliophthora perniciosa* mitochondrial plasmid. *Theor Biol Med Model.* 2009;6:22.

Andrade DVG, Góes-Neto A, Comar Junior M, Taranto AG. Comparative modeling and QM/MM studies of cysteine protease mutant of *Theobroma cacao*. *Int J Quantum Chem.* 2012;112(19):3164-3168.

Capra V. Molecular and Functional Aspects of Human Cysteinyl Leukotriene Receptors. *Pharmacol Res.* 2004;50(1):1-11.

Carregal AP, Comar Junior M, Alves SN, Siqueira JM, Lima LA, Taranto AG. Inverse virtual screening studies of selected natural compounds from cerrado. *Int J Quantum Chem.* 2012;112(20):3333-3340.

Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Merz KM, Wang B, Pearlman DA, Crowley M, Brozell S, Tsui V, Gohlke H, Mongan J, Hornak V, Cui G, Beroza P, Schafmeister C, Caldwell JW, Ross WS, Kollman PA. AMBER 11: User manual. San Francisco: University of California; 2010. Disponível em: <http://ambermd.org/doc11/Amber11.pdf>.

Cherezov V, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* 2007;318(5854):1258-65.

Costanzi S, Mamedova L, Gao, ZG, Jacobson KA. Architecture of P2Y nucleotide receptors: Structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling. *J Med Chem.* 2004;47(22):5393-404.

Danlen SE. Treatment of Asthma with Antileucotrienes: First Line or Last Resort Therapy. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):40-56.

Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, Yang R, Cieplak P, Luo R, Lee T. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem.* 2003;24(16):1999-2012.

Evans DJ, Barnes PJ, Spaethe SM, van Alstyne EL, Mitchell MI, O'Connor BJ. Effects of a leukotriene B4 receptor antagonist, ly293111, on allerg-induced responses in asthma. *Thorax.* 1996;51(12):1178-84.

Funk CD. Prostaglandins and Leukotriene, *Advances in Eicosanoid Biology.* Science. 2001;294(5548):1871-5.

- Funk CD, Furci L, Moran N, Fitzgerald GA. Point mutation in the seventh hydrophobic domain of the human thromboxane A₂ receptor allows discrimination between agonist and antagonist binding sites. *Mol Pharmacol*. 1993;44(5):934-939.
- Guyton AC. *Tratado de Fisiologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
- Harper RW, Herron DK, Bollinger NG, Sawyer JS, Baldwin RF, Roman CR, Rinkema LE, Fleisch JH. Development of a Series of Phenyltetrazole Leucotriene D4 (LTD4) Receptor Antagonists. *J Med Chem*. 1992;35(7):1191-200.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14(1):33-8.
- Hui Y, Funk CD. Cysteinyl Leukotriene Receptors. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:1549-1557.
- Kobayashi T, Kiriya M, Hirata T, Hirata M, Ushikubi F, Narumiya S. Identification of domains conferring ligand binding specificity to the prostanoid receptor. Studies on chimeric prostacyclin/prostaglandin D receptors. *J Biol Chem*. 1997;272(24):15154-60.
- Leite FHA, Carneiro JWM, Araujo MT, Comar Junior M, Taranto AG. Docking between natural peroxides and heme group by parametric method 6. *Int J Quantum Chem*. 2012;112(20):3390-3397.
- Lima LM, Manssour CAF, Barreiro EJ. Agentes Antiasmáticos Modernos: Antagonistas de Receptores de Leucotrienos Cisteínicos. *Quim Nova*. 2002;25(5):825-834.
- Limbird H, Ruddon M. Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2001.
- Lipkowitz KB, Boyd D. *Reviews in computational chemistry*. New York: VCH Publishes; 1990.
- Lorenza B, Florian K, Konstantin A, Pascal B, James B, Torsten S. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*. 2009;4:1-13.
- Lynch KR, et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT₁ receptor. *Nature*. 1999;399(6738):789-93.
- Mellor EA, Maekawa A, Austen KF, Boyce JA. Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jul 3;98(14):7964-9.
- Melo F, Feytans E. Assessing Protein Structures with a Non-local Atomic Interaction Energy. *J Mol Biol*. 1998;17:277(5):1141-52.
- Moro S, Guo D, Camaioni E, Boyer JL, Harden TK, Jacobson KA. Human P2Y1 receptor: molecular modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J Med Chem*. 1998;41(9):1456-66.
- Moro S, Hoffmann C, Jacobson KA. Role of the extracellular loops of G protein-coupled receptors in ligand recognition: a molecular modeling study of the human P2Y1 receptor. *Biochemistry*. 1999;38(12):3498-507.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI [Internet]. 2012 [acesso 2011 set. 22]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Organização Mundial de Saúde – OMS. 10 Facts On Asthma [Internet]. 2011 [acesso 2011 set. 22]. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/asthma/en/index.html>
- Pinheiro AAF, Taranto AG, Duarte AA, Góes Neto A, Hora Júnior BT, Pereira GAG, Santos Júnior MC, Assis SA. Homology modeling studies of beta(1,3)-D-glucan synthase of *Moniliophthora perniciosa*. *Int J Quantum Chem*. 2012;112(20):3356-3363.
- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*. 1963;7:95-99.
- RSCB. Protein Data Bank [Internet]. 2000 [acesso 2001 set. 21]. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/>.
- Sarau HMRS, et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol*. 1999;56(3):657-663.
- Silva LCC. *Conduas em Pneumologia*. Rio de Janeiro: Revinter; 2001.
- Sprecher VA, Beck A, Gerspacher M, Sallmann A, Anderson GP, Subramanian N, Niederhauser U, Bray MA. Strategies in the design of peptidoleukotriene antagonist. *J Lipid Mediat*. 1993;6(1-3):265-73.
- Still WC, Tempczyk A, Hawley RC, Hendrickson T. Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *J Am Chem Soc*. 1990;112(16):6127-6129.
- Suissa S, Dennis R, Ernest P, Sheehy O, Wood-Dauphinee S. Effectiveness of the leukotriene receptor antagonist zafirlukast for mild-moderate asthma. *Ann Int Med*. 1997;126(3):177-83.
- Zwaagstra ME, Schoenmakers SH, Nederkoorn PH, Gelens E, Timmerman H, Zhang MQ. Development of a Tree-Dimensional cyslt1 (LTD4) Antagonist Model with an Incorporated Amino Acid Residue from the Receptor. *J Med Chem*. 1998;41(9):1439-45.

Recebido em 06 de outubro de 2011

Aceito para publicação em 17 de outubro de 2012