

COMPARAÇÃO DO BLOQUEIO DE CANAL DE CÁLCIO VASCULAR PROMOVIDO POR VERAPAMIL E NIFEDIPINA POR MODELAGEM MOLECULAR

Comparison of vascular calcium channel block promoted by verapamil and nifedipine by molecular modeling

**Adilson Lima Dos Santos Júnior¹, Clara de Assis Karoline Oliveira¹,
Marcus Vinícius Guerra Canto¹, Joelmir Lucena Veiga da Silva²**

¹ PRODIIC-Faculdade de Medicina de Olinda; ² Docente-Faculdade de Medicina de Olinda

Recebido: 08.mai.2022 | Aprovado: 25.agosto.2022

RESUMO

As doenças cardiovasculares são extensivamente estudadas devido aos seus riscos e prevalência mundial. Sendo assim, a pesquisa por novos tratamentos é um processo contínuo e as substâncias isoladas de plantas são uma promissora fonte de fármacos. Atualmente, análises de modelagem molecular são realizadas para compreender a relação entre estrutura-função de um alvo farmacológico e suas interações proteína-ligante, e assim o mecanismo exato da ação farmacológica. Diante disso, este trabalho pretende comparar o bloqueio do canal de cálcio dependente de voltagem promovido por verapamil e nifedipina com análises de modelagem molecular. Os experimentos de docking molecular foram realizados usando o portal Dockthor e análises com o programa Chimera. As energias de afinidade foram comparadas utilizando o programa GraphPad Prism, com o teste “t”, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os resultados mostram que verapamil teve uma afinidade melhor do que nifedipina ($p < 0,0001$). As simulações de configuração no canal foram diferentes, ambos bloqueando o poro do canal, o que impede o influxo de cálcio na célula. Estes dados serão úteis para comparar com a prospecção de novas drogas que possam bloquear o canal de cálcio.

Palavras-chave: Agentes anti-hipertensivos; Bloqueador de canal de cálcio; Modelagem molecular.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are mainly investigated due to risks and prevalence at world. Thereby, research new treatments is a process continuous. Nowadays, the docking molecular analyses are performed to understand relation into structure-function of pharmacology site and its binding protein-ligand, consequently the exactly pharmacological mechanism. The aim of this study was to compare the blockade of calcium voltage-dependent channel promote by verapamil and nifedipine with docking molecular analyses. The experiments were realized with Dockthor and the analyses with Chimera program. The affinity energies were compared by GraphPad Prism program, with t-Test, when values of $p < 0.05$ were significant. The results showed that the verapamil affinity was better than nifedipine ($p < 0.0001$). The simulation of configuring for each ligand on channel were different, but both blocking the channel pore, that's prevent calcium influx in the cell. Those data could be useful to compare the prospection of news drugs be able blocker the calcium channel.

Keywords: Antihypertensive Agents; Calcium Channel Blocker; Docking Molecular.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são extensivamente estudadas devido aos seus riscos e prevalência mundial. No Brasil, essas doenças são a principal causa de morte, embora estejam diminuindo.¹ Desta forma, a pesquisa por novos tratamentos é um processo contínuo e as substâncias isoladas de plantas são uma promissora fonte de fármacos.²

Atualmente, análises de modelagem molecular são realizadas para compreender a relação entre estrutura-função de um alvo farmacológico e suas interações proteína-ligante.³⁻⁶ Pois estas análises trazem não somente a informação da dinâmica estrutural das moléculas teste, como também a energia do sítio de ligação entre a proteína e o produto teste, fundamentais para caracterizar mecanismo de ação de drogas.⁷

No controle da pressão arterial, a subunidade alfa-1C dos canais-Ca²⁺ do tipo L (CaV1.2) é a principal via de entrada de Ca²⁺ e sua ativação leva a entrada de Ca²⁺ na matriz extracelular e aumenta a concentração de cálcio citoplasmática, resultando em vasoconstrição.⁸⁻¹⁰ No tratamento da hipertensão clínica, alguns bloqueadores de CaV são usados.¹¹⁻¹³ Estes são classificados em dois tipos básicos: os di-hidropiridínicos e os não di-hidropiridínicos. Os dihidropiridínicos (anlodipina, nifedipina, felodipino) exercem efeito vasodilatador predominante, com mínima interferência na frequência cardíaca e na função sistólica, sendo, por isso, mais frequentemente usados como medicamentos anti-hipertensivos. Os não di-hidropiridínicos, como as difenilalquilaminas (verapamil) e as benzotiazepinas (diltiazem), têm menor efeito vasodilatador e agem na musculatura e no sistema de condução cardíacos. Por isso, reduzem a frequência cardíaca, exercem efeitos antiarrítmicos e podem deprimir a função sistólica.¹⁴ Assim, este trabalho teve como objetivo comparar o bloqueio do CaV promovido por verapamil e nifedipina através de análise de modelagem molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa quantitativa e experimental. Foram utilizados verapamil (CID 2520, Fig. 1A) e nifedipina (CID 4485, Fig. 1B) obtidos do PubChem.¹⁵ A estrutura homóloga do CaV

(ID 4MS2) foi obtida do Protein Data Bank (Fig. 1C).

Os experimentos de modelagem molecular foram realizados usando o portal online DockThor.¹⁶ Os resultados das simulações das substâncias foram estabelecidas em ordem de maior afinidade com a proteína, o CaV. As três melhores configurações das substâncias com maior afinidade no alvo foram escolhidas para análises mais aprofundadas e os posicionamentos apresentados pelo programa Chimera (versão 1.14).

As energias de afinidade foram analisadas pelo programa GraphPad Prism, utilizando o teste “t” para comparar os resultados de verapamil e da nifedipina, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

Foram realizados 1.000.000 posicionamentos para os fármacos (verapamil e nifedipina) no CaV. Destes, os três melhores estão representados na Tabela 1 pelas energias de ligação dos compostos no canal iônico, quanto menor a energia mais estável a molécula, devido as ligações químicas (hidrofóbicas e eletrostáticas) estabelecidas. Nota-se que o verapamil apresentou afinidade, significativamente, maior do que a nifedipina.

A análise da configuração dos fármacos na estrutura 3D do CaV, revelou posicionamentos próximos na região do poro do canal, mas em sítios distintos da ligação do verapamil e da nifedipina (Fig. 2) com os resíduos de aminoácidos. Percebe-se a localização das substâncias obstruindo o poro do canal, o que leva ao bloqueio do influxo dos íons cálcio para o interior das células.

DISCUSSÃO

Os canais de cálcio dependentes de voltagem possuem uma grande subunidade que forma o poro, denominada $\alpha 1$, que é composta por quatro domínios homólogos, onde cada um com seis segmentos transmembranares e uma alça que forma o poro¹⁷, como ilustrado na Fig. 1C.

Os bloqueadores de CaV do tipo fenilalquilamina, como o verapamil (Fig. 1A), são utilizados no tratamento de arritmias atriais, assim como os benzotiazepinas, por exemplo, diltiazem.¹⁸

ARTIGO

Houve diferentes afinidades apresentadas por verapamil e nifedipina (Tab.1), respectivamente, sendo que o verapamil mostrou maior afinidade. Isto pode ser resultado do verapamil ter uma cadeia carbônica mais longa, o que facilita mais interações com os resíduos de aminoácidos que formam o poro do canal, do que a nifedipina, que possui uma cadeia menor. Pois, como as fenilalquilaminas têm dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia alifática central contendo um grupo amino terciário que são capazes de entrar na abertura externa do poro através da comporta de ativação aberta e se ligar a um sítio receptor específico em uma forma protonada carregada positivamente.^{18,19} Já as diidropiridinas, como a nifedipina (Fig. 1B), interagem com os seguimentos S6 nos domínios III e IV, o que leva a uma proposta de modelo interface-domínio para ligação e ação do fármaco.^{17,20} Outro estudo de modelagem molecular sugere que estes resíduos de aminoácidos estão na face do lúmen do poro e cooperam para constituir o sítio de ligação do fármaco.²¹

Outros bloqueadores diidropiridínicos de CaV, como nimodipina, benidipina e amlodipina já foram avaliados sobre a orientação no bloqueio dos canais de cálcio do tipo-L (CaV1.2).²² Resultados semelhantes à nifedipina (Fig. 2) foram obtidos por uncarilane A, um alcaloide isolado de *Uncaria rhynchophylla*, planta utilizada medicina tradicional chinesa. Por simulação molecular, o alcaloide inibiu o CaV, permitindo inibição do influxo de cálcio.²³ Os achados deste trabalho, do bloqueio do CaV exercido pelo verapamil e nifedipina por modelagem molecular, como bloqueadores padrão, em especial, de uso na clínica cardiovascular, servirão para comparação com novas moléculas com potencial efeito em bloquear este canal.

CONCLUSÃO

Conclui-se que nifedipina e verapamil bloqueiam o CaV por diferentes interações dentro do canal, sendo que verapamil tem uma maior afinidade. Estes dados serão úteis para comparar com a prospecção de novas drogas que possam bloquear o CaV.

REFERÊNCIAS

1. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo-Silva G et al. Chro-

nic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet* 2011;377:1949-1961.

2. Calixto JB. The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2019;9(Suppl. 3):e20190105.
3. Liu X, Shi D, Zhou S, Liu H, Liu H, Yao X. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery* 2018, 13;23-37.
4. Ning J, Liu T, Dong P, Wang W, Ge G, Wang B, Yu Z, Shi L, Tian X, Huo X, Feng L, Wang C, Sun C, Cui J, James TD, Ma X. Molecular Design Strategy to Construct the Near-Infrared Fluorescent Probe for Selectively Sensing Human Cytochrome P450 2J2, *J Am Chem Soc* 2019, 141(2);1126-1134.
5. Ning J, Wang W, Ge G, Chu P, Long F, Yang Y, Peng Y, Feng L, Ma X, James TD. Target Enzyme-Activated Two-Photon Fluorescent Probes: A Case Study of CYP3A4 Using a Two-Dimensional Design Strategy. *Angew Chem Int Ed Engl* 2019, 58;9959-9963.
6. Knox M, Vinet R, Fuentes L, Morales B, Martinez JL. A Review of Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilation Induced by Phytochemicals in Isolated Rat Aorta. *Animals (Basel)* 2019, 9(9).
7. Teixeira LR, Silva Júnior JJ, Vieira PHS, Canto MVG, Figueirêdo AGM, Silva JLV. Tamoxifen inhibits the anion channel induced by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin: electrophysiological and docking analysis. *RSD [Internet]*. 2021;10(2):e13010212326.
8. Goldstein JA, Bastarache LA, Denny JC, Roden DM, Pulley JM, Aronoff DM. Calcium channel blockers as drug repurposing candidates for gestational diabetes: Mining large scale genomic and electronic health records data to repurpose medications, *Pharmacol Res* 2018, 130;44-51.
9. Yu B, Jiang Y, Zhang B, Yang H, Ma T, Resveratrol dimer trans-epsilon-viniferin prevents rotaviral diarrhea in mice by inhibition of the intestinal calcium-activated chloride channel, *Pharmacol Res* 2018, 129;453-461.
10. Hansen PB. Functional and pharmacological consequences of the distribution of voltage-gated calcium channels in the renal blood vessels. *Acta Physiol (Oxf)* 2013, 207(4);690-699.
11. Kario K, Ando S, Kido H, Nariyama J, Takiuchi S, Yagi T, Shimizu T, Eguchi K, Ohno M, Kinoshita O, Yamada T. The effects of the L/N-type calcium channel blocker (cilnidipine) on sympathetic hyperactive morning hypertension: results from ACHIEVE-ONE. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2013, 15(2);133-142.

12. Masaki M, Mano T, Eguchi A, Fujiwara S, Sugahara M, Hirotsu S, Tsujino T, Komamura K, Koshiba M, Masuyama T, Long-term effects of L- and N-type calcium channel blocker on uric acid levels and left atrial volume in hypertensive patients, *Heart Vessels* 2016, 31(11);1826-1833.
13. Seino H, Miyaguchi S, Yamazaki T, Ota S, Yabe R, Suzuki S. Effect of benidipine hydrochloride, a long-acting T-type calcium channel blocker, on blood pressure and renal function in hypertensive patients with diabetes mellitus. Analysis after switching from cilnidipine to benidipine, *Arzneimittelforschung* 2007, 57(8);526-531.
14. Barroso WKS et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol.* 2021; 116(3):516-658.
15. PubChem. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
16. Magalhães CS, Almeida DM, Barbosa HJC, Dardenne LE. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking of highly flexible ligands. *Information Sciences* 2014, 289;206–24.
17. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels.* *Pharmacol Rev* 2005, 57:411–425.
18. Sampson KJ, Kass RS. (2011) Anti-arrhythmic drugs, in Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Brunton L ed). McGraw-Hill Co., New York; 2011, p.815–848.
19. Catterall WA, Swanson TM. Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol Pharmacol* 2015, 88:141–150.
20. Catterall WA and Striessnig J (1992) Receptor sites for Ca²⁺ channel antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1992, 13:256–262.
21. Cheng RC, Tikhonov DB, Zhorov BS. Structural model for phenylalkylamine binding to L-type calcium channels. *J Biol Chem* 2009, 284:28332–28342.
22. Tikhonov DB, Zhorov BS. Structural Model for Dihydropyridine Binding to L-type Calcium Channels. *J Biol Chem.* 2009;284(28):19006-17.
23. Yun W-J, Zhang X-Y, Liu T-T, Liang J-H, Sun C-P, Yan J-K, Huo X-K, Tian X-G, Zhang B-J, Huang H-L, Ma X-C. The inhibition effect of uncarialin A on voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C: Inhibition potential and molecular stimulation. *Int J Biol Macromol.* 2020;159:1022-1030.

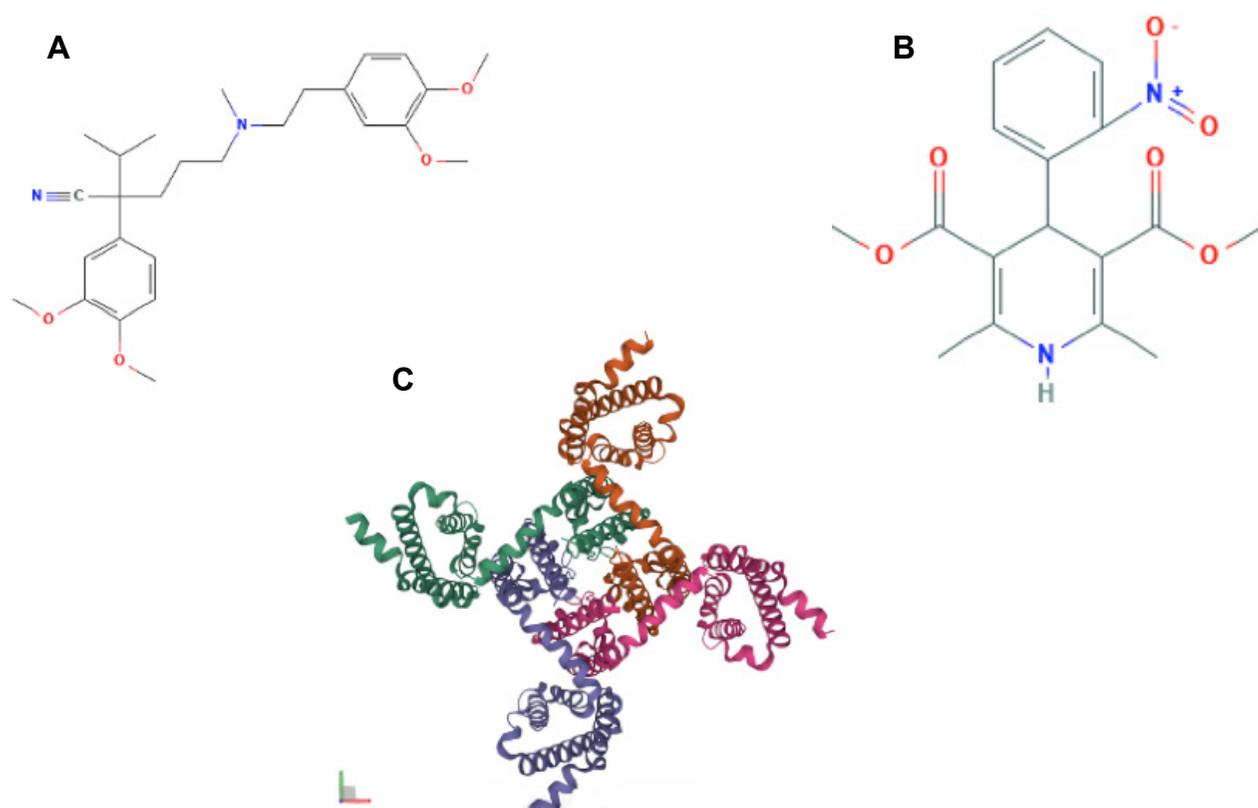


Figura 1. Estrutura molecular do verapamil (A, C₂₇H₃₈N₂O₄), da nifedipina (B, C₁₇H₁₈N₂O₆) e da proteica 3D do CaV (C).

Tabela 1. Afinidades de ligação dos fármacos no canal CaV.

Fármaco	Afinidade (kcal/mol) média ± e.p.m
verapamil	-9.696 ± 0,08*
nifedipina	- 8.031 ± 0.009

*p < 0,0001 (verapamil vs nifedipina), Teste t.

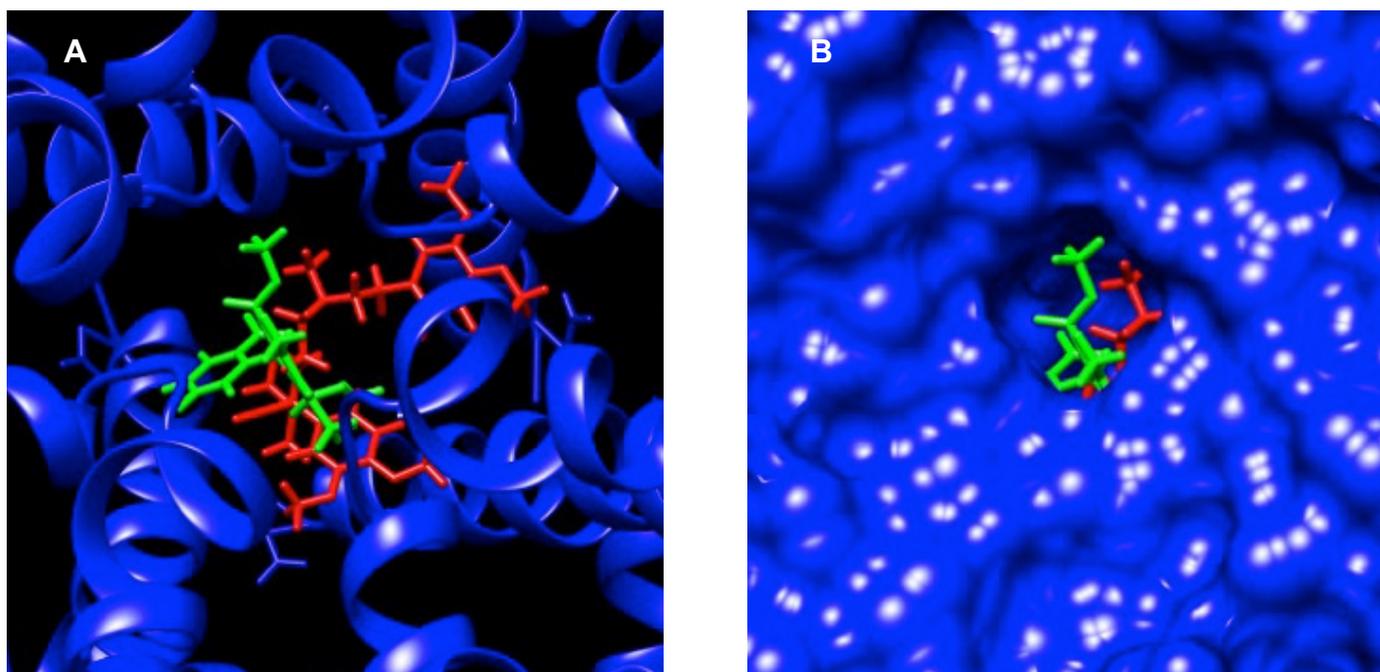


Figura 2. Posicionamento do verapamil (vermelho) e da nifedipina (verde) na estrutura 3D do canal CaV (azul). A: estrutura proteica quaternária; B: estrutura proteica hidrofóbica.