

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
MESTRADO EM QUÍMICA**

Daniel Boaventura Quintanilha

**Estudo computacional dos mecanismos moleculares associados a via de
sinalização da miostatina humana**

Juiz de Fora
2026

Daniel Boaventura Quintanilha

**Estudo computacional dos mecanismos moleculares associados a via de
sinalização da miostatina humana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientador: Dr. Hélio Ferreira dos Santos

Juiz de Fora

2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Quintanilha, Daniel Boaventura.

Estudo computacional dos mecanismos moleculares associados a via de sinalização da miostatina humana / Daniel Boaventura Quintanilha. -- 2026.

139 f. : il.

Orientador: Hélio Ferreira Dos Santos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2026.

1. Miostatina. 2. Modelagem molecular. 3. Dinâmica molecular. 4. Atrofia muscular. I. Dos Santos, Hélio Ferreira, orient. II. Título.

Daniel Boaventura Quintanilha

Estudo computacional dos mecanismos moleculares associados a via de sinalização da miostatina humana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Ferreira dos Santos - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Moacyr Comar Junior

Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 06/02/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Helio Ferreira dos Santos, Professor(a)**, em 20/02/2026, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Faria Pinto, Professor(a)**, em 20/02/2026, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Moacyr Comar Junior, Usuário Externo**, em 20/02/2026, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2864827** e o código CRC **73FCB42F**.

Dedico este trabalho aos meus pais que me inspiram, motivam e sempre me apoiam a conquistar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Denilda e Jonas, por todo apoio, amor e carinho nos momentos de alegria e de dificuldades, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Aos meus irmãos, Cristiane, Cristina, Jonathan e Alfredo (*in memoriam*) por tudo que vivemos ao longo dos anos.

Ao meu caro orientador Hélio Ferreira dos Santos por todo ensinamento, apoio, críticas e conselhos desde o início de minha vida acadêmica na IC até o mestrado.

A minha querida professora Márcia Grondek que desde muito cedo me motivou e me ajudou a trilhar o caminho que me trouxe até esse momento.

A minha grande amiga Vitória Basílio por todo apoio, amizade, companheirismo e conselhos desde que nos conhecemos. Diversos momentos nesse caminho até aqui foram melhores por saber que posso contar com você para tudo.

Ao meu grande amigo Bruno Fonseca, nos conhecemos há poucos anos, mas em pouco tempo assumiu um lugar muito importante em minha vida. Que o tempo fortaleça cada dia mais essa amizade.

A professora Priscila Faria e ao professor Moacyr Junior por terem aceitado o convite para compor a banca e pelas sugestões para o projeto.

Ao professor Luiz Antônio, sempre atuando como um amigo para todos do laboratório, participando e incentivando a comemoração de nossas vitórias.

Aos meus amigos que fiz durante todos esses anos no NEQC, Yuliana, Eduardo, Rivaél, Larissa, Maria Luiza, Frederico, Virgínia, Marcelo, Luiz Felipe, Loubenky, Diego, Júlia, Bruno, Marcela e Ana Beatriz por todos os momentos de alegria, confraternizações, almoços no RU, e tudo que vivemos juntos nesses anos.

Em especial a Larissa e a Maria Luiza, que mesmo há pouco tempo no laboratório a presença de vocês se tornou indispensável.

Em especial também a Yuliana que iniciou como minha orientadora na IC, ajudando com todas as dificuldades, e hoje se tornou uma grande amiga.

Aos meus amigos que fiz durante todo esse percurso, Eduardo Stelmo, Isadora, Igor, Gabriel, Júlia, Andrea, Luiz Felipe, Ana Letícia, Amanda, Thayla e Geovana.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Juiz de Fora onde cursei todo o meu percurso acadêmico no ensino superior até o momento.

Se você quer alguma coisa, você pode tê-la, mas apenas se quiser tudo o que a acompanha, incluindo o trabalho árduo e o desespero, e apenas se estiver disposto a arriscar o fracasso. (Philip Pullman, 1996, Clockwork, or All Wound Up).

RESUMO

Este trabalho consiste na construção e modelagem das proteínas associadas da via de sinalização da miostatina humana (MSTN), um regulador negativo do crescimento do sistema muscular esquelético. O objetivo central foi elucidar o processo de ativação extracelular da MSTN e os seus modos de interação com receptores celulares e o inibidor endógeno (folistatina) após sua ativação, de forma a auxiliar o design de novos fármacos. A protocolo empregou simulações de dinâmica molecular (software Amber24) com tempos de produção de 500 ns, em réplicas. A estabilidade e a afinidade dos complexos foram quantificadas pelo método MM-GBSA, permitindo a identificação de resíduos críticos (*hot spots*) e a comparação da energia livre de interação entre diferentes sistemas. Os resultados revelaram que a ativação da MSTN exige um rearranjo conformacional específico na região da "wrist hélice" (resíduos E314–A330), essencial para liberar o acesso ao sítio de ligação do receptor. Ademais, observou-se que durante a cascata de ativação, a perda gradual dos domínios *arm* e *forearm* desestabilizaram o precursor, facilitando a transição para a forma ativa da proteína. Em relação aos receptores transmembrana, o estudo demonstrou uma preferência termodinâmica da MSTN pela AcvR2B em relação à AcvR2A, com uma afinidade aproximadamente duas vezes superior e uma rede de interações mais complexa (12 *hot spots*). Nos complexos da MSTN associada aos receptores de activina do tipo II e I, os sistemas formados com AcvR2B mostraram-se cerca de 40 kcal mol⁻¹ mais estáveis do que os complexos com a AcvR2A. Este fenômeno aparente de "propagação de instabilidade" indica que a AcvR2B funciona como um fator determinante para a integridade do complexo de sinalização final. Além disso, a presença da AcvR2B tende a homogeneizar a energia de ligação das ALKs, sugerindo que a preferência entre os receptores na célula pode ser ditada por fatores cinéticos e disponibilidade proteica. Quanto ao desenvolvimento de inibidores, a região do *forearm* sobressaiu como um molde promissor. A análise mostrou que a sub-região $\alpha 1$ (apolar) bloqueia o sítio de tipo I, enquanto a $\alpha 2$ (anfipática) inibe o sítio de tipo II. Com isso foi possível propor modelos farmacofóricos para o desenho de pequenas moléculas capazes de mimetizar estas interações naturais.

Palavras-chave: Miostatina, Modelagem molecular, Dinâmica molecular, Atrofia muscular

ABSTRACT

This work consists of a modeling process of the proteins presents on the human myostatin (MSTN) signaling pathway, a negative regulator of skeletal muscle system growth. The project objective was to elucidate the extracellular activation process of MSTN and its binding modes with cellular receptors and the endogenous inhibitor (follistatin) after its activation, in view of assist the design of new drugs. The protocol employed molecular dynamics simulations (Amber24 software) with production times of 500 ns, in replicas. The stability and affinity of the complexes were quantified by the MM-GBSA method, allowing the identification of critical residues (hot spots) and the comparison of the free energy interaction between different systems. The results revealed that MSTN activation requires a specific conformational rearrangement in the "wrist helix" region (residues E314–A330), essential to release access to the receptor-binding site. Furthermore, it was observed that during the activation cascade, the gradual loss of the arm and forearm domains destabilized the precursor, facilitating the transition to the active form of the protein. Regarding transmembrane receptors, the study demonstrated a thermodynamic preference of MSTN for AcvR2B over AcvR2A, with an affinity approximately two times higher and a more robust network of interactions (12 hot spots). In the complexes of MSTN associated with type II and I activin receptors, the systems formed with AcvR2B proved to be about 40 kcal mol⁻¹ more stable than the complexes with AcvR2A. This apparent phenomenon of "instability propagation" indicates that AcvR2B functions as a determining factor for the integrity of the final signaling complex. In addition, the presence of AcvR2B tends to homogenize the binding energy of ALKs, suggesting that the preference between receptors in the cell may be dictated by kinetic factors and protein availability. Regarding the development of inhibitors, the forearm region stood out as a promising template. The analysis showed that the $\alpha 1$ sub-region (nonpolar) blocks the type I site, while $\alpha 2$ (amphipathic) inhibits the type II site. With this, it was possible to propose pharmacophoric models for the design of small molecules capable of mimicking these natural interactions.

Keywords: Myostatin, Molecular modeling, Molecular dynamics, Muscle atrophy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	– Fatores de crescimento e diferenciação conhecidos.....	19
Figura 1	– Representação geral do processo de ativação da miostatina humana.....	22
Figura 2	– Representação da sequência primária e das regiões constituintes da promiostatina humana.....	23
Figura 3	– Representação da sequência primária e da estrutura da FST288 humana.....	26
Figura 4	– Representação da sequência primária e da estrutura terciária para as proteínas AcvR2A, AcvR2B, ALK4 e ALK5.....	28
Figura 5	– Mecanismo de transdução do sinal da via de sinalização da Miostatina humana.....	29
Figura 6	– Mecanismo molecular proposto para o processo de ativação da miostatina humana.....	49
Figura 7	– Contatos nativos entre as regiões do prodomínio e a MSTN nos últimos 100 ns de trajetória para o complexo latente.....	54
Quadro 2	– Hot spots calculados, usando o método MM-GBSA, para a interação entre o <i>forearm</i> e o <i>arm</i> com a MSTN no complexo latente.....	57
Figura 8	– Contatos nativos entre a região <i>arm</i> e a MSTN para as proteínas TLD – p1 e p1 – inter.....	59
Figura 9	– Contatos nativos entre o <i>forearm</i> e a MSTN para as estruturas TLD – p1, p1 – inter, TLD – p2 e p2 – inter.....	61
Figura 10	– Hot spots observados para a interação <i>forearm</i> – MSTN ao longo de todo o processo de ativação.....	62
Figura 11	– Perfil de contatos nativos entre as cadeias A e B da MSTN para a forma ativa e inativa nos últimos 100 ns de simulação.....	67
Figura 12	– Modelo geral para o desenho de inibidores com alvo nos sítios tipo I e II da miostatina humana.....	69
Figura 13	– Estruturas dos complexos formados pela Miostatina ativa e a Folistatina nas proporções 1:2 e 1:1.....	72
Figura 14	– RMSF da MSTN ativa em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas de FST.....	73

Figura 15	– RMSF da MSTN inativa em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas de FST.....	75
Figura 16	– Contatos nativos entre a MSTN ativa e inativa com a FST nas proporções 1:1 e 1:2 (MSTN:FST)	76
Figura 17	– Hot spots calculados com o método MM-GBSA para todos os complexos envolvendo a interação MSTN – FST.....	79
Figura 18	– Interações entre os hot spots do domínio ND da folistatina com a MSTN.....	81
Figura 19	– Interações entre os hot spots do domínio FDS2 da folistatina com a MSTN.....	82
Figura 20	– Estruturas dos complexos MSTN – AcvR2A, MSTN – AcvR2A ₂ , MSTN – AcvR2B ₂ e MSTN – AcvR2B.....	85
Figura 21	– Comparação entre as estruturas e o arranjo espacial da AcvR2A e AcvR2B.....	86
Figura 22	– RMSF da MSTN em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas de AcvR2A.....	87
Figura 23	– RMSF da MSTN em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas de AcvR2B.....	88
Figura 24	– Contatos nativos entre a MSTN ativa com as proteínas AcvR2A e AcvR2B nos complexos MSTN – AcvR2A, MSTN – AcvR2A ₂ , MSTN – AcvR2B ₂ e MSTN – AcvR2B.....	90
Quadro 3	– Hot spots calculados, usando o método MM-GBSA, para a interação entre a MSTN e as proteínas AcvR2A e AcvR2B.....	93
Figura 25	– Estruturas dos complexos MSTN – ALK4, MSTN – ALK4 ₂ , MSTN – ALK5 e MSTN – ALK5 ₂	95
Figura 26	– RMSF da MSTN em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas da AcvR2B e AcvR2A.....	96
Figura 27	– Contatos nativos entre a MSTN ativa com as proteínas ALK4 e ALK5 nos complexos MSTN – ALK4, MSTN – ALK4 ₂ , MSTN – ALK5 ₂ e MSTN – ALK5.....	98
Quadro 4	– Hot spots calculados, usando o método MM-GBSA, para a interação entre a MSTN e as proteínas ALK4 e ALK5.....	100

Figura 28	– Estruturas dos complexos MSTN-AcvR2B ₂ -ALK4 ₂ , MSTN-AcvR2B ₂ -ALK5 ₂ , MSTN-AcvR2A ₂ -ALK4 ₂ e MSTN-AcvR2A ₂ -ALK5 ₂	102
Figura 29	– Grupos farmacofóricos esperados para um inibidor do sítio tipo II da MSTN.....	106
Figura 30	– Grupos farmacofóricos esperados para um inibidor do sítio tipo I da MSTN.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Propriedades das estruturas disponíveis no PDB para a proteína precursora da miostatina humana.....	35
Tabela 2	– Estruturas cristalográficas para os receptores ALK4, ALK5, AcvR2B e AcvR2A.....	37
Tabela 3	– Benchmark de campo de força e modelos de solvente para os modelos completo e ativo da promiostatina.....	44
Tabela 4	– Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para cada etapa do processo de ativação da miostatina humana.....	52
Tabela 5	– Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para a interação MSTN – FST.....	78
Tabela 6	– Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para a interação MSTN e AcvR2A/2B.....	92
Tabela 7	– Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para a interação MSTN – ALK4/5.....	99
Tabela 8	– Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para a interação MSTN – ALK4/5 – AcvR2A/2B.....	103
Tabela 9	– Regiões para o modelo farmacofórico obtido para o sítio tipo II com base nas interações entre a MSTN e as proteínas AcvR2A, AcvR2B, FST e o forearm do prodomínio.....	105
Tabela 10	– Pontos para o modelo farmacofórico obtido para o sítio tipo I com base nas interações entre a MSTN e as proteínas ALK4, ALK5, FST e a região $\alpha 1$ do forearm do prodomínio.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MSTN	Miostatina humana
ALK4	<i>Activin receptor-like kinase 4</i>
ALK5	<i>Activin receptor-like kinase 5</i>
AcvR2A	<i>Activin receptor type 2A</i>
AcvR2B	<i>Activin receptor type 2B</i>
TGF- β	<i>transforming growth fator beta</i>
GDF	<i>growth and differentiation factor</i>
FST	Folistatina
BMP-1/TLD	<i>Bone Morphogenetic Protein 1/Tolloid-like Metalloproteinases</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
DM	Dinâmica molecular
VDW	van der Waals
RMN	Ressonância magnética nuclear
ΔG_a	Varição de energia livre em fase aquosa
pH	Potencial hidrogênionico
GBSA	<i>Generalized Born Surface Area</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
ns	Nanosegundo
µs	Microsegundo
fs	Femtosegundo
Kcal	Kilocaloria
α	Alfa
β	Beta
τ	Tau
ε	<i>Epsilon</i>
K	Kelvin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A SUPERFAMÍLIA DAS PROTEÍNAS DO GRUPO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA – TGF β	17
1.2	AS PROTEÍNAS DO GRUPO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO	18
1.3	O FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO 8 – MIOSTATINA	20
1.3.1	Estrutura e funções	21
1.3.2	Inibidores endógenos	24
1.3.3	Transdução e propagação do sinal	26
1.4	INIBIDORES PROPOSTOS PARA MIOSTATINA E SEUS RECEPTORES ..	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	METODOLOGIA	34
3.1	SELEÇÃO DAS ESTRUTURAS PROTEICAS.....	34
3.1.1	Seleção da Miostatina e seus percursores	34
3.1.2	Seleção da Folistatina	36
3.1.3	Seleção dos receptores ALK4, ALK5, AcvR2A e AcvR2B	36
3.2	MODELAGEM DAS PROTEÍNAS.....	40
3.2.1	Modelagem da Miostatina e seus percursores	40
3.2.2	Modelagem da Folistatina	42
3.2.3	Modelagem dos receptores ALK4, ALK5, AcvR2A e AcvR2B	42
3.3	BENCHMARK PARA O CAMPO DE FORÇA E MODELO DE SOLVENTE ...	43
3.4	DINÂMICA MOLECULAR: PROTOCOLO FINAL	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1	CASCATA DE ATIVAÇÃO EXTRACELULAR DA MIOSTATINA HUMANA ...	48

4.1.1	Análise das interações miostatina – prodomínio ao longo do processo de ativação	53
4.1.2	Transformação da miostatina inativa para a forma ativa	64
4.1.3	Principais fatores que um inibidor efetivo da MSTN deve apresentar	68
4.2	PROCESSO DE INIBIÇÃO ENDÓGENA	71
4.3	INTERAÇÃO EXTRACELULAR COM OS RECEPTORES TRANSMEMBRANA	83
4.3.1	Avaliação do provável modo de interação MSTN – AcvR2A/2B	84
4.3.2	Avaliação do provável modo de interação MSTN – ALK4/5	94
4.3.3	Avaliação do provável modo de interação MSTN – AcvR2A/2B – ALK4/5	101
4.4	QUAL A APARÊNCIA DE UM PEPTÍDEO TERAPÉUTICO PARA A VIA DE SINALIZAÇÃO DA MIOSTATINA HUMANA	104
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	110
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICE A – Representação dos epítomos da miostatina humana em sua conformação ativa e inativa	124
	APÊNDICE B – Estruturas cristalográficas disponíveis no PDB para a miostatina humana	125
	APÊNDICE C – Construção do modelo da promiostatina humana a partir do PDB 5NTU	126
	APÊNDICE D – RMSD calculado para todas as proteínas envolvidas no processo de ativação nos últimos de 100 ns de simulação	127
	APÊNDICE E – Valores de RMSD para todas as proteínas envolvidas no processo de ativação da miostatina humana	128
	APÊNDICE F – Comparação entre a estrutura da estrutura cristalográfica da promiostatina e a estrutura de equilíbrio oriunda da DM	129
	APÊNDICE G – Contatos nativos entre o <i>forearm</i> e MSTN para o complexo p2 – inter em simulação extensa de 2,5 μs	130

APÊNDICE H – Análise DSSP da região wrist hélice da miostatina inativa (cadeia b) durante os 500 ns simulação	131
APÊNDICE I – Análise DSSP da região wrist hélice da miostatina inativa (cadeia b) e ativa durante os últimos 500 ns simulação prolongada	132
APÊNDICE J – Estruturas dos complexos formados pela miostatina inativa e a folistatina nas proporções 1:2 e 1:1	133
APÊNDICE K – Valores de RMSD para os complexos MSTN_{ativa} – FST, MSTN_{ativa} – FST₂, MSTN_{inativa} – FST e MSTN_{inativa} – FST₂.....	134
APÊNDICE L – Hot spots para os complexos MSTN_{ativa} – FST, MSTN_{ativa} – FST₂, MSTN_{inativa} – FST e MSTN_{inativa} – FST₂.....	135
APÊNDICE M – Interações entre os hot spots do receptor AcvR2a com a mstn	136
APÊNDICE N – Grupos farmacofóricos observados para interação com o sítio tipo II da MSTN.....	128
APÊNDICE O – Grupos farmacofóricos observados para interação com o sítio tipo I da MSTN.....	139

1 INTRODUÇÃO

O corpo humano é um organismo complexo, compreendido por diversos órgãos, tecidos e sistemas, os quais, por meio de mecanismos bioquímicos, atuam de forma conjunta na manutenção da vida. Em relação aos tecidos que o compõem, há o epitelial, conjuntivo, nervoso e o muscular, cujas funções variam de acordo com o tipo majoritário de células que estão presentes na região (Neumann; Neumann, 2021). Quanto ao tecido muscular, há uma subdivisão em liso, cardíaco e esquelético, sendo o principal fator de diferenciação entre esses grupos estar associado à capacidade de contração voluntária e às características/formato das células que o compõem. Focando na musculatura esquelética, esse músculo constitui a maior parte da musculatura do corpo humano, recobrando todo o esqueleto e apresentando conexões com os tendões, os quais auxiliam na sua contração e estiramento (Frontera; Ochala, 2015).

1.1 A superfamília das proteínas do grupo do fator de crescimento transformador beta

Em relação ao funcionamento bioquímico do tecido muscular esquelético, há diversas cascatas metabólicas de proteínas as quais estão associadas aos fenômenos de contração, estiramento, crescimento e morte celular (Gelfi; Vasso; Cerretelli, 2011; Zumbaugh et al., 2022). Dentre as principais proteínas relacionadas ao tecido muscular esquelético, pode-se dividi-las em dois grupos de acordo com as suas principais funções: as proteínas associadas a fenômenos mecânicos e fisiológicos e as proteínas associadas ao crescimento celular. Quanto ao primeiro grupo, um exemplo é a titina, um importante regulador na contração da musculatura estriada, e está associada a geração de força durante exercícios físicos (Monroy et al., 2012). Com respeito ao segundo grupo, há as proteínas pertencentes à superfamília do fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor beta* – TGF- β), as quais atuam como mediadoras e reguladoras no desenvolvimento celular, no reparo de tecidos e em respostas imunes (Moustakas; Heldin, 2009; Tzavlaki; Moustakas, 2020).

Em relação a família das TGF- β , esse grupo compreende diversas proteínas que atuam como reguladoras negativas do crescimento do tecido muscular, tais como as activinas (Wang; Fischer; Hyvönen, 2016), as proteínas morfogenéticas ósseas (*bone morphogenetic protein* – BMP) (Ducy; Karsenty, 2000) e os fatores de crescimento e diferenciação (*growth and differentiation factors* - GDFs) (Tzavlaki; Moustakas, 2020). As proteínas pertencentes a essa superfamília, apresentam diversas características similares, desde o formato comum em dímero à interação com receptores serina/treonina quinase transmembrana.

1.2 As proteínas do grupo fator de crescimento e diferenciação (GDF)

Destacando as proteínas pertencentes a família das GDFs, essas proteínas estão associadas a diferentes cascatas de sinalização celular e ao desenvolvimento de diversos órgãos. Atualmente, tem-se conhecidas 10 membros dessa família (Quadro 1) que atuam auxiliando no crescimento celular de diversos tecidos. De forma geral, as GDFs constituem um amplo grupo de proteínas sinalizadoras extracelulares que regulam processos fundamentais do desenvolvimento do organismo, desde a homeostase celular à resposta de estímulos fisiológicos e/ou patológicos. Essas moléculas apresentam alta afinidade por receptores específicos de membrana, principalmente receptores serina/treonina-quinase, e atuam de forma autócrina ou Parácrina (Tzavlaki; Moustakas, 2020). O modo de ação das proteínas presentes nessa família envolve um processo de ativação extracelular seguida da interação com o receptor, indução de dimerização do mesmo de forma a ativar diversas cascatas de sinalização intracelular, como a via SMAD, resultando na modulação da expressão gênica (Huse et al., 2001; Tzavlaki; Moustakas, 2020). Quanto a ação no organismo, as GDFs controlam a proliferação, sobrevivência, migração e especialização celular de diversos tecidos, sendo essenciais para o bom funcionamento de processos biológicos ao longo de todo o organismo.

Quadro 1 – Fatores de crescimento e diferenciação conhecidos.

Proteína	Função no organismo	Referências
GDF-1	Associada a plasticidade tumoral	(Cheng et al., 2021; Rochette et al., 2021)
GDF-2 (BMP-9)	Controla a pressão arterial	(Grynblat et al., 2024; Wooderchak-Donahue et al., 2013)
GDF-3	Homeostase do tecido adiposo e ósseo	(Levine; Brivanlou, 2006a, 2006b)
GDF-5	Crescimento e diferenciação dos condrócitos	(Francis-West et al., 1999)
GDF-6 (BMP-13)	Atua na comunicação entre os olhos e o cérebro	(Asai-Coakwell et al., 2007; Hanel; Hensey, 2006)
GDF-8 (Miostatina)	Regula o desenvolvimento e a atrofia muscular	(Bonnieu et al., 2007)
GDF-9	Auxilia na fertilidade feminina	(Hreinsson et al., 2002; Juengel et al., 2004)
GDF-10 (BMP-3b)	Regula diferenciação celular e morfogênese esquelética	(Cunningham et al., 1995)
GDF-11 (BMP-11)	Desenvolvimento celular; “Reguladora do envelhecimento”	(Ozek et al., 2018)
GDF-15	Regula o metabolismo no controle de processos inflamatórios	(Li et al., 2024; Rochette et al., 2021)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: A tabela apresenta todos os membros conhecidos até o momento para a família das GDFs e as suas principais funções no organismo humano.

Ao analisar o Quadro 1 com os membros pertencentes ao grupo dos fatores de crescimento, é possível notar que as proteínas dessa família atuam em múltiplos órgãos sendo responsáveis pela manutenção da vida e quando desreguladas estão relacionadas ao surgimento de doenças. Focando no desenvolvimento muscular, dentre os diversos membros dessa família, a proteína GDF-11 (Ma et al., 2021) e a GDF-8 (Bonnieu; Carnac; Vernus, 2007; Han et al., 2013) são relacionadas diretamente com o crescimento dos músculos e dos ossos, por meio da desativação de cascatas de sinalização responsáveis pela indução da produção das fibras musculares, e conseqüentemente promovendo a atrofia muscular (Han et al., 2013). Focando na GDF-8, essa proteína vem se destacando como um promissor alvo de tratamento de doenças associadas a perda de força e da musculatura esquelética, bem como uma via adicional ao tratamento de doenças metabólicas como a diabetes mellitus (Allen; Hittel; McPherron, 2011; Nunan et al., 2025; Sharma; Patil, 2024; Wetzlich; Nyakundi; Yang, 2025).

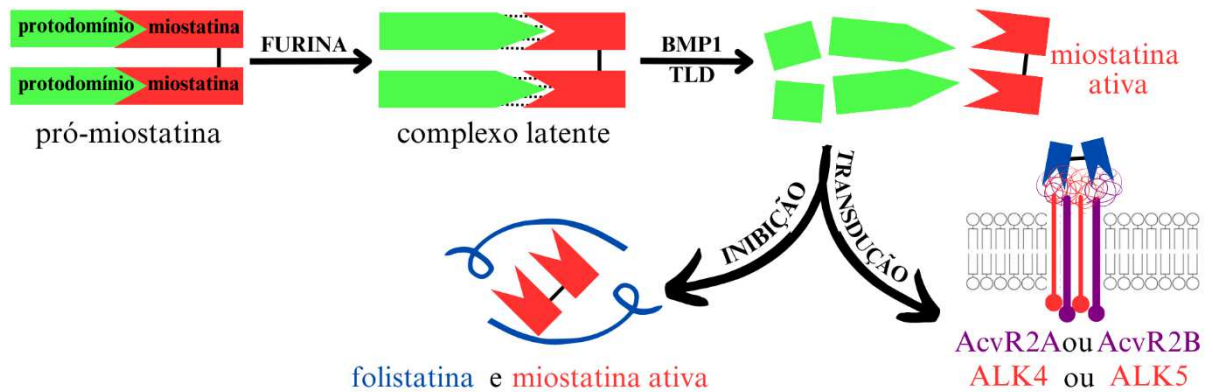
1.3 O fator de crescimento e diferenciação 8 – Miostatina

A GDF-8, também conhecida como miostatina (MSTN), é uma proteína parácrina secretada pelos miócitos e está presente na matriz extracelular ao longo de todo o tecido muscular esquelético, atuando como um regulador negativo do crescimento do músculo (Elkina et al., 2011). A MSTN foi descoberta em 1997 por McPherron e Lee (McPherron; Lee, 1997), e apresenta um sequenciamento bem conhecido e conservado, ou seja, o gene responsável pela produção dessa proteína apresentou poucas mutações ao longo do tempo, o que está associado com uma baixa variação nos peptídeos que constituem a proteína dentre as diversas espécies que a produzem em seu organismo. Ao longo dos anos, diversos estudos foram produzidos visando o desenvolvimento de moléculas que possam atuar na rota de ativação/transdução da MSTN de forma a inibi-la e conseqüentemente auxiliar desde tratamentos de doenças associadas a atrofia muscular (Hoogaars; Jaspers, 2018), ao desenvolvimento tecnológico com viagens espaciais (Hanson et al., 2023; Smith et al., 2020), ao avanço social com teste de dopagem em atletas (Walpurgis et al., 2023) e também no desenvolvimento econômico com o crescimento muscular de gado de corte (Oliveira et al., 2023) por meio da regeneração muscular.

1.3.1 Estrutura e funções

Nesse contexto, faz-se necessário discutir o que se tem relatado sobre a rota de sinalização da miostatina humana (Walker et al., 2016) e quais são os pontos em que há escassez de conhecimento. Inicialmente a MSTN é produzida e secretada para o meio extracelular em uma forma inativa, um precursor conhecido como promiostatina, a qual é clivado pela protease Furina (Chen et al., 2021) na ligação peptídica entre os resíduos R98/D99 formando uma estrutura latente, e posteriormente esse complexo é clivado pelas metaloproteinases de matriz (BMP-1/TLD) (Hopkins; Keles; Greenspan, 2007) na ligação peptídica entre os resíduos R266/D267, o que inicia a cascata de ativação e culmina na liberação da miostatina ativa (Figura 1). Após ser liberada em sua forma ativa, a miostatina pode seguir dois caminhos: (I) **Inibição endógena via folistatina:** A MSTN forma um complexo molecular com seu inibidor endógeno, folistatina (FST) (Phillips; De Kretser, 1998), na proporção 2:1 (FST:MSTN), o qual bloqueia os epítomos da MSTN e a impede de interagir com os receptores localizados no sarcolema, dessa forma bloqueando a transdução do sinal à fibra muscular (Amthor et al., 2004; Cash et al., 2009; Keutmann; Schneyer; Sidis, 2004); (II) **Transdução do sinal via receptores transmembrana:** A MSTN pode interagir com os domínios extracelulares das proteínas *Activin receptor-like kinase 4* ou *5* (ALK4/5 – receptores tipo I) (Chen et al., 2022; Mansour et al., 2024) e *Activin receptor type 2A* ou *2B* (AcvR2A/2B – receptores tipo II) (Morvan et al., 2017; Thompson; Woodruff; Jardetzky, 2003), na proporção 2:2:1 (tipo I:tipo II:MSTN) (De Winter et al., 1996). Após a interação com os receptores se inicia uma série de interações entre proteínas no meio intracelular que culminam em uma cascata de sinalização intracelular até o núcleo, e assim induz a redução do crescimento muscular, gerando atrofia muscular no indivíduo em casos de superexpressão da via (Pirruccello-Straub et al., 2018).

Figura 1 – Representação geral do processo de ativação da miostatina humana



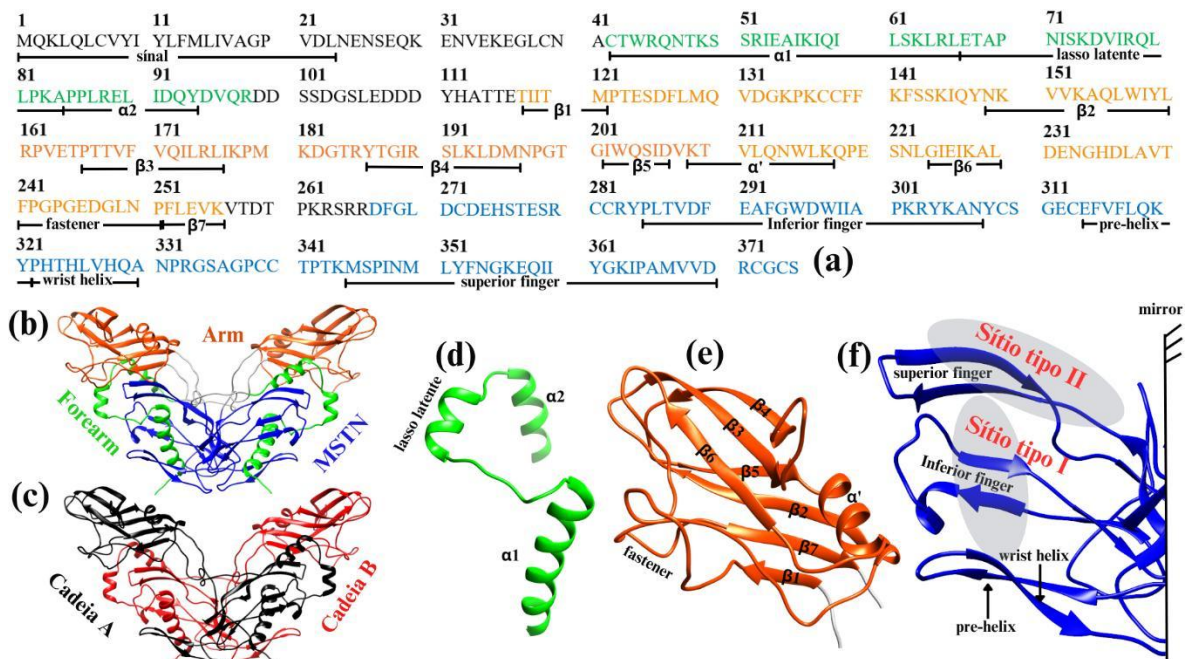
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nota: A promiostatina está representada com uma ligação covalente entre o prodomínio e a miostatina, enquanto o complexo latente apresenta apenas interações não covalentes entre esses domínios. A inibição é representada pela formação do complexo entre a miostatina livre (vermelho) e a folistatina (azul), e a transdução é representada pela interação da miostatina livre com os receptores celulares transmembrana ALK4 e AcvR2B (roxo).

Analisando o mecanismo geral discriminado na Figura 1, a primeira proteína envolvida no processo de ativação da miostatina humana é o precursor conhecido como promiostatina (Anderson; Goldberg; Whitman, 2008), conforme ilustrado na Figura 2a. A sequência primária da promiostatina é segmentada em três domínios distintos (*forearm* – verde, *arm* – laranja e *MSTN* – azul), com cada um desempenhando funções específicas na proteína. Os domínios são subdivididos em regiões menores que desempenham papéis fundamentais nas interações responsáveis por manter a miostatina inativa e ao fim da cascata compor a sua forma final e ativa. Com relação à composição, a promiostatina pode ser dividida em três regiões principais (Cotton et al., 2018): (I) *forearm* (Figuras 2b,d – verde), que interage diretamente inibindo o segmento que dará origem à estrutura ativa da miostatina (Jiang et al., 2004); (II) *arm* (Figuras 2b,e – laranja), cuja principal função é garantir que o precursor mantenha uma conformação aberta, conhecida como formato de "V"; (III) *MSTN* (Figuras 2b,f – azul), representa a região do precursor que irá compor a miostatina após o fim do processo de ativação. As regiões do *forearm* e do *arm*, em conjunto, compõem o prodomínio, cuja função é bloquear a interação da *MSTN* com seus receptores, consequentemente mantendo-a inativa (Jiang et al., 2004). Além disso, a proteína é constituída por duas cadeias (A em preto e B em vermelho,

conforme Figura 2c), conectadas por uma ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína C339A e C339B na região precursora da MSTN.

Figura 2 – Representação da sequência primária e das regiões constituintes da promiostatina humana.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2025).

Nota: (a) Sequência primária da promiostatina, com os resíduos correspondentes a cada domínio destacados: *forearm* (verde), *arm* (laranja) e MSTN (azul). As regiões do *forearm* e do *arm* formam, em conjunto, o prodomínio, enquanto a região da MSTN constitui a miostatina ativa. (b) Representação estrutural da promiostatina, a partir do aminoácido C42, em sua conformação em V. As regiões principais estão destacadas: *forearm* (verde), *arm* (laranja) e MSTN (azul). (c) Estrutura homodimérica da promiostatina, composta por duas cadeias entrelaçadas (cadeia A e B). (d) Ampliação da região do *forearm*, com ênfase em suas sub-regiões: α1 (C42 – L66), lasso latente (L67 – A84) e α2 (P85 – Y94). (e) Ampliação da região do *arm*, destacando suas sub-regiões: β1 (T117 – M121), β2 (N149 – L160), β3 (T167 – I177), β4 (Y186 – M196), β5 (I202 – D207), α' (K209 – K217), β6 (G224 – L230), *fastener* (F241 – P251) e β7 (F252 – K256). (f) Ampliação do domínio MSTN, com ênfase nas sub-regiões: *inferior finger* (P285 – N307), pré-hélice (E314 – Y321), *wrist helix* (P322 – A330) e *superior finger* (M345 – D370).

As Figuras 2d-f apresentam a subestrutura isolada de cada uma das três regiões da promiostatina (Cotton et al., 2018). Em relação ao *forearm* (Figura 2d), a região é constituída por 57 aminoácidos, com três subdomínios: α1, que bloqueia o sítio de interação da MSTN com o domínio extracelular do receptor transmembrana ALK4/5 (sítio tipo I); o lasso latente, que conecta as regiões α1 e α2; e a região α2,

que bloqueia o sítio de interação da MSTN com o domínio extracelular do receptor AcvR2A/2B (sítio tipo II). Quanto a região do *arm* (Figura 2e), são observados 140 aminoácidos, os quais adotam uma conformação globular com nove sub-regiões: $\beta 1$, interage com a região $\alpha 2$ do *forearm* e com o *superior finger* da MSTN; $\beta 2 - \beta 6$ e α' fornecem um suporte estrutural; o *fastener* interage com o lasso latente no *forearm*; e o $\beta 7$ que forma uma extensa rede de contatos com o $\beta 1$ de forma a manter essa região em uma conformação adequada para interagir com o *superior finger*. Por fim, o domínio da MSTN (Figura 2f) é composto por 109 resíduos, com quatro sub-regiões: o *inferior finger*, que corresponde ao provável sítio do tipo I; a região pré-hélice/*wrist* hélice, que sofre uma transição de folha β para α hélice durante a ativação, permitindo que a proteína adquira sua forma ativa; e o *superior finger*, o qual é associado como o provável sítio de interação do tipo II. Para mais detalhes sobre os sítios de ligação do tipo I e II da MSTN, consulte o apêndice A. Além disso, é importante ressaltar que a estrutura da promiostatina é um dímero simétrico, de forma que todos os domínios supracitados estão presentes em ambas as cadeias da proteína.

1.3.2 Inibidores endógenos

Após a liberação da MSTN ativa no meio extracelular, a proteína pode ser inibida por diversos receptores endógenos que atuam bloqueando a interação com os receptores transmembranas e conseqüentemente a propagação do sinal. Dentre esses receptores tem-se conhecido a folistatina (FST), Folistatina tipo 3 (FSLT3), fator de crescimento e diferenciação associado a proteína sérica -1 e -2 (respectivamente, GASP-1 e GASP-2), a decorina, dentre outros (Amthor et al., 2004; Keutmann; Schneyer; Sidis, 2004; Phillips; De Kretser, 1998). Os inibidores endógenos das MSTN atuam de forma similar, na qual as proteínas complexam com a MSTN livre de forma a impedir com que haja interação com o receptor transmembrana, ou seja, os inibidores endógenos são proteínas que competem na interação com os receptores AcvR2A/2B e ALK4/5.

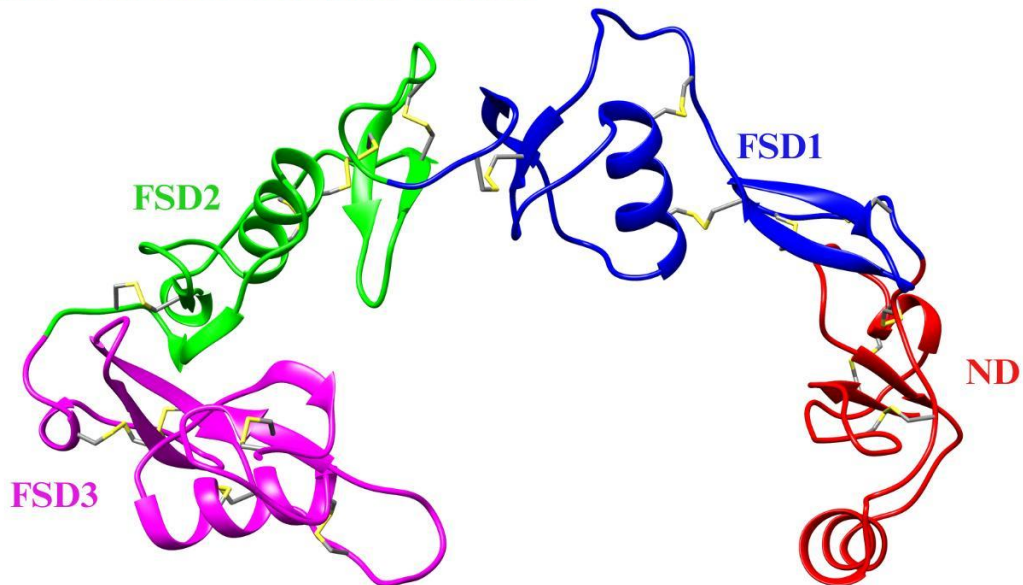
Dentre os inibidores endógenos a FST é a proteína principal associada ao bloqueio da transdução da MSTN. Tendo isso em vista, focando na FST, sabe-se que essa proteína apresenta diversas funções no organismo sendo uma das mais

observadas a ação de antagonizar os membros da superfamília TGF- β , dentre elas a miostatina (Amthor et al., 2004). Em humanos a folistatina apresenta duas isoformas principais com 315 (FST315) e 288 (FST288) resíduos, sendo a principal diferença entre essas isoformas, a ausência da região C-terminal ácida na isoforma FST288, o que aumenta a afinidade da isoforma FST288 pela heparina (Phillips; De Kretser, 1998). Diversos estudos relatam que a FST288 apresenta maior afinidade pela MSTN do que a outra isoforma (Amthor et al., 2004; Cash et al., 2009; Lerch et al., 2007; Phillips; De Kretser, 1998), sendo assim, no presente trabalho será abordado apenas a interação da isoforma FST288 com a MSTN. Quanto a estrutura da FST288, a partir de agora referenciada apenas como FST, a proteína é dividida em quatro regiões principais, sendo elas o domínio N-terminal (*N-terminal domain* – ND) e três domínios folistatina (*follistatin domain* – FSD1/2/3) (Figura 3). Além disso, a FST é rica em pontes dissulfeto, totalizando 18 ligações dissulfeto, sendo cinco em cada domínio FSD e três no domínio ND, as quais atuam mantendo o arranjo terciário da FST adequado para complexar com a MSTN e bloquear os seus sítios ativos.

Em relação a formação do complexo MSTN – FST, sabe-se que a MSTN interage para formar um complexo com duas moléculas da FST, de forma que há um bloqueio completo dos epítomos ativos da MSTN e um bloqueio da interação com os receptores transmembrana (Cash et al., 2009). O modo de inibição da folistatina, se baseia no bloqueio estérico do sítio tipo I e II da MSTN pelos domínios ND e FSD2, respectivamente (Keutmann; Schneyer; Sidis, 2004) da FST. Cada domínio do inibidor atua formando uma rede de contatos com a MSTN de forma a estabilizar o complexo e impedir que interaja com os receptores de activina na membrana celular. Sendo assim, a interação com esse inibidor endógeno pode ser usada como uma referência para o modo natural em que a MSTN é inibida e com isso auxiliar no desenvolvimento de drogas que mimetizem essas interações de forma a bloquear a interação com os receptores.

Figura 3 – Representação da sequência primária e da estrutura da FST288 humana.

	10	20	30	40	50	60	70
MVRARHQPGG	LCLLLLLLQ	FMEDRSAQAG	NCWLRQAKNG	RCQVLYKTEL	SKEECCSTGR	LSTSWTEEDV	
80	90	100	110	120	130	140	
NDNTLFKWMI	FNGGAPNCIP	CKETCENVDC	GPGKKCRMNK	KNKPRVCVAP	DCSNITWKGP	VCGLDGKTYR	
150	160	170	180	190	200	210	
NECALLKARC	KEQPELEVQY	QGRCKKTCRD	VFCPGSSTCV	VDQINNAVCV	TCNRICPEPA	SSEQYLCGND	
220	230	240	250	260	270	280	
GVTYSSACHL	RKATCLLGRS	IGLAYEGKCI	KAKSCEDIQC	TGGKKCLWDF	KVGRGRCSLC	DELCPDSKSD	
290	300	310	317				
EPVCASDNAT	YASECAMKEA	ACSSGVLLÉV	KHSGSCN				



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Sequência primária e estrutura da folistatina humana construída a partir do PDB 3HH2 – cadeia C. Em amarelo está destacado o domínio N-terminal (ND), em azul o domínio folistatina 1 (FSD1), em verde o domínio folistatina 2 (FSD2), em roxo o domínio folistatina 3 (FSD3).

1.3.3 Transdução e propagação do sinal

Como foi discutido anteriormente, após a perda da interação com a região N-terminal (prodomínio) e a liberação da MSTN ativa, espera-se que ocorra a transdução do sinal para a célula muscular. Ou seja, a miostatina deve interagir com os domínios extracelulares dos receptores transmembrana para iniciar uma cascata de reações e interações intracelulares de forma a progredir em uma interação com o DNA e assim induzir a redução da produção de fibras musculares (Baig et al., 2022; Bonniou; Carnac; Vernus, 2007; Elkina et al., 2011; Han et al., 2013; Lee et al., 2012). Focando na interação da MSTN com seus receptores, até o presente momento tem-se conhecimento que os principais receptores que interagem com a MSTN para propagar

esses sinais são o AcvR2B e o ALK4/5, no entanto a interação pode ocorrer, com menor afinidade, com a AcvR2A ao invés da AcvR2B (Morvan et al., 2017). Como foi mencionado anteriormente a interação com os receptores ocorre na proporção 1:2:2 (MSTN:AcvR2B:ALK4/5), de forma que a MSTN interage com os domínios extracelulares dos receptores de activina formando um complexo não covalente estável. A partir da formação desse complexo, os domínios intracelulares se rearranjam em um posicionamento adequado para interagirem e assim propagar o sinal no meio intracelular, via mecanismo de sinalização SMAD, FOXO, dentre outros (Lee et al., 2012).

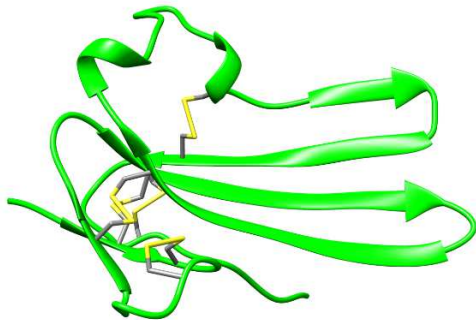
Em relação a estrutura e composição dos receptores de activina que interagem com a miostatina para transduzir o sinal para o meio intracelular, são observadas características similares entre essas proteínas. Todos os receptores apresentam um domínio extracelular concavo, o qual apresenta 3 – 5 folhas beta que auxiliam na interação com os sítios da MSTN (Figura 4), um domínio α -hélice transmembrana e um domínio quinase intracelular. De forma mais específica a proteína AcvR2A/2B interage com o sítio convexo da MSTN (sítio tipo II) e a ALK4/5 interage com o sítio concavo da MSTN (sítio tipo I) (ver Figura 2 para mais detalhes). Dessa forma, tendo em vista que a interação da miostatina ocorre somente com os domínios extracelulares dos receptores, a Figura 4 mostra a sequência primária e a terciária dos domínios extracelulares das proteínas AcvR2A, AcvR2B, ALK4 e ALK5.

Ao comparar a sequência primária e as estruturas terciárias dos receptores de activina, nota-se uma alta similaridade entre as proteínas do tipo I (ALK4 e ALK5) e entre as proteínas do tipo II (AcvR2A e AcvR2B). Além disso, nota-se que todos os possíveis receptores possuem 5 ligações dissulfeto entre as fitas para estabilizar a sua estrutura terciária (Figura 4). Dessa forma, espera-se que a interação desses receptores com a MSTN seja similar, com exceção para interação da AcvR2A com a MSTN.

Figura 4 – Representação da sequência primária e da estrutura terciária para as proteínas AcvR2A, AcvR2B, ALK4 e ALK5.

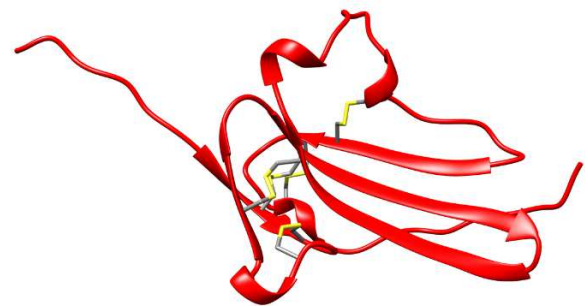
(a) ALK5

10	20	30
MEAAVAAPRP	RLLLLVLAAA	AAAAAALLPG
40	50	60
ATALQCFCHL	CTKDNFTCVT	DGLCFVSVTE
70	80	90
TTDKVIHNSM	CIAEIDLIPR	DRPFVCA PSS
100	110	120
KTGSVTTTYC	CNQDHCNKIE	LPTTVKSSPG



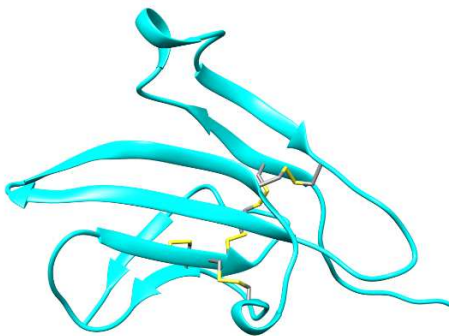
(b) ALK4

10	20	30
MAESAGASSF	FPLVVLLLAG	SGGSGPRGVQ
40	50	60
ALLCACTSCL	QANYTCETDG	ACMVSIFNLD
70	80	90
GMEHHVRTCI	PKVELVPAGK	PFYCLSSIDL
100	110	120
RNTHCCYTDY	CNRIDLRVPS	GHLKEPEHPS



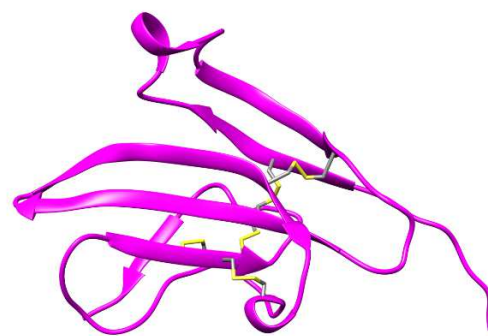
(c) AcvR2A

10	20	30
MGAAAKLAFA	VFLISCSSGA	ILGRSETQEC
40	50	60
LFFNANWEKD	RTNQTGVEPC	YGDKDKRRHC
70	80	90
FATWKNISGS	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD
100	110	120
CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFPEM



(d) AcvR2B

10	20	30
MTAPWVALAL	LWGSLCAGSG	RGEAETRECI
40	50	60
YNNANWELER	TNQSLGERCE	GEQDKRLHCY
70	80	90
ASWRNSSGTI	ELVKKGCWLD	DFNCYDRQEC
100	110	120
VATEENPQVY	FCCCEGNFCN	ERFTHLPEAG



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Estrutura dos domínios extracelulares das proteínas ALK5 (a), ALK4 (b), AcvR2A (c), AcvR2B (d). As sequências primárias de cada proteína estão coloridas de acordo com a estrutura terciária de cada proteína. Os resíduos M1 – T32, M1 – G23, M1 – G19 e M1 – G18 são referentes aos peptídeos sinais das proteínas ALK5, ALK4, AcvR2A e AcvR2B, respectivamente. Os demais resíduos em preto em cada cadeia são referentes à região de coil flexível antes de iniciar a hélice transmembrana.

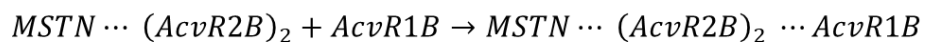
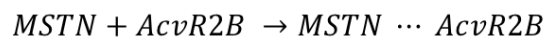
Quanto ao processo de interação da MSTN com os receptores, a Figura 5 apresenta o mecanismo mais aceito para a transdução do sinal da via de sinalização

da MSTN humana (Elkina et al., 2011). Inicialmente a miostatina se aproxima do domínio extracelular de um receptor de activina tipo II, mais comumente a AcvR2B, o qual interage com sítio tipo II da MSTN (Figura 2f) e, devido a simetria da MSTN, essa interação também ocorre no sítio tipo II da outra cadeia, o qual interage com outra AcvR2B, formando o complexo MSTN – AcvR2B₂. Após a formação desse complexo, ocorre a interação com outro receptor de activina, agora do tipo I, comumente ALK4 ou ALK5, que interage com o sítio tipo I da miostatina (Figura 2f) e, similarmente a AcvR2B, ocorre a interação com outra molécula dessa proteína, formando por fim o complexo molecular MSTN – AcvR2B₂ – ALK4/5₂. A formação desse complexo molecular estabiliza as proteínas AcvR2B e ALK4/5 próximas umas das outras de forma que os seus domínios intracelulares possam interagir e a sinalização celular da via de ação da MSTN inicie-se. Com isso, vale destacar que a interação da MSTN com as proteínas transmembranas ocorre somente com os domínios extracelulares, de forma que não é esperado que a região transmembrana e intracelular dos receptores afete a estabilidade da interação com a miostatina.

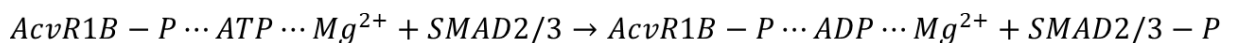
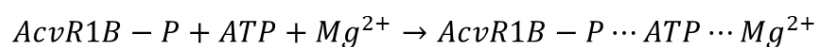
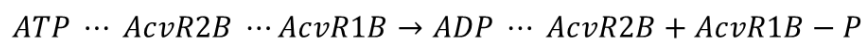
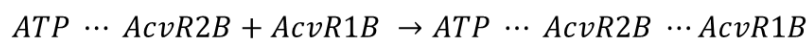
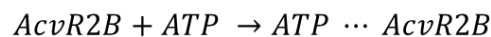
Figura 5 – Mecanismo de transdução do sinal da via de sinalização da Miostatina humana.

Mecanismo de ação

Extracelular



Intracelular



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Mecanismo geral para o processo de transdução do sinal da MSTN. Em destaque estão as proteínas AcvR2B, ALK4 (AcvR1B) e SMAD.

Continuando a progressão da transdução do sinal da MSTN para o meio intracelular, a Figura 5 mostra o mecanismo intracelular proposto após a formação do complexo MSTN – AcvR2B₂ – ALK4/5₂. A priori, a AcvR2B recruta uma molécula de ATP do meio intracelular tornando-a ativa e permitindo que interaja com a ALK4/5 de forma a fosforilar o domínio GS da activina tipo I, e assim obtendo a ALK4/5 – P e a liberação de um ADP. Após a fosforilação da ALK4/5, o sítio ativo da proteína se abre para interagir com a SMAD2/3 e com isso recruta uma molécula de ATP para fosforilar a região C-terminal da SMAD2/3. Por fim, a proteína SMAD2/3 fosforilada é liberada no meio intracelular, onde forma um heterodímero com a proteína SMAD4 e a cascata de interações progride até resultar em interações no DNA que sinalizarão a célula a redução da produção de fibras musculares.

Sendo assim é importante ressaltar o papel crucial da miostatina em ordenar os receptores de activina de forma que os seus domínios intracelulares possam interagir e propagar o sinal da via. Além disso, essas diversas etapas necessárias para o bom funcionamento da via evidenciam que há diversas possibilidades de ação de inibidores para esse sistema, sendo eles alvo da interação MSTN – receptores ou dos próprios receptores isolados impedindo a fosforilação do SMAD2/3.

1.4 Inibidores propostos para a Miostatina e seus receptores

Nas últimas décadas, a MSTN tem se destacado como um alvo promissor para o tratamento de doenças associadas à atrofia muscular, levando a um aumento significativo no número de estudos voltados para o desenvolvimento de inibidores dessa proteína (Abati et al., 2022; Ahmad et al., 2021; Ali et al., 2022; Baig et al., 2022; Jiang et al., 2004; Nagy-Fazekas et al., 2023a; Rentier et al., 2019; Saitoh et al., 2020; Takayama et al., 2022). As pesquisas experimentais nessa área têm se concentrado na avaliação de inibidores reversíveis da via de ativação da MSTN humana. Os trabalhos de Baig e colaboradores (Baig et al., 2022) e Abati e colaboradores (Abati et al., 2022), discutem uma revisão dos principais tipos de inibidores para a MSTN que estão sendo testados atualmente. Dentre as estratégias de fármacos testados têm-se os produtos naturais (ex: Epicatequina – fase I/IIa de testes clínicos)(Gutierrez-

Salmean et al., 2014), anticorpos (ex: Bimagrumab – fase II de testes clínicos)(Kanbay et al., 2024) e os polipeptídeos (ex: MYO-29 – fase I/II testes clínicos)(Wagner et al., 2008). Com isso, tendo em vista a ampla variedade de moléculas que são testadas como inibidoras dessa via, nota-se que atualmente não há uma solidez no conhecimento de como pode ser feita a inibição da MSTN. Dessa forma, destaca-se a necessidade de novos estudos acerca do funcionamento dessa via, em vista de auxiliar no desenvolvimento de drogas mais eficazes. No entanto, apesar de haver diversas moléculas sendo testadas como possíveis inibidores, as moléculas baseadas em peptídeos e os anticorpos se destacam como os mais efetivos na ação antagônica dessa via.

Atualmente poucos estudos teóricos têm explorado os mecanismos associados com a sinalização da MSTN (Ahmad et al., 2021; Ali et al., 2022; Nagy-Fazekas et al., 2023b). A maior parte dos estudos se baseiam em simulações de dinâmica molecular (DM) para investigar os principais modos de interação dos potenciais inibidores com o alvo na forma livre da MSTN. Ahmad e colaboradores (Ahmad et al., 2021) realizaram uma busca entre 2.000 produtos naturais como possíveis inibidores da MSTN livre usando ancoragem molecular e DM. O trabalho em questão identificou a ditimoquinona como um composto promissor, capaz de impedir a formação do complexo MSTN - AcvR2B por meio do bloqueio do sítio II da MSTN, impedindo a interação com o domínio extracelular da AcvR2B. No estudo de Nagy-Fazekas e colaboradores (Nagy-Fazekas et al., 2023a) foram empregadas técnicas computacionais similares, no entanto os testes foram feitos com peptídeos (pequenas moléculas derivadas da região $\alpha 1$ do *forearm*) com alvo na MSTN livre. Os resultados indicam que esses pequenos peptídeos podem ser usados como inibidores pois derivam de regiões do *forearm* que naturalmente bloqueiam a atividade da GDF-8.

Ao analisar os trabalhos experimentais e teóricos acerca de possíveis inibidores da miostatina, observa-se que as abordagens em questão não levam em conta a complexa cascata bioquímica que a GDF-8 sofre no seu processo de ativação no meio extracelular. Dessa forma, o trabalho em questão tem por objetivo entender as interações químicas entre o prodomínio e a MSTN ao longo de cada etapa do processo de ativação até a liberação da miostatina em sua forma ativa. Com isso, simulações de DM foram empregadas para as proteínas envolvidas no processo de ativação da MSTN de forma a identificar os aminoácidos do prodomínio que

frequentemente interagem com a MSTN com o objetivo de identificar as regiões chave, e os aminoácidos que as constituem, de forma a manter a MSTN inativa. Dessa forma será possível identificar os principais tipos de interação que uma droga deve ser capaz de realizar para efetivamente interagir com os epítomos da MSTN (tipo I e II). Para isso será avaliado as interações intra e intermoleculares entre os aminoácidos que contribuem para a estabilidade dos complexos inativos que são observados no processo de ativação, para o processo de inibição endógena via folistatina e para o processo de transdução do sinal via interação com os domínios extracelulares dos receptores de activina. Com isso, os resultados podem ser usados para pavimentar uma nova rota de design de novos e mais efetivos inibidores reversíveis da MSTN.

2 OBJETIVOS

Avaliar, com auxílio de métodos computacionais, os processos moleculares associados à ativação, inibição natural e transdução da miostatina humana.

2.1 Objetivos específicos:

I. Selecionar as estruturas cristalográficas a serem utilizadas como representação da miostatina humana, suas formas latentes, a folistatina, e os domínios extracelulares dos receptores ALK4, ALK5, AcvR2B e AcvR2A.

II. Construir os peptídeos ausentes nos arquivos PDB de acordo com o sequenciamento de cada estrutura.

III. Realizar simulações de DM das proteínas associadas ao processo de ativação e transdução da MSTN.

IV. Interpretar os dados obtidos nas simulações e definir sequências de aminoácidos relevantes para a estabilidade dos complexos.

V. Elaborar e apresentar os resultados obtidos no estudo em eventos e artigos científicos.

3 METODOLOGIA

Na seguinte seção serão apresentados todos os protocolos empregados ao longo do desenvolvimento do projeto, desde a seleção das estruturas como base para a modelagem ao protocolo final de simulações. Em relação aos programas e processos empregados, em caso de algum detalhe da execução não estar explicitamente descrito considere que o procedimento foi realizado de acordo com o padrão descrito do manual do respectivo software.

3.1. Seleção das estruturas cristalográficas

Todas as estruturas mencionadas nos objetivos foram selecionadas e avaliadas por meio do seu sequenciamento disponível no banco de dados Uniprot (Bateman et al., 2023), e as suas estruturas terciárias foram obtidas no banco de dados *Protein Data Bank* (Berman et al., 2000).

3.1.1 Seleção da miostatina e seus precursores

Em vista de definir as estruturas das proteínas que serão estudadas, primeiramente avaliou-se a disponibilidade no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank* – PDB)(Berman et al., 2000) e então definiu-se os modelos a serem construídos. Para a via de ativação da miostatina têm-se as estruturas da promiostatina e da MSTN ativa, enquanto para a inibição endógena há a estrutura da FST e para a transdução do sinal há as estruturas dos domínios extracelulares das proteínas ALK4/5 e AcvR2B/2A. Primeiramente avaliou-se as estruturas disponíveis para a promiostatina e seus derivados no processo de ativação, com isso observou-se cinco estruturas disponíveis para a proteína humana. As estruturas disponíveis são 5NTU – cadeias A/B (resolução de 2,58 Å) (Cotton et al., 2018), 6UMX – cadeias A/B (resolução 2,79 Å) (Dagbay et al., 2020), 5NXS – cadeias A/B (resolução 4,19 Å) (Cotton et al., 2018), 5F3B – cadeias C/D (resolução 1,76 Å) (Apgar et al., 2016) e 5F3H – cadeias I/J/K/L (resolução 2,70 Å) (Apgar et al., 2016). Para mais detalhes acerca dessas estruturas veja o Apêndice B.

Em relação as estruturas disponíveis, a 5F3B e 5F3H consistem das formas ativas da MSTN, enquanto as demais estruturas cristalográficas correspondem a

estrutura da promiostatina. Dessa forma a escolha da estrutura a ser usada como base do trabalho, a qual irá originar os demais intermediários do processo de ativação, se deu entre a 5NTU, 5NXS e 6UMX. Em vista de obter a melhor representação para a proteína precursora, avaliou-se a resolução da estrutura cristalográfica e a existência de regiões com ausência de aminoácidos. A Tabela 1 mostra a comparação entre as estruturas disponíveis para a proteína precursora, em relação a sequência de aminoácidos previstos para a miostatina humana (sequenciamento disponível no Uniprot: O14793) (Bateman et al., 2023). Analisando os dados disponíveis na Tabela 1, o PDB 5NTU destaca-se por apresentar a melhor resolução, ou seja, uma melhor precisão na identificação dos átomos, um menor número de lacunas e de resíduos ausentes. Em relação ao número de lacunas e a ausência de aminoácidos, o 5NTU também se destaca ao apresentar a estrutura mais conservada e com o menor número de resíduos ausentes se comparado com o previsto (Figura 2a).

Tabela 1 – Propriedades das estruturas disponíveis no PDB para a proteína precursora da miostatina humana.

PDB	Resolução / Å	Nº de lacunas	Nº de resíduos ausentes
5NTU	2,58	9	121
5NXS	4,19	13	161
6UMX	2,79	10	159

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: As resoluções das estruturas foram obtidas no PDB. O número de lacunas é referente a quantidade total de regiões que estão ausentes na estrutura da proteína. O número de resíduos ausentes é referente a diferença entre os aminoácidos presentes na estrutura do PDB e os aminoácidos previstos no sequenciamento proteico presente no banco Uniprot (O14793).

Dessa forma, escolheu-se o PDB 5NTU como base para a modelagem da estrutura completa da promiostatina e dos demais intermediários até a liberação da miostatina ativa. Quanto a estrutura da MSTN ativa, estão disponíveis os PDBs 5F3B e 5F3H (apêndice B) referente a forma ativa da MSTN humana, no entanto suas estruturas cristalográficas apresentam algumas lacunas. Com isso, devido à alta conservação do sequenciamento proteico da MSTN entre os animais, buscou-se outras estruturas cristalográficas para representá-la, as quais apresentassem um sequenciamento completo. Nesse ponto, destacou-se o PDB 3HH2 (Cash et al., 2009), que consiste na estrutura da MSTN ativa de camundongos complexada com a

folistatina humana. Ao comparar a sequência de aminoácidos da MSTN humana com a do camundongo, têm-se que as proteínas apresentam 100% de identidade. Dessa forma, optou-se por usar a estrutura cristalográfica da 3HH2 para representar a forma ativa da MSTN.

3.1.2 Seleção da folistatina

Similarmente ao processo de seleção empregado para a escolha do modelo da miostatina, buscou-se as estruturas cristalográficas disponíveis no PDB para a folistatina humana. Pode-se notar que estão presentes quatro estruturas. 2B0U – cadeias C/D (resolução 2,80 Å) (Thompson et al., 2005), 2P6A – cadeias C/D (resolução 3,40 Å) (Lerch et al., 2007), 3HH2 – cadeias C/D (resolução 2,15 Å), 5JHW – cadeias C/D (resolução 2,35 Å) (Walker et al., 2017). Em relação as estruturas disponíveis, todas estão interagindo com membros da família das GDFs. No entanto, optou-se diretamente em utilizar o modelo 3HH2 pois o PDB apresenta a melhor resolução, e assim como foi discutido no tópico 3.1.1 a folistatina nesse arquivo PDB foi cristalizada interagindo diretamente com a forma ativa da MSTN. Com isso, a partir desse modelo é possível construir diretamente o complexo MSTN – FST₂ baseado em um arranjo observado experimentalmente.

Quanto ao modelo em questão é necessário compará-lo com o esperado no sequenciamento disponível no Uniprot (P19833-2). Em relação ao sequenciamento esperado para a FST (Figura 3), o PDB 3HH2 apresenta 2 gaps na cadeia C e 3 gaps na cadeia D. Quanto a cadeia C esses gaps estão localizados respectivamente nos domínios FDS2 (P199 – E203) e FDS3 (D276 – E281), enquanto a cadeia D os gaps estão localizados nos domínios ND (K110 – N112), FDS2 (P199 – S202) e FDS3 (D276 – E281). Nota-se que a região ausente no domínio ND da cadeia D está presente na cadeia C, de forma que a modelagem das regiões ausentes pode ser feita por comparação entre as cadeias e a sequência do Uniprot.

3.1.3 Seleção das proteínas ALK4, ALK5, AcvR2A e AcvR2B

Assim como as demais estruturas proteicas, avaliou-se a disponibilidades de estruturas cristalográficas para os domínios extracelulares dos principais receptores da MSTN livre. Sendo assim, buscou-se estruturas para as proteínas do sítio tipo I da

MSTN (ALK4 e ALK5) e do sítio tipo II (AcvR2A e AcvR2B). Além disso, vale ressaltar que no presente estudo têm-se por objetivo avaliar apenas a interação da forma livre (ativa) da MSTN com os domínios extracelulares das proteínas transmembranas, sem a presença do sarcolema ou dos domínios transmembrana e intracelular. Dessa forma a escolha das estruturas cristalográficas, a serem usadas como base na modelagem de cada proteína, levou-se em conta esses fatores.

A Tabela 2 apresenta todas as estruturas disponíveis para as proteínas ALK4, ALK5, AcvR2A e AcvR2B. Em relação a AcvR2A foram encontradas cinco estruturas cristalográficas, no entanto apenas as estruturas 5NH3 e 7U5P são referentes ao domínio extracelular do receptor. Sendo assim é necessário comparar as estruturas com objetivo de definir o melhor modelo para construir a região extracelular do receptor AcvR2A. Entre os modelos observam-se que ambas as estruturas apresentam um sequenciamento similar, com o PDB 5NH3 apresentando a sequência S25 – E119 e o PDB 7U5P a sequência T27 – M120. Com isso, foi escolhido o PDB 5NH3 a ser usado como base na construção do modelo da AcvR2A, pois essa estrutura apresenta a melhor resolução e compreende uma maior região da proteína. Quanto a proteína AcvR2B, foram encontradas oito estruturas cristalográficas e uma de RMN, sendo que apenas a estrutura 2QLU é referente ao domínio intracelular. Em vista disso, a seleção para referência de construção do receptor AcvR2B foi realizada por meio da comparação entre as estruturas dos PDBs 5NGV e 7MRZ, pois o primeiro foi obtido juntamente com o 5NH3 (Morvan et al., 2017) e o segundo a AcvR2B está cristalizada em conjunto com as proteínas GDF-11 e ALK4, de forma que é possível observar a conformação esperada para o complexo MSTN – AcvR2B₂ – ALK4₂.

Tabela 2 – Estruturas cristalográficas para os receptores ALK4, ALK5, AcvR2B e AcvR2A.

Código PDB	Cadeia	Resolução	Referência
AcvR2A			
3Q4T	A/B	1,96	(Horbelt et al., 2015)
3SOC	A/B	1,95	Ainda não publicado
4ASX	A/B	2,05	Ainda não publicado
5NH3	A/B	2,35	(Morvan et al., 2017)
7U5P	A/C/E/G	3,14	(Chu et al., 2022)

AcvR2B			
2H62	D	1,85	(Weber et al., 2007)
2QLU	A	2,00	(Han et al., 2007)
4FAO	E/F/K/L/Q/R/W/X/e/f/k/l	3,36	(Townson et al., 2012)
5NGV	A	2,00	(Morvan et al., 2017)
5NHR	C/D	3,35	(Morvan et al., 2017)
7MRZ	C	3,00	(Goebel et al., 2022)
7OLY	C	3,27	(Goebel et al., 2022)
9D20	A/C	2,67	(Antfolk et al., 2025)
9N4K*	A/D	3,20	(Goebel et al., 2025)
ALK4			
7MRZ	C	3,00	(Goebel et al., 2022)
7OLY	K	3,27	(Goebel et al., 2022)
ALK5			
1B6C	B/D/F/H	2,60	(Huse et al., 1999)
1IAS	A/B/C/D/E	2,90	(Huse et al., 2001)
1PY5	A	2,30	(Sawyer et al., 2004)
1RW8	A	2,40	(Sawyer et al., 2004)
1VJY	A	2,00	(Gellibert et al., 2004)
2L5S**	A	-	(Zuniga et al., 2011)
2PJY	C	3,00	(Groppe et al., 2008)
2WOT	A	1,85	(Goldberg et al., 2009)
2WOU	A	2,30	(Goldberg et al., 2009)
2X7O	A/B/C/D/E	3,70	(Roth et al., 2010)
3FAA	A/B/C/D/E	3,35	(Bonafoux et al., 2009)
3GXL	A	1,80	(Gellibert et al., 2009)
3HMM	A	1,70	(Gellibert et al., 2009)
3KCF	A/B/C/D/E	2,80	(Guckian et al., 2010)
3KFD	I/J/K/L	3,00	(Radaev et al., 2010)
3TZM	A	1,70	(Ogunjimi et al., 2012)
4X0M	A	1,68	(Czodrowski et al., 2014)
4X2F	A	1,49	(Czodrowski et al., 2014)
4X2G	A	1,51	(Czodrowski et al., 2014)

4X2J	A	1,69	(Czodrowski et al., 2014)
4X2K	A	1,69	(Czodrowski et al., 2014)
4X2N	A	1,80	(Czodrowski et al., 2014)
5E8S	A	1,45	(Tebben et al., 2016)
5E8T	A	1,70	(Tebben et al., 2016)
5E8U	A	2,03	(Tebben et al., 2016)
5E8W	A	1,86	(Tebben et al., 2016)
5E8X	A	1,45	(Tebben et al., 2016)
5E8Z	A	1,51	(Tebben et al., 2016)
5E90	A	2,05	(Tebben et al., 2016)
5FRI	A	2,00	(Goldberg et al., 2016)
5QIK	A	1,58	(Zhang et al., 2018)
5QIL	A	1,98	(Zhang et al., 2018)
5QIM	A	1,75	(Zhang et al., 2018)
5QTZ	A	1,83	(Velaparthi et al., 2020)
5QU0	A	1,67	(Velaparthi et al., 2020)
5USQ	A	2,55	(Sabat et al., 2017)
6B8Y	A	1,65	(Harikrishnan et al., 2018)
6MAC	K	2,34	(Goebel et al., 2019)
8YHF	A	1,40	Ainda não publicado
8YHL	A	1,47	Ainda não publicado
9B9F	C/H	3,00	(Wieteska et al., 2025)
9F6X	A	2,68	(Rodriguez Buitrago et al., 2024)
9FK5*	C	4,10	(Wieteska et al., 2025)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Todas as resoluções estão em angstroms. Todas as estruturas foram obtidas por meio da técnica de difração de raios X, com exceção das estruturas marcadas com “*” que foram obtidas por RMN, e “***” que foram obtidas por microscopia eletrônica.

Em relação as estruturas disponíveis para os receptores do tipo I, a ALK4 apresenta apenas duas estruturas cristalográficas enquanto a ALK5 apresenta 44 estruturas. Quanto a ALK4, são observados apenas os PDBs 7MRZ e 7OLY os quais foram obtidos no mesmo trabalho (Goebel et al., 2022). Ambos apresentam a estrutura cristalográfica da ALK4 complexada em conjunto com a AcvR2B, logo foi escolhido o

PDB 7MRZ para ser usado como referência pois possui a melhor resolução e além da AcvR2B no complexo, está a GDF-11 que apresenta estrutura e função similar a MSTN. Por fim, em relação a ALK5 há uma ampla gama de estruturas cristalográficas, no entanto apenas as estruturas 2L5S, 2PJY, 3KFD, 6MAC, 9B9F e 9FK5 são referentes a região extracelular da ALK5. Comparando essas estruturas, os PDB 2L5S e 9FK5 foram obtidos, respectivamente, por RMN e microscopia eletrônica, enquanto os demais foram obtidos por espectroscopia de Raios X. Sendo assim, como todas as estruturas compreendem regiões similares do domínio extracelular da ALK5, optou-se por utilizar como base a estrutura 6MAC pois apresenta a melhor resolução e a proteína está complexada com a GDF-11 e com a AcvR2B de ratazana (*rattus norvegicus*), de forma que o complexo pode se comparado com o arranjo do complexo formado com a proteína humana.

3.2 Modelagem das proteínas

Todas as proteínas foram modeladas com auxílio do software modeller (Webb; Sali, 2016) por meio da comparação entre as estruturas cristalográficas selecionadas na etapa 3.1 e o sequenciamento completo conhecido para cada proteína. Além disso, quando possível, os complexos formados entre a MSTN e seus receptores e inibidor foram modelados usando como referência as estruturas interagindo com a GDF-11.

3.2.1 Modelagem da miostatina e seus precursores

Tendo em vista o precursor inicial da miostatina, a promiostatina foi utilizada como referência para a construção das demais estruturas associadas ao processo de ativação da miostatina. Dessa forma, a promiostatina foi modelada e usada como a referência para esse trabalho. A estrutura proteica do precursor foi construída a partir do PDB 5NTU, e da sequência primária obtida no Uniprot (código: O14793). A estrutura cristalográfica escolhida como referência apresenta algumas descontinuidades em sua composição, sendo essas associadas a região do *arm* (entre a folha $\beta 1$ e $\beta 2$), nos sítios de clivagem da Furina e da metaloprotease de matriz, na região N – terminal inicial do *forearm* e na região formadora da MSTN (pré-hélice e na *wrist* – hélice), como pode ser visto no Apêndice C – Figura a. Com exceção da região associada a formação da MSTN, os resíduos faltantes correspondem a

domínios sem estrutura secundária definida (folha beta ou alfa hélice). Sendo assim, a estrutura do PDB 5NTU foi alinhada com a sequência primária disponível no Uniprot e o modelo completo tridimensional da promiostatina foi construído com auxílio do software Modeller (Webb; Sali, 2016) disponível no programa USCF Chimera (Pettersen et al., 2004).

Dessa forma foi construído um primeiro modelo da promiostatina, no qual com o PDB 5NTU e o alinhamento com a sequência primária obteve-se o dímero completo da promiostatina (M24 – S375) sem o peptídeo sinal (ver Apêndice C – Figura b). A partir do primeiro modelo foram realizadas simulações de DM para estabilizar o sistema sob condições termodinâmicas. A partir dos resultados observados nas DMs (abordado no tópico a seguir) e dos resultados obtidos por Jiang e colaboradores (Jiang et al., 2004), observou-se que a região N-terminal completa da promiostatina não estava diretamente interagindo com a região percursora da MSTN. Dessa forma criou-se um segundo modelo (C42 – S375) iniciando a partir do primeiro resíduo que é reportado na literatura por apresentar uma ação inibidora entre o prodomínio e a MSTN. O modelo em questão, foi denominado de ativo e pode ser visto no Apêndice C - Figura c.

A partir do modelo ativo da promiostatina, todas as demais estruturas envolvidas no processo de ativação, com exceção da forma ativa da MSTN (PDB: 3HH2), foram manualmente construídas. O complexo latente foi obtido por meio da clivagem da ligação peptídica entre os resíduos R266 e D267 da promiostatina. A estrutura TLD – p1 foi gerada a partir da clivagem da ligação peptídica entre R98 e D99. As proteínas intermediárias (p1 – inter, TLD – p2, p2 – inter e MSTN inativa) foram obtidas sequencialmente a partir da remoção de uma região *arm*, segunda região *arm*, uma região *forearm* e pôr fim a última região do *forearm*. Em relação a miostatina ativa, a estrutura foi obtida a partir das cadeias A e B do PDB 3HH2.

3.2.2 Modelagem da folistatina

Em relação aos inibidores endógenos, no presente trabalho optou-se por avaliar o modo de interação entre a MSTN e a FST. A escolha do inibidor se deu devido à grande afinidade entre essa proteína e a MSTN e a partir dos resultados espera-se ser possível entender a afinidade pelo inibidor endógeno, e com isso mimetizar essa interação com outras moléculas.

Quanto ao processo de modelagem, selecionou-se a estrutura cristalográfica de código PDB 3HH2 – cadeias C/D como base na construção do modelo da FST, devido a melhor resolução e a maior completude em sua cadeia proteica. Optou-se por trabalhar com a isoforma 2 da FST (follistatina288, código Uniprot: P19883-2), com apenas 288 resíduos sem a presença do C-terminal ácido (S318 – W344) (Figura 3). Em relação a estrutura cristalográfica escolhida, o PDB apresenta duas cadeias da FST (C e D), onde são observados alguns gaps pequenos abordados no tópico 3.1.2. Com isso, a sequência da follistatina observada no PDB 3HH2 foi alinhada com a sequência disponível no Uniprot, e o modelo final foi construído com auxílio do programa Modeller.

Após a obtenção do modelo, a estrutura foi comparada ao PDB 3HH2 e observou-se um RMSD de 0,784 Å. Com isso, após definir que o modelo estava representando satisfatoriamente a follistatina, o modelo desenvolvido foi alinhado com o PDB 3HH2 de forma a obter os complexos MSTN – FST e MSTN – FST₂. Posteriormente a follistatina foi complexada com a forma inativa da MSTN, com objetivo de avaliar a diferença entre o modo de interação com a miostatina em sua conformação ativa e inativa.

3.2.3 Modelagem do domínio extracelular das proteínas ALK4, ALK5, AcvR2A e AcvR2B

Em relação a modelagem das proteínas ALK4, ALK5, AcvR2A e AcvR2B, como foi discutido anteriormente, optou-se por trabalhar apenas com a região extracelular dos receptores. Quanto as estruturas base a serem usadas na modelagem, utilizou-se o PDB 5NH3 para o receptor AcvR2A, os PDBs 5NGV e 7MRZ para o receptor AcvR2B, o PDB 7MRZ para o receptor ALK4 e o receptor 6MAC para o receptor ALK5.

Em relação ao processo de modelagem dos receptores, as estruturas em questão foram alinhadas com as suas sequências primárias, obtidas com o Uniprot, e a construção foi realizada com auxílio do programa Modeller. Quanto aos modelos, as estruturas PDB não apresentavam regiões de gaps em sua composição, de forma que foi necessário apenas completar poucos resíduos nas regiões C- e N-terminais (coil) de cada proteína. Por fim os modelos obtidos e a sequência presente em cada um deles pode ser visto na Figura 4.

3.3 *Benchmark* para o campo de força e modelo de solvente

Como foi descrito no tópico 3.2, foram construídos dois modelos para a estrutura da promiostatina humana, o modelo completo (M24 – S372) e o modelo ativo (C42 – S375) como pode ser visto nas Figuras b e c no Apêndice C. Ambos os modelos foram construídos de forma a reproduzir a estrutura geral esperada para a promiostatina e outras proteínas da família das TGF – β , o qual consiste em um dímero simétrico com conformação em V com seus monômeros conectados apenas por uma ligação dissulfeto entre os domínios que originarão a MSTN ao final do processo de ativação. Tendo em vista o escasso número de estudos teóricos a cerca desse tema, no presente trabalho foi realizado um pequeno benchmark de forma a determinar o melhor protocolo a ser empregado para reproduzir as conformações e interações entre as regiões das proteínas ao longo do processo de ativação da MSTN. Dessa forma avaliou-se dois campos de força para a proteína, ff19SB (Tian et al., 2020) e ff14SB (Maier et al., 2015), combinados com três diferentes modelos de solvente TIP3P (Mark; Nilsson, 2001), OPC (Izadi; Anandakrishnan; Onufriev, 2014) e uma representação implícita da água por meio de sua constante dielétrica.

Em relação aos modelos de solvente, o TIP3P consiste em um modelo de três pontos para representar a água, OPC um modelo de quatro pontos para representar a molécula de água e o solvente implícito consiste em um dielétrico contínuo com constante dielétrica (ϵ) igual a 78,3553 (água). Em relação aos campos de força empregados, ambos são comumente empregados em simulações que visam compreender propriedades estruturais de proteínas. O ff14SB é um campo de força clássico para simulação de proteínas, sendo amplamente usado, enquanto o ff19SB consiste em uma versão mais atualizada e desenvolvida recentemente (2019) o qual se baseia em cálculos quânticos para obter os parâmetros para cada aminoácido padrão. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos na avaliação do melhor protocolo a ser empregado nas simulações. Foram avaliados três parâmetros em cada combinação de campo de força e modelo de solvente, quando possível, os resultados foram comparados com dados experimentais.

Tabela 3 – Benchmark de campo de força e modelos de solvente para os modelos completo e ativo da promiostatina.

Campo de força	Modelo de solvente	RMSD / Å	DSSP (%)	R _g / Å
Completo				
ff14SB	Implícito	3,7 ± 0,9	65	31,3 ± 0,7
	TIP3P	2,9 ± 0,5	66	29,9 ± 0,4
ff19SB	Implícito	2,7 ± 0,4	68	31,4 ± 0,7
	OPC	3,2 ± 0,6	76	32,6 ± 0,4
Ativo				
ff14SB	TIP3P	3,0 ± 0,7	70	31,4 ± 0,6
	OPC	3,8 ± 0,7	71	32,2 ± 0,4
ff19SB	TIP3P	4,1 ± 0,7	67	32,1 ± 0,4
	Implícito	2,4 ± 0,4	68	33,9 ± 0,7
	Implícito + TIP3P	2,3 ± 0,3	69	34,4 ± 0,5
	Experimental	-	44	40,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: O termo “implícito” é referente ao modelo contínuo de solvente com constante dielétrica igual a 78,3553 (água). DSSP representa a soma de alfa hélices e folhas betas que a proteína apresentou ao longo da simulação. Todas as análises foram realizadas nos últimos 100 ns de simulação. Os dados experimentais foram obtidos a partir de Cotton e colaboradores (Cotton et al., 2018).

Quanto aos parâmetros das simulações, foram analisados a raiz do erro quadrático médio (*root mean square deviation* – RMSD), dicionário de estrutura secundária de proteínas (*dictionary of secondary structure on proteins* – DSSP) e o raio de giro (R_g). Esses parâmetros foram escolhidos tendo em vista o objetivo geral do projeto de analisar as interações entre os domínios das proteínas associadas com a via de ativação da MSTN humana. Sendo assim, a análise do RMSD fornece informações acerca do movimento relativo da proteína durante a trajetória da simulação, ou seja, a média fornece o desvio médio da proteína em relação a sua conformação inicial na DM e o desvio padrão indica a flutuação que o sistema apresentou ao redor dessa média. Logo, menores médias e desvios padrões indicam que o sistema está com baixo movimento ao longo da DM e, portanto, espera-se que as interações sejam mais duradouras e melhor observáveis. Em relação ao DSSP, este fator mensura a tendência dos resíduos se orientarem espacialmente como uma folha β ou uma α hélice, e quanto maior for a porcentagem de resíduos que apresenta

uma dessas duas estruturas, maior será a estabilidade global da proteína pois as interações intramoleculares associadas a essas conformações geram uma maior estabilização para a proteína. Por fim, o R_g foi utilizado como uma forma de medir o volume proteico e comparar com os dados experimentais, mostrando que o modelo criado se aproxima do observado experimentalmente.

Ao analisar os resultados da Tabela 3, o modelo completo foi testado usando os campos de força (ff14SB e ff19SB) combinados com todos os modelos de solvente descritos anteriormente. Os resultados indicam que o campo de força ff14SB performou melhor com o modelo de solvente TIP3P, enquanto o ff19SB apresentou melhor resultado com o OPC, o que é consistente com o exposto na literatura (Tian et al., 2020). Focando na proteína completa, os resultados do RMSD indicam que todas as combinações de campo de força e modelo de solvente geraram trajetórias estáveis em que as proteínas apresentaram baixa flutuação (RMSD 2,7 – 3,7 Å) e o DSSP indica uma formação substancial de estruturas secundárias na proteína. No entanto, ao comparar os valores de R_g com os disponíveis na literatura, observa-se que esse modelo da promiostatina convergiu para uma estrutura com baixos valores médios de R_g , indicando que houve uma maior compactação do sistema do que é previsto experimentalmente ($R_g = 40,0$ Å). Sendo assim, com base nos trabalhos de Jiang e colaboradores (Jiang et al., 2004), construiu-se o segundo modelo (ativo) no qual parte do N-terminal é retirado e a proteína consiste apenas da C42 – S375 (Apêndice C – Figura c).

Por fim, pode-se analisar os resultados referentes ao modelo ativo na Tabela 3. Inicialmente, testou-se o campo de força ff14SB somente com TIP3P pois é a combinação mais indicada para esse campo, porém para o ff19SB realizou-se testes como todos os solventes. Dessa forma, ao comparar os resultados de todas as combinações de campo de força e modelo de solvente, o protocolo que consiste em uma otimização inicial do sistema com o modelo de solvatação implícito, seguida de uma simulação com ff19SB/TIP3P apresentou os melhores resultados. O RMSD para esse protocolo foi o menor dentre os testados, indicando que a estrutura atingiu um equilíbrio conformacional em menor tempo, e o raio de giro apresentou a média mais próxima do valor experimental, o que apesar de indicar que o modelo está prevendo uma estrutura mais compacta do que a experimental é possível utilizar esse protocolo como base para os futuros cálculos para esse sistema.

3.4 Dinâmica molecular: Protocolo final

Todas as estruturas associadas ao processo de ativação da MSTN foram obtidas a partir do PDB. A promiostatina foi obtida a partir do PDB 5NTU, enquanto o complexo latente e os seus derivados foram construídos com auxílio do software USCF Chimera e do *Visual Molecular dynamics* (VMD) (Humphrey; Dalke; Schulten, 1996). A estrutura da MSTN ativa foi obtida a partir das cadeias A e B do PDB 3HH2, e a estrutura da folistatina foi obtida a partir das cadeias C e D do mesmo PDB, enquanto os gaps foram completados com o software modeller como descrito na sessão 3.2.2. Quanto aos receptores a construção dos modelos foram realizadas conforme descrito na sessão 3.2.3. Todas as simulações foram realizadas utilizando uma caixa de água octaédrica truncada, com uma distância mínima de 10,0 Å da proteína até a borda da caixa. Além disso, para neutralizar a carga dos sistemas construídos adicionou-se íons Cl⁻ e Na⁺ às soluções, quando foram necessários. Para as proteínas utilizou-se o campo de força ff19SB, enquanto, para o solvente utilizou-se o campo de força TIP3P e para os íons os parâmetros de Joung/Cheatham (Joung; Cheatham, 2008), de acordo com o concluído como o melhor protocolo a partir do benchmark realizado.

As simulações foram realizadas seguindo o mesmo protocolo padrão, em vista de avaliar a estabilidade e as interações entre os domínios das proteínas sob condições fisiológicas (pH = 7,4, T = 310 K e solução aquosa). O protocolo consistiu de seis etapas: (I) Otimização inicial do sistema em solvente implícito ($\epsilon = 78,3553$) por 50 ns; (II) otimização do solvente; (III) otimização do sistema completo; (IV) aquecimento escalonado de 50 a 310 K por 3 ns ($\tau = 2$ fs) – NVT, com as ligações entre os átomos da proteína restritas com uma constante de força de 10,0 kcal mol⁻¹ Å⁻²; (V) equilíbrio da densidade à 310 K por 1,4 ns ($\tau = 1$ fs) – NPT, enquanto a constante de força de restrição do sistema foi gradualmente diminuída a zero e (VI) produção final de 500 ns ($\tau = 2$ fs) – NPT com o sistema em condições fisiológicas. Para os complexos p2 – inter, MSTN inativa e ativa foram realizadas produções extensas de 2,5 μ s ($\tau = 2$ fs). As ligações de hidrogênio foram restritas pelo algoritmo de SHAKE (Macuglia, 2023), e as interações não ligadas apresentaram uma distância máxima de 10,0 Å. A temperatura do sistema foi controlada com um termostato de Langevin, e cada simulação foi realizada em duplicata para garantir a reprodutibilidade

dos dados obtidos. Todas as simulações foram realizadas no software Amber24 (Case et al., 2025).

As análises foram realizadas nos últimos 100 ns (ou 500 ns para as simulações longas) de cada produção utilizando o pacote cpptraj disponível no programa Amber (Case et al., 2023). Além disso, a menos que esteja explicitamente informado, todos os resultados são referentes à média entre as réplicas realizadas. Para avaliar a estabilidade de cada estrutura ao longo do processo de ativação da MSTN, o método *Generalized Born Surface Area (GBSA)* (Genheden; Ryde, 2015b) foi utilizado para calcular as energias em cada etapa com o modelo de solvente implícito definido como $igb = 2$.

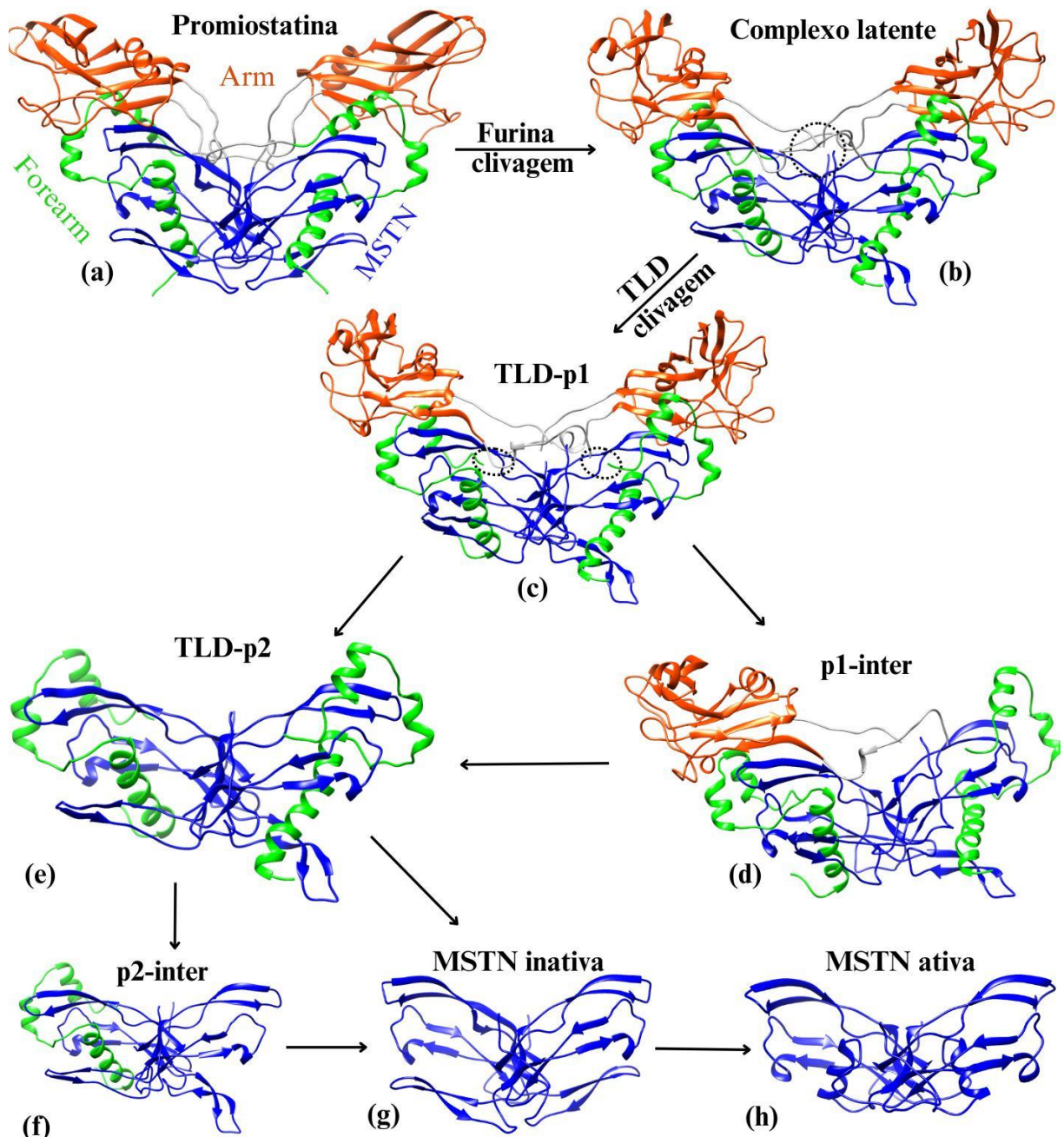
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em vista de avaliar o processo extracelular da cascata de ativação da miostatina humana foram construídas todas as estruturas conhecidas para a miostatina livre e seus complexos com o inibidor endógeno e os receptores quinase. Além disso foram propostas estruturas intermediárias para auxiliar a elucidar o processo de dissociação da miostatina de seu prodomínio. Por fim, todos os sistemas foram submetidos ao cálculo de dinâmica molecular clássica com o protocolo descrito no tópico 3.4. As simulações obtidas foram analisadas e os resultados estão dispostos nas próximas seções, os quais estão organizados de acordo com o caminho esperado que a miostatina irá seguir desde a sua forma inativa, ao ser excretada da célula, até a sua interação com as fibras musculares.

4.1 Cascata de ativação da miostatina humana

O processo de ativação da miostatina humana não é totalmente elucidado, experimentalmente tem-se evidência da promiostatina, do complexo latente e da forma ativa da MSTN. No entanto, as transformações que a proteína precursora sofre até a total liberação de sua forma ativa não são completamente conhecidas. A Figura 1 mostra o mecanismo molecular geral proposto na literatura para essa via, onde apenas 3 estruturas são associadas ao processo de ativação. Dessa forma, torna-se necessário a avaliação dos possíveis intermediários associados a esse processo, em vista de determinar as principais regiões no prodomínio que interagem com a região precursora da MSTN mantendo-a inativa. A partir da análise das interações entre os domínios espera-se que seja possível desenvolver uma base para propor peptídeos que possam atuar como inibidores (*therapeutic peptide*) com alvo nessa via, e assim atuar como regulador do crescimento muscular e impedir o desenvolvimento da atrofia.

Figura 6 – Mecanismo molecular proposto para o processo de ativação da miostatina humana.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: A figura representa o mecanismo de ativação da MSTN humana que será abordado ao longo desse trabalho. (a) Estrutura da promiostatina com destaque para as três regiões principais o *arm* (laranja), *forearm* (verde) e a região que comporá a MSTN (azul). (b) Estrutura do complexo latente que apresenta a mesma sequência proteica que a promiostatina, no entanto o prodomínio interage com a MSTN apenas por interações não covalentes. (c) A estrutura do TLD-p1 apresenta a mesma sequência do complexo latente, porém o *forearm* e o *arm* não estão mais ligados covalentemente. (d) A estrutura do p1-inter representa um possível intermediário assimétrico na via, onde apenas o *arm* de uma cadeia foi liberado, enquanto o outro continua interagindo com os *forearm* e com a MSTN. (e) Estrutura TLD-p2 consiste em outro intermediário na via, no qual o *arm* dissociou completamente. (f) O p2-inter consiste em um intermediário assimétrico em que o *forearm*

de apenas uma cadeia dissociou. (g) A MSTN inativa representa a miostatina na conformação obtida quando o prodomínio é completamente liberado. (h) A MSTN ativa consiste na estrutura final da miostatina quando o processo é concluído.

A Figura 6 apresenta uma proposta para o processo de ativação completo da miostatina humana, o qual se inicia com a promiostatina e envolve a liberação por etapas do prodomínio até a obtenção da MSTN ativa. Com isso, em vista de avaliar a viabilidade do mecanismo proposto, foram realizadas simulações de DM, seguindo o protocolo descrito na metodologia, para todas as estruturas apresentadas na Figura 6. Em todos os sistemas avaliou-se as interações intermoleculares entre cada região do prodomínio com a MSTN. Além disso para os intermediários p1-inter e p2-inter foram avaliados a perda do domínio arm e forearm, respectivamente, em ambas as cadeias em vista de preservar a simetria do complexo. Dessa forma, construiu-se os complexos p1-inter com o arm da cadeia A e B, e p2-inter com o forearm da cadeia A e B.

Para avaliar a estabilidade conformacional dos complexos proteicos foi calculado o RMSD para todos os resíduos (C_{α}) usando como referência a primeira estrutura dos últimos 100 ns das respectivas trajetórias para as proteínas presentes na Figura 6 (veja a flutuação média no Apêndice D). As proteínas apresentaram RMSD médio na faixa de 1,7 a 3,3 Å (veja o Apêndice E para mais detalhes), com a maior e menor flutuação associadas, respectivamente, a forma inativa (Figura 6g) e ativa (Figura 6h) da MSTN. Os resultados indicam que todas as estruturas demonstraram estar conformacionalmente estáveis e entraram em equilíbrio com o tempo de simulação empregado, apresentando flutuações consistentes com o esperado devido ao movimento natural dos aminoácidos em condições termodinâmicas. Tendo em vista esse resultado, observa-se que é possível utilizar as trajetórias para analisar as variações nas interações entre o prodomínio e a MSTN ao longo do processo de ativação (promiostatina \rightarrow p2 – inter).

Focando inicialmente na proteína precursora, a promiostatina apresenta o prodomínio covalentemente ligado a região que originará a miostatina ativa, de forma a que a mantém inativa. Estudos recentes mostram que esse precursor não é a forma mais abundante em que a miostatina é encontrada no corpo humano, sugerindo que não deve ser estabelecida como um alvo primário para o desenvolvimento de inibidores (Bonnieu; Carnac; Vernus, 2007; Chen et al., 2021; Elkina et al., 2011). Conseqüentemente, as análises da via de ativação da MSTN focaram no complexo

latente e nos demais intermediários. No entanto, uma análise é interessante de ser realizada com a estrutura do precursor, que consiste em comparar a estrutura de equilíbrio da DM com o resultado experimental observado por Cotton e colaboradores (Cotton et al., 2018). O R_g experimental foi de 40,0 Å enquanto o valor calculado para a estrutura de equilíbrio da DM foi $34,8 \pm 0,4$ Å, o que indica que a estrutura em solução aquosa foi mais compacta do que no estado sólido devido ao aumento da flexibilidade na simulação favorecer a formação de novas interações que não estavam presentes no sólido. Por outro lado, quando alinhada a estrutura final dos últimos 500 ns de simulação com o PDB 5NTU, foi observado um RMSD de 1,31 Å, o que é um valor pequeno e de acordo com a variação esperada entre estruturas em estado sólido e em fase aquosa (detalhes ver o Apêndice F).

Dessa forma, visando avaliar a viabilidade do processo de ativação proposto na Figura 6, foi calculado a energia de interação entre os domínios de cada proteína (ΔG_{aq}). A Tabela 4 apresenta as energias de interação moleculares para cada etapa calculadas com o método MM-GB/SA. Nesse ponto é importante ressaltar que o método MM-GB/SA fornece uma maneira eficiente de descrever a afinidade de interação entre biomoléculas por meio de uma combinação entre energia advinda da mecânica molecular (MM) com efeitos de solvatação derivados do modelo contínuo (GB/SA). No entanto, o método não inclui explicitamente a entropia do soluto, apenas parte da entropia é implicitamente incluída por meio do modelo contínuo de solvatação. Dessa forma, os valores de ΔG_{aq} não devem ser interpretados como a energia livre absoluta. Contudo, os valores são satisfatórios para realizar comparações relativas, como a tendência de estabilidade relativa entre os complexos no processo de ativação (Forouzesh et al., 2024; Genheden; Ryde, 2015a; Sun et al., 2018).

Tabela 4 – Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para cada etapa do processo de ativação da miostatina humana.

Processo	ΔG_{aq}
MSTN + prodomínio → Complexo latente	-485 ± 10
MSTN + prodomain-nl → TLD-p1	-446 ± 8
MSTN + [forearm ₂ -arm] → p1-inter	-371 ± 54
MSTN + forearm ₂ → TLD-p2	-322 ± 31
MSTN + forearm → p2-inter	-174 ± 9 (-156 ± 3) ^a

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Todos os valores de energia estão em kcal mol⁻¹. O ΔG_{aq} ($=\Delta G_{v.d.w.} + \Delta G_{ele} + \Delta G_{sol}$) representa a média da energia livre de interação, em fase aquosa, para cada etapa da cascata de ativação da MSTN proposta na Figura 6. Todas as energias foram calculadas nos últimos 100 ns da trajetória com um passo de 0,2 ns (=500 frames) e igb = 2 usando o método GBSA. Os valores de energia representam a média e o desvio padrão entre as duas réplicas. As estruturas entre parêntesis indicam que as regiões continuam interagindo após a dissociação do complexo. O termo “prodomínio-nl” indica que as regiões do *arm* e *forearm* não estão covalentemente ligadas, mas permanecem interagindo. ^aEtapa final envolvendo a simulação longa de 2,5 μ s, com o valor de ΔG_{aq} (entre parênteses) calculado nos últimos 500 ns de simulação.

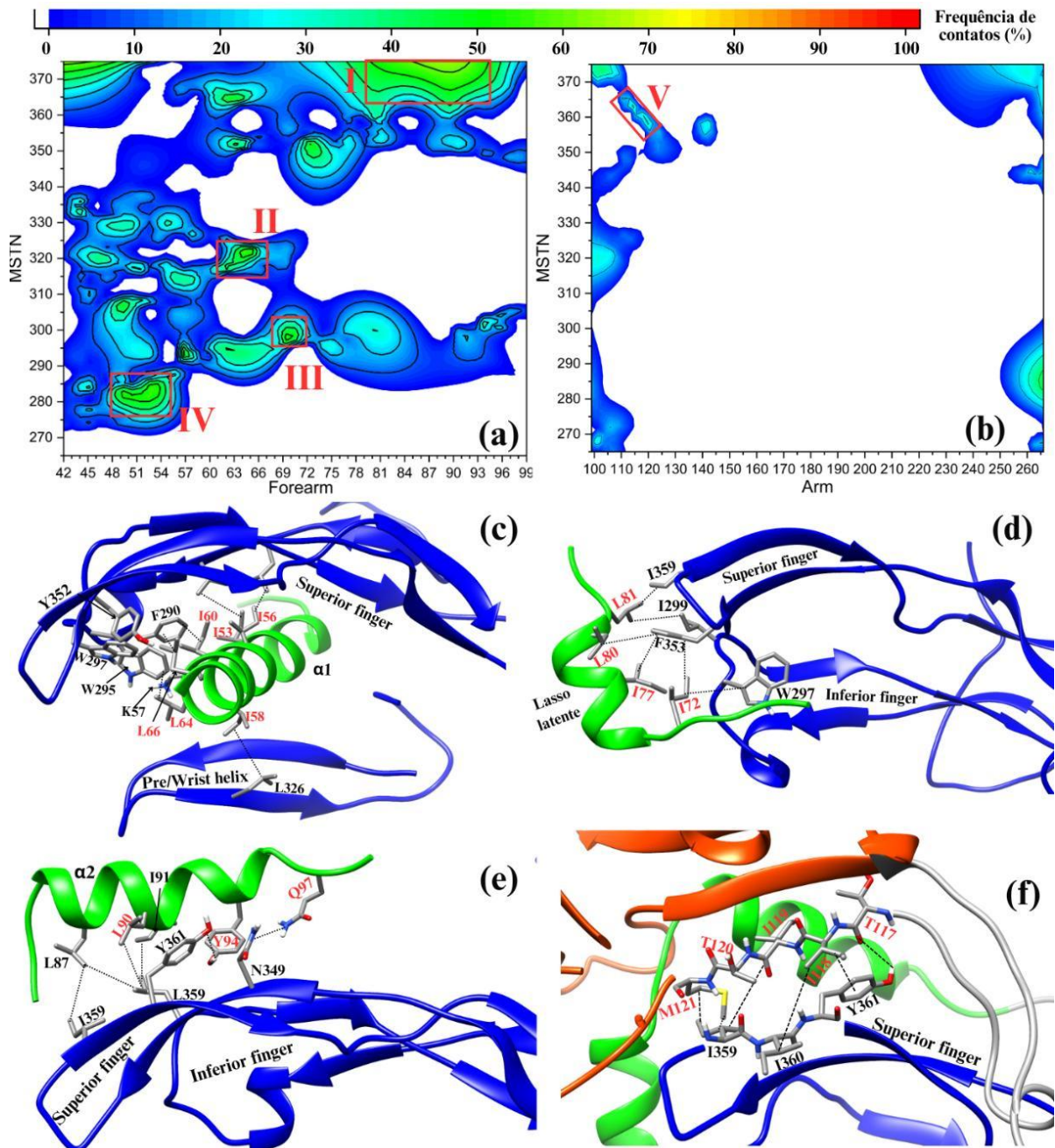
O complexo latente é a forma mais abundante na qual a miostatina é encontrada no organismo humano (Bonnieu; Carnac; Vernus, 2007; Chen et al., 2021; Elkina et al., 2011), ou seja, espera-se que a estrutura seja muito estável (-485 ± 10 kcal mol⁻¹) e não dissocie espontaneamente. Seguindo a cascata de ativação proposta, a região do *forearm* é clivada do *arm* no complexo latente pela protease BMP-1/TLD formando a estrutura do TLD – p1 (Figura 6c), a qual é menos estável (-446 ± 8 kcal mol⁻¹) do que o complexo latente. Essa redução na estabilidade pode ser associada a maior flutuação dos domínios do *arm* e *forearm* após a clivagem, os quais passaram a interagir menos com a MSTN. Após a formação da TLD – p1, tem-se a perda de uma região do *arm* formando o p1 – inter (Figura 6d) onde o sistema foi desestabilizado em 74 kcal mol⁻¹ e a estrutura se tornou mais flexível, como pode ser notado na alta flutuação da energia (54 kcal mol⁻¹). Em relação ao TLD – p2 (Figura 6e), onde ambos os domínios *arm* foram liberados, a proteína é menos estável (-322 ± 31 kcal mol⁻¹) mostrando que a dissociação de um domínio *arm* resulta em um decréscimo da interação do segundo domínio *arm* com o restante da proteína, favorecendo o progresso da cascata de ativação. Por fim, o p2 – inter (Figure 6f) é

formado após a perda de um *forearm*. Esse complexo aumenta a energia em 148 kcal mol⁻¹ comparado ao TLD – p2, indicando a forte interação dos domínios *forearm* com a MSTN, o que está associado com a sua função primária da região de bloquear os sítios tipo I e II da miostatina mantendo-a inativa. Para o intermediário p2 – inter, o qual é uma estrutura chave no processo de ativação da MSTN, foi realizado uma simulação extensa de 2,5 μ s, em replica, para garantir a estabilidade. Para esse caso, o ΔG_{aq} calculado foi de -156 ± 3 kcal mol⁻¹, o que condiz com o valor previsto na simulação curta.

4.1.1 Análise das interações miostatina – prodomínio ao longo do processo de ativação.

Primeiramente, foram analisadas as interações entre o *forearm* e a MSTN e entre o *arm* e a MSTN para o complexo latente, com o objetivo de identificar os principais resíduos que estabilizam a interação de cada região do prodomínio com a miostatina. A Figura 7 mostra a frequência de contatos entre o *forearm* e a MSTN (Figura 7a), *arm* e MSTN (Figura 7b) para esse complexo. Além disso, os principais resíduos que interagem com a MSTN no *forearm* (Figuras 7c-e) e *arm* (Figura 7f) ao longo da simulação também são mostrados. Os contatos foram definidos como interações entre dois átomos (não H) de resíduos com distância < 5 Å. As regiões na Figuras 7a e 7b marcadas de branco indicam que não foram observados contatos entre os domínios da proteína, enquanto as regiões coloridas na faixa de azul ao ciano representam contatos fracos (tempo de vida < 40% da trajetória). Ou seja, esses contatos não apresentam uma influência significativa na estabilidade com complexo, e pouco afetam a manutenção da interação entre o prodomínio e a região percursora da MSTN no complexo latente. Por fim, as regiões coloridas na faixa do verde ao vermelho indicam que os resíduos da MSTN, do *arm* e do *forearm* interagiram por mais do que 50% da trajetória, portanto serão tratados como regiões chave que contribuem para a estabilidade da proteína.

Figura 7 – Contatos nativos entre as regiões do prodomínio e a MSTN nos últimos 100 ns de trajetória para o complexo latente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: A figura mostra os contatos nativos entre o *forearm* e a MSTN (a), *arm* e MSTN (b) calculados nos últimos 100ns da trajetória para o complexo latente. Os principais contatos entre a região $\alpha 1$ no *forearm* com a MSTN (c), entre o lasso latente no *forearm* e o *superior* e *inferior finger* na MSTN (d), entre o $\alpha 2$ no *forearm* e o *superior finger* na MSTN (e) e a região $\beta 1$ do *arm* com o *superior finger* (f). As cores na figura (a) e (b) representam a frequência de contatos entre os domínios. Os resíduos marcados em são hot spots para o complexo latente. Para os contatos entre a o *forearm*-MSTN (a), a região I mostra os contatos entre o domínio $\alpha 2$ no *forearm* (L81 – Y94) com o *superior finger* da MSTN (I360 – D370), a região II mostra os contatos entre a final do domínio $\alpha 1$ no *forearm* (L61 – L66) com a região *pre/wrist* hélice na MSTN (F315 – H325), a região III mostra os contatos entre o lasso latente no *forearm* (E67 – I72) com o meio do *inferior finger* (W295 – K305) e a

região IV mostra os contatos entre a região $\alpha 1$ no *forearm* (Q46 – I58) com o início do *inferior finger* (H275 – F290). Para os contatos entre o *arm*-MSTN (b), a região V mostra os contatos entre o *superior finger* (G355 – P365) com a região $\beta 1$ no *arm* (T115 – S125).

Inicialmente foram analisadas as interações entre o *arm* e a MSTN. Focando na Figura 7b, observou-se que a região apresentou poucas interações com a MSTN, o que condiz com a baixa energia de interação *arm*-MSTN (~ -74 kcal mol⁻¹). Os principais contatos foram observados somente entre a região $\beta 1$ do *arm* com o *superior finger* da MSTN (região V na Figura 7b). Dessa forma, os resultados conjuntos de contatos e ΔG_{aq} confirmam que a região *arm* não apresenta grande contribuição em inibir a MSTN; apenas os resíduos T117 – T123 (região $\beta 1$) mostraram contatos significativos com a MSTN ao longo da trajetória. Algumas interações importantes que podem ser destacadas incluem I118 \cdots Y361 (82%), M121 \cdots I359 (77%), T117 \cdots Y361 (76%), I119 \cdots I359 (71%) e I118 \cdots I360 (66%) (ver Figura 7f com as interações).

Analisando os resíduos da região $\beta 1$ que interagiram com a MSTN, destacam-se a natureza hidrofóbica da cadeia lateral da Ile e da Met, as quais interagiram por meio de contatos hidrofóbicos com o secbutil da cadeia lateral das Ile no *superior finger* da MSTN. Além disso, um forte contato polar foi observado entre a hidroxila do fenol da cadeia lateral da Y361 e a carbonila da cadeia principal da T117 (Figura 7f). Apesar da baixa interação entre o *arm* e a MSTN, a região no *superior finger* onde há os contatos com a região $\beta 1$ é associada como o um dos sítios de interação da MSTN (sítio tipo II) com os receptores transmembranas. Dessa forma, os resultados indicam que é possível empregar tanto resíduos polares quanto apolares no desenvolvimento de novos peptídeos terapêuticos que apresentem uma interação eficiente com o sítio do tipo II da MSTN visando bloquear a transdução do sinal à célula.

Agora, em relação a interação entre o *forearm* e a MSTN, diversos contatos com alta frequência foram observados, o que reforça a proposta de que a natureza inibitória do prodomínio dá-se principalmente pelo *forearm*. A Figura 7a mostra a frequência de contatos entre a MSTN e o *forearm* para o complexo latente. Analisando as interações entre os domínios observou-se que houve diversos contatos com baixa frequência ($< 40\%$), no entanto, algumas regiões destacaram-se por apresentar uma alta frequência de contatos (regiões I – IV), logo espera-se que os aminoácidos do *forearm* nessas regiões demonstrem ser importantes para manter a forma inativa da MSTN.

Focando nos resíduos que compõe cada região em destaque, a região I representa os contatos entre os resíduos I77 – Y94 no *forearm* (região $\alpha 2$) e I360 – D370 na MSTN (*superior finger*), o que pode ser associado com a função dos resíduos na região $\alpha 2$ de bloquear o sítio do tipo II da MSTN (Figura 7e). A região II representa os contatos entre os resíduos L61 – L66 (final da região $\alpha 1$ no *forearm*) e F315 – H325 (região *pre/wrist* hélice na MSTN), demonstrando a função dos aminoácidos na região $\alpha 1$ de bloquear a formação da α hélice na MSTN (Figura 7c). Também, destaca-se a região III na qual observa-se a interação entre os resíduos E67 – I72 (lasso latente) e W295 – K305 (meio do *inferior finger*), essa interação mostra a função da região lasso de conectar o $\alpha 1$ e $\alpha 2$ de forma a mantê-los na conformação mais adequada para bloquear os sítios do tipo I e II, respectivamente (Figura 7d). Por fim, a região IV mostra os contatos entre os resíduos T48 – A55 (região $\alpha 1$) e H275 – F290 (início do *inferior finger*), demonstrando a ação dessa região do *forearm* em bloquear o sítio tipo I da MSTN (Figura 7c).

A partir da análise dos contatos foi possível desenvolver uma ideia inicial acerca das principais regiões no *arm* e *forearm* que agem inibindo a MSTN. Dessa forma, para fornecer um maior suporte a análise dos contatos, foi realizado uma decomposição da energia livre de interação calculada com o método MM-GB/SA. O quadro 2 mostra os resíduos com uma contribuição para a energia de interação ≤ -1 kcal mol⁻¹ (*hot spots*) (Grosdidier; Fernández-Recio, 2008; Kortemme; Kim; Baker, 2004; Quintanilha; Santos, 2024, 2023), os quais foram identificados para o complexo latente nos últimos 100 ns da simulação de DM. Por fim, ao comparar os resíduos no Quadro 2 com os contatos mostrados na Figura 7, foi possível identificar os principais resíduos que contribuem para estabilizar o complexo proteico.

Quadro 2 – Hot spots calculados, usando o método MM-GBSA, para a interação entre o *forearm* e o *arm* com a MSTN no complexo latente.

Domínio	Região	Hot spots
Forearm	I	I77, L80, L81, L90, Y94
	II	L61, S62, L64, R65, L66
	III	A69, P70, I72
	IV	T48, K49, S51, R52, I53, A55
	-	W44, R45, I56, K57, I58, I60, K74, V96, Q97
Arm	V	T117, I118, I119, T120, M121, T123
	-	Y111, H112, T114, T115, E116, F142, R263, R266

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Todos os cálculos foram realizados para interação *forearm*-MSTN e *arm*-MSTN. Os resíduos selecionados como hot spots apresentam contribuição para o $\Delta G_{aq} \leq -1$ kcal mol⁻¹. Os resíduos foram agrupados de acordo com as regiões destacadas na Figura 7, e os que não apareceram em nenhuma das regiões foram marcados por “-”. Todas as análises foram realizadas nos últimos 100 ns da trajetória para cada replicação. O cálculo MM-GBSA foi feito usando um passo de 0.2 ns (=500 frames) e *igb*=2.

Focando nos hot spots do *forearm* (Quadro 2), observou-se que a maior parte dos aminoácidos (60%) apresentam cadeia lateral apolar, indicando que a principal fonte de estabilização da interação MSTN-*forearm* é composta por contribuições de van der Waals (VDW). Dentre os 26 resíduos identificados como hot spots, Leu e Ile se destacaram aparecendo 12 vezes como sendo importantes para estabilizar a interação entre esses domínios. Além disso, é importante destacar que a maior parte desses hot spots estão localizados nas regiões destacadas na Figura 7a, indicando que esses contatos frequentes são importantes para manter o *forearm* fortemente interagindo e bloqueando os sítios da MSTN. Entretanto, é importante ressaltar que foram monitorados os contatos “nativos”, ou seja, novos contatos podem ser formados ao longo da trajetória os quais não são detectados nessa análise. Com isso, a análise de hot spots pode ser usada como uma forma adicional de identificar e agregar novos resíduos ao grupo de aminoácidos que estabilizam a interação desses dois domínios proteicos. Dessa forma, uma análise conjunta das duas técnicas deve ser feita para uma melhor interpretação dos resultados fornecidos pelas simulações.

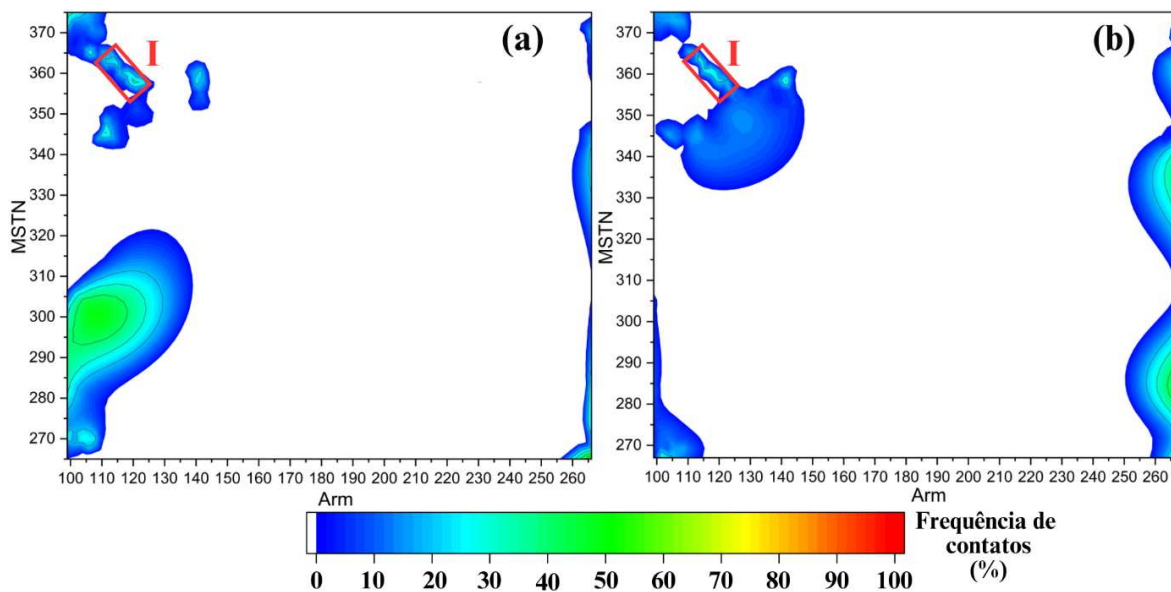
Em relação aos hot spots na região *arm*, 15 resíduos foram identificados por contribuir para estabilizar a MSTN no complexo latente. Dentre esses resíduos observa-se uma mistura de resíduos polares e apolares (principalmente Thr e Ile) que

interagem com a região do *superior finger* da MSTN. De maneira similar ao que foi observado para interação *forearm*-MSTN, notou-se que alguns hot spots coincidem com as regiões de alta frequência de contatos. No entanto, para a interação *arm*-MSTN a maior parte dos resíduos que atuaram como hot spots não estão presentes na região de maior interação do *arm* com a MSTN.

A partir dos resultados discutidos até esse ponto com a análise do complexo latente, é possível definir os parâmetros a serem monitorados (hot spots e frequência de contatos) para os demais intermediários da cascata de ativação da MSTN humana. Logo, a análise de frequência de contatos entre o *arm* e a MSTN foi realizada para as estruturas TLD-p1 e p1-inter, enquanto entre o *forearm* e a MSTN foram realizados para todos os sistemas. Os hot spots foram determinados para todos os sistemas.

Em relação as interações entre o *arm* e a MSTN, a Figura 8 mostra o perfil de contatos para as interações entre essas regiões nas estruturas da TLD – p1 (Figura 8a) e p1 – inter (Figura 8b). Os principais resíduos observados como contatos frequentes foram os mesmos vistos para o complexo latente (Figura 7f), especialmente T177 – M121 e da T123. Esses resultados confirmam que a região β 1 no *arm* apresenta ação inibitória no sítio do tipo II da MSTN (*superior finger*), ao formar uma rede de contatos que bloqueia a interação dessa região com a superfície da proteína transmembrana (região I na Figura 8). Além disso, vale destacar que os resíduos apresentam natureza polar e apolar, gerando uma mistura de interações a serem formadas. Além da região marcada, foram observadas outras interações que estão associadas ao aumento da flexibilidade e do movimento da proteína após o processo de clivagem pela BMP-1/TLD (formando o TLD – p1) e pela perda de um *arm* (formando o p1 – inter).

Figura 8 – Contatos nativos entre a região *arm* e a MSTN para as proteínas TLD – p1 e p1 – inter.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Os contatos nativos foram calculados para as estruturas TLD – p1 (a) e o p1 – inter (b) nos últimos 100 ns de trajetória. As regiões em branco indicam que não houve interações entre os resíduos, enquanto as regiões com uma coloração na faixa do azul ao ciano indicam que houve interações de baixa duração (< 40%), ou seja, as interações não apresentaram influência significativa na estabilização da proteína. As regiões com cores na faixa do verde ao vermelho indicam que os resíduos do *arm* e da MSTN interagiram mais do que 50% do tempo de simulação, e, portanto, são associados como regiões que contribuem para a estabilização da proteína.

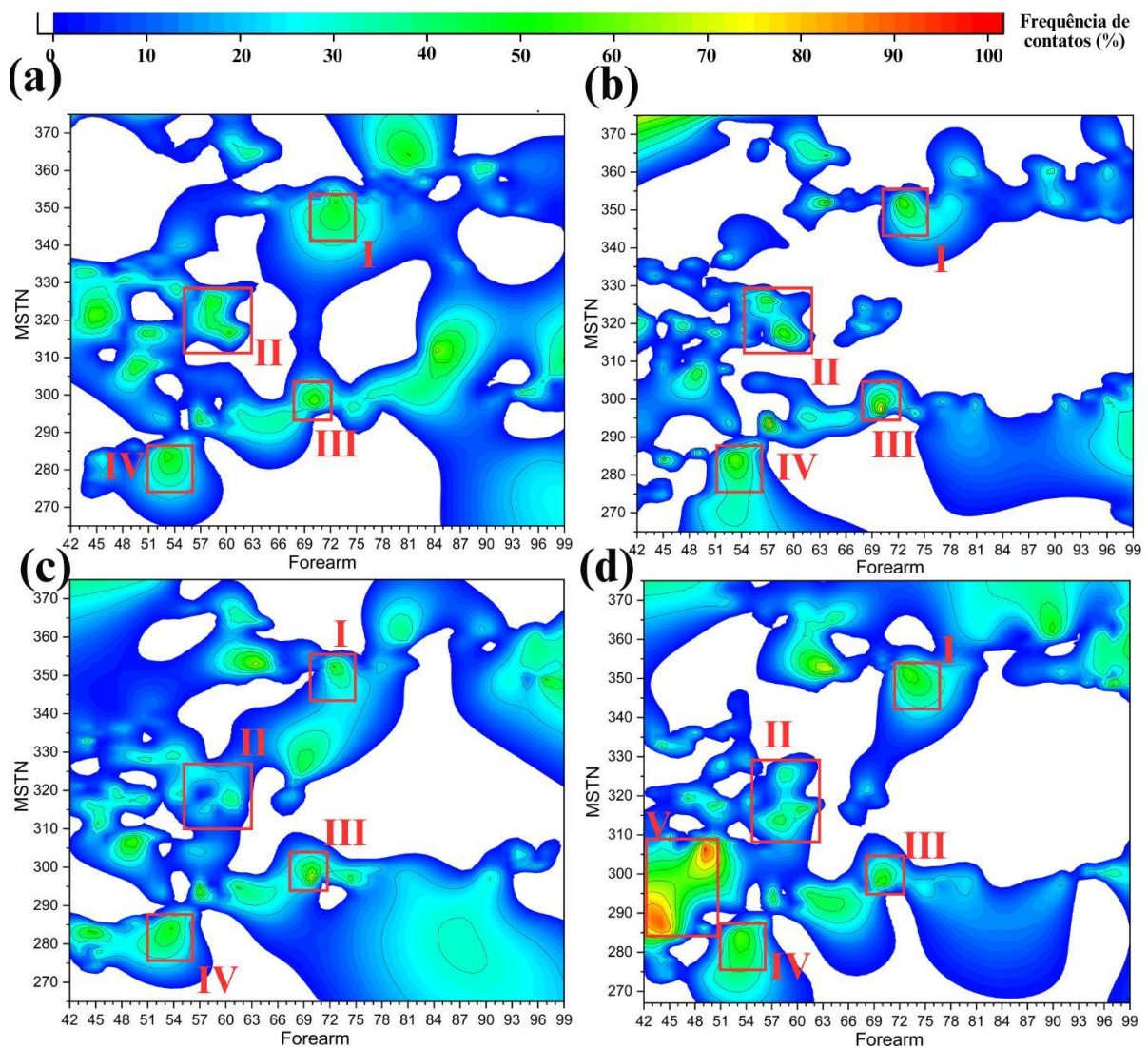
Quanto as interações entre o *forearm* e a MSTN, foram monitorados os contatos entre as duas regiões ao longo de todas as simulações com objetivo de observar se os resíduos e o tipo de interação predominante em cada sítio da MSTN permanecem constantes ao longo do processo de ativação. Dessa forma, caso seja observado que um resíduo ou um tipo de interação permanece constante ao longo do processo, pode-se inferir que o aminoácido apresenta uma estrutura favorável para interagir com os sítios da MSTN, de forma que ele pode ser empregado em parte do desenvolvimento de novos inibidores que possam atuar regulando a concentração da miostatina ativa no organismo.

A Figura 9 mostra o perfil de contatos entre a região MSTN e o *forearm* para cada intermediário ao longo do processo de ativação. As regiões destacadas mostram as principais interações, com um tempo de vida > 40% da trajetória, que apresentaram consistência ao longo de todo o processo de ativação. Analisando os perfis de contatos mostrados na Figura 9, é possível observar que nas regiões com baixa

frequência de contatos (ciano ao azul) o perfil de interações apresenta variação significativa, o que está associado a flexibilidade da proteína. Sendo assim, nota-se que os resíduos nessas regiões não são cruciais na inibição da MSTN pois interagem de forma inconstante. No entanto, nas regiões com alta frequência de contatos (variação de cor do verde ao vermelho), os resíduos do *forearm* permaneceram interagindo com a mesma região na MSTN ao longo de todo o processo de ativação, indicando a relevância desses aminoácidos em manter o *forearm* ancorado a MSTN para inibi-la.

A Figura 9 mostra os principais contatos que ocorreram entre as regiões $\alpha 1$ e lasso latente no *forearm* com todas as regiões da MSTN. As regiões I e III contém as interações entre o lasso latente e as pontas do *superior e inferior fingers*, de forma similar como é observado para o complexo latente (Figura 7d). Com isso, pode-se inferir que essa região no *forearm* permaneceu interagindo com o mesmo domínio da MSTN ao longo de todo o processo de ativação, agindo como um conector entre os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, de forma a mantê-los em suas posições para interagir, respectivamente, com os sítios do tipo I e II da MSTN. Em relação as regiões II e IV, observaram-se contatos entre a região $\alpha 1$ no *forearm* com o *inferior finger* (IV) e a *pre/wrist* hélice (II) na MSTN. Assim como foi discutido para o complexo latente (Figura 7c), essas interações estão associadas com a função desse domínio no *forearm* de bloquear o sítio do tipo I na miostatina e prevenir o rearranjo conformacional para a formação da α hélice, a qual está associada ao término da cascata de ativação da miostatina. Por fim, destacou-se uma região adicional na estrutura p2 – inter (Figure 9d – região V) onde observam-se diversas interações entre os resíduos do início da região $\alpha 1$ no *forearm* e toda a região do *inferior finger* da MSTN, reforçando a afinidade dessa região do *forearm* pelo sítio I da MSTN.

Figura 9 – Contatos nativos entre o *forearm* e a MSTN para as estruturas TLD – p1, p1 – inter, TLD – p2 e p2 – inter.



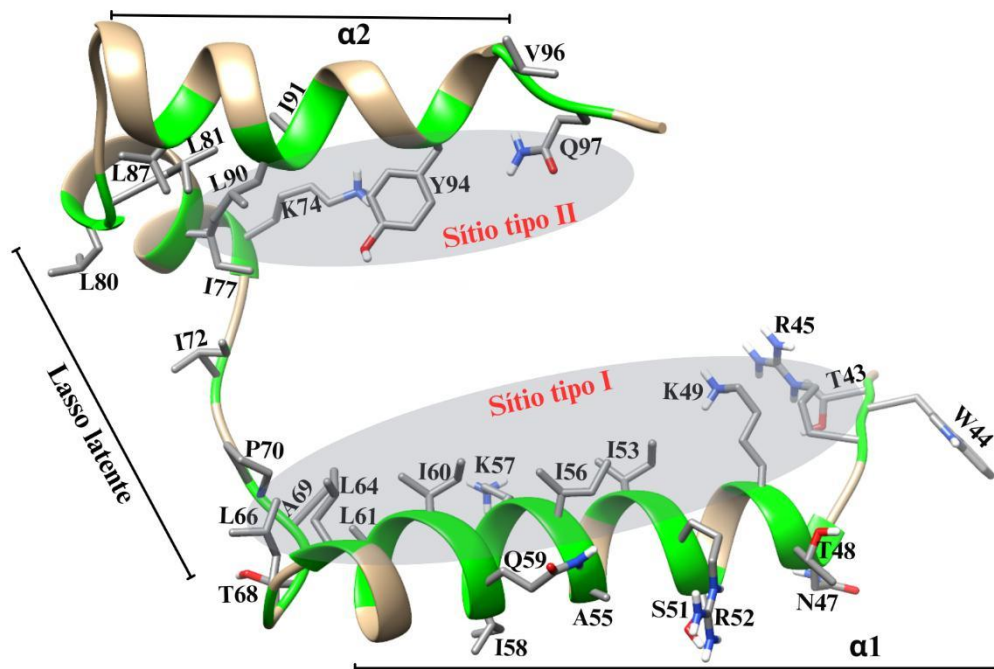
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Perfil de contatos nativos para a interação entre o *forearm* e a MSTN, ao longo dos últimos 100 ns da trajetória, para as estruturas TLD – p1 (a), p1 – inter (b), TLD – p2 (c) e p2 – inter (d). A região I mostra as interações entre o laço latente (N71 – V76) no *forearm* e o *superior finger* (C340 – G355) na MSTN; A região II mostra os contatos entre o laço latente (E54 – S62) no *forearm* e a região *pre/wrist* hélice (S310 – A330) da MSTN; A região III mostra os contatos entre o latente laço (T68 – I72) no *forearm* e o início do *inferior finger* (W295 – K305) da MSTN; e a região IV mostra os contatos entre o meio da região $\alpha 1$ (S51 – I56) no *forearm* e o início do *inferior finger* (H275 – V288) na MSTN. A região V se destacou apenas para a estrutura p2 – inter e mostra os contatos entre o início da região $\alpha 1$ (C42 – S51) do *forearm* e todo o *inferior finger* (P285 – A310) da MSTN.

Como foi abordado anteriormente, determinou-se que para a avaliação das interações entre o prodomínio (*forearm* e *arm*) e a MSTN será empregado uma análise conjunta dos contatos entre esses domínios e a decomposição da energia de interação MM-GBSA por resíduo. Sendo assim, nesse ponto do estudo foram

avaliados os hot spots para a interação *forearm*-MSTN e *arm*-MSTN para os demais complexos ao longo da cascata de ativação. Então, ao comparar as regiões com alta frequência de contatos mostradas na Figura 9 e os hot spots obtidos para todas as estruturas, selecionou-se os resíduos do *forearm* que fortemente interagiram com a MSTN ao longo de todo o processo de ativação. A Figura 10 destaca em verde os resíduos do *forearm* que atuam como hot spots na interação dessa região com a MSTN ao longo de todo o processo de ativação.

Figura 10 – Hot spots observados para a interação forearm – MSTN ao longo de todo o processo de ativação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Hot spots observados para a interação entre o *forearm* e a MSTN para as estruturas TLD – p1, p1 – inter, TLD – p2 e p2 – inter.

De acordo com a Figura 10, um total de 32 resíduos foram identificados como hot spots, 18 na região $\alpha 1$, 8 no lasso latente e 6 na região $\alpha 2$. Focando primeiro na região $\alpha 1$, esse domínio interage com o sítio do tipo I da MSTN como observado na análise dos contatos nativos (Figura 9). Dessa forma, ao analisar os resíduos que compõem essa região do *forearm* observou-se que a maior parte se constitui de aminoácidos com cadeia lateral de natureza apolar (Leu e Ile), sugerindo que a principal via de interação entre esses resíduos e a miostatina é dada por interações de VDW. Dentre os 18 hot spots na região $\alpha 1$, apenas T43, T48, A55, Q59 e L66 não

apresentaram contatos frequentes com a MSTN em todas as proteínas, o que fornece suporte a hipótese de que os resíduos apolares apresentam uma interação mais efetiva com o sítio do tipo I da miostatina. Dessa forma, em vista de aprimorar as interações de um inibidor baseado na região $\alpha 1$ do *forearm*, pode-se utilizar os hot spots como modelo e os demais resíduos podem vir a serem substituídos por outros aminoácidos (canônicos ou não) com longas cadeias laterais apolares.

Em relação ao lasso latente, a Figura 10 mostra oito hot spots, no entanto apenas metade deles possuem contatos frequentes com a MSTN ao longo de todo o processo de ativação. Os resíduos P70, I72, I77 e L80 são hot spots que apresentaram contatos frequentes com a MSTN, indicando que de forma similar a região $\alpha 1$, os resíduos com natureza apolar possuem maior eficácia para interagir com a miostatina. Dessa forma, os resultados reforçam a hipótese de que é possível realizar um design de um fármaco baseado em peptídeos (*peptide-based drug*) que contenham resíduos com cadeias laterais apolares as quais possibilitem a interação com o sítio I da miostatina humana.

Por fim, focando na região $\alpha 2$ do *forearm*, seis hot spots permaneceram interagindo com a MSTN ao longo de todo o processo de ativação (Figura 10). Diferentemente das demais regiões do *forearm*, os hot spots na região $\alpha 2$ consistem em uma mistura de resíduos apolares e polares. Dentre eles, L90, Y94, V96 e Q97 permaneceram como hot spots e contatos frequentes com o *superior finger* na MSTN. Os resultados observados para a interação entre essas regiões são consistentes com as informações obtidas para as interações entre o *arm* e a MSTN para as estruturas do complexo latente, TLD – p1 e p1 – inter, e a interação entre o $\alpha 2$ e o *superior finger* no complexo latente. Dessa forma, pode-se inferir que em vista de bloquear o sítio tipo II da MSTN, é necessário que o inibidor possua a capacidade de interagir tanto por meio de forças eletrostáticas e de VDW.

Tendo em vista que o complexo p2 – inter representa uma interação direta entre uma região do *forearm* e a MSTN, foi realizado uma simulação estendida de 2,5 μ s (em replica) para observar se a interação entre o *forearm* e a MSTN permanece ao longo de simulações prolongadas. O mapa de contatos no Apêndice G, exibe um perfil similar do apresentado na Figura 9d, com uma alta frequência de contatos entre os resíduos C42 – I53 na região $\alpha 1$ e R283 – S310 no *inferior finger* (região V). Adicionalmente, os resíduos I60 – L66 no final da região $\alpha 1$ formam uma forte rede de contatos com M50 – I60 no meio do *superior finger*. Os resultados sugerem que as

interações mais significativas ocorrem no sítio do tipo I da MSTN, envolvendo a região $\alpha 1$ do *forearm*. Isso implica que a região $\alpha 1$ pode servir como um modelo no desenho de fármacos com base em peptídeos. Em relação aos hot spots, foram observados os mesmos resíduos na região $\alpha 1$ mostrados na Figura 10. Dessa forma, foi possível concluir que as interações entre o *forearm* e a MSTN se mantiveram fortemente estáveis ao longo de simulações prolongadas.

De acordo com as análises prévias, observou-se que o *forearm* pode ser empregado como uma base no desenvolvimento de novos fármacos a base de peptídeos com alvo na MSTN. Os resultados indicam que a miostatina é mantida na sua forma inativa ao longo do processo de ativação por meio de uma rede de contatos que se mantém até a total liberação das regiões *arm* e *forearm*. Dessa forma, pode-se inferir que o *forearm* apresenta uma conformação favorável para ser usada com base na proposta de peptídeos terapêuticos que atuem bloqueando os sítios do tipo I e II da miostatina.

4.1.2 Transformação da miostatina inativa para a forma ativa

Após a perda completa da interação com o prodomínio, a miostatina se encontra em sua forma livre, no entanto apesar da ausência de um inibidor a bloqueno, a proteína permanece inativa (Figura 6g). Logo, fica evidente a necessidade de um último processo para ativar a MSTN (Figura 6h), o qual consiste em um rearranjo estrutural da região da *pre/wrist* hélice (E314 – A330) passando de uma estrutura secundária de folha β (inativa) para uma estrutura de α hélice (ativa). Essa última transformação na miostatina, ocorre em vista de liberar o sítio do tipo I da proteína para que a interação com a região extracelular do receptor transmembrana ALK4/5 possa ocorrer sem impedimento. Com o objetivo de compreender esse fenômeno de mudança da estrutura secundária, a proteína foi estudada em sua conformação aberta (inativa) e fechada (ativa), de forma a avaliar as interações intramoleculares em cada sistema e com isso identificar os resíduos que estão associados ao rearranjo para a formação da α hélice.

Levando em consideração o processo de transformação da MSTN inativa \rightarrow ativa, o fator primordial a ser avaliado é a formação da α hélice. Em vista de avaliar essa transformação, foi aplicado o algoritmo DSSP para avaliar a tendência de conformação assumida pela região P322 – A330 (*wrist* hélice) na MSTN em sua

conformação inativa e ativa ao longo dos 500 ns de simulação. Para a forma ativa foi observado que essa região da proteína apresenta a conformação de α hélice ao longo de toda a simulação, indicando que uma vez que a hélice é formada não há tendência de ocorrer um rearranjo conformacional e retornar à conformação de folha β .

No entanto, para a forma inativa, em uma das réplicas, foi observado uma transformação inicial de folha β para α hélice em uma das cadeias da MSTN. A transformação iniciou para os resíduos V327B – A330B, os quais mantiveram uma conformação estável de folha β durante os primeiros 300 ns de simulação. Porém, entre 300 – 400 ns de simulação essa região iniciou um rearranjo conformacional passando para a estrutura de uma α hélice por ~ 41% da trajetória. Ao longo dos últimos 100 ns, a conformação em hélice aumentou para 84% da trajetória. Dessa forma, os resultados sugerem que a transição de folha β para α hélice requer um longo tempo de simulação para iniciar, no entanto é espontâneo essa mudança conformacional. Sendo assim, o processo aparenta ser energeticamente favorável, com os resíduos tendendo a permanecer na conformação de hélice uma vez que à acessam. Para mais detalhes dessa transição observada, consulte o apêndice H.

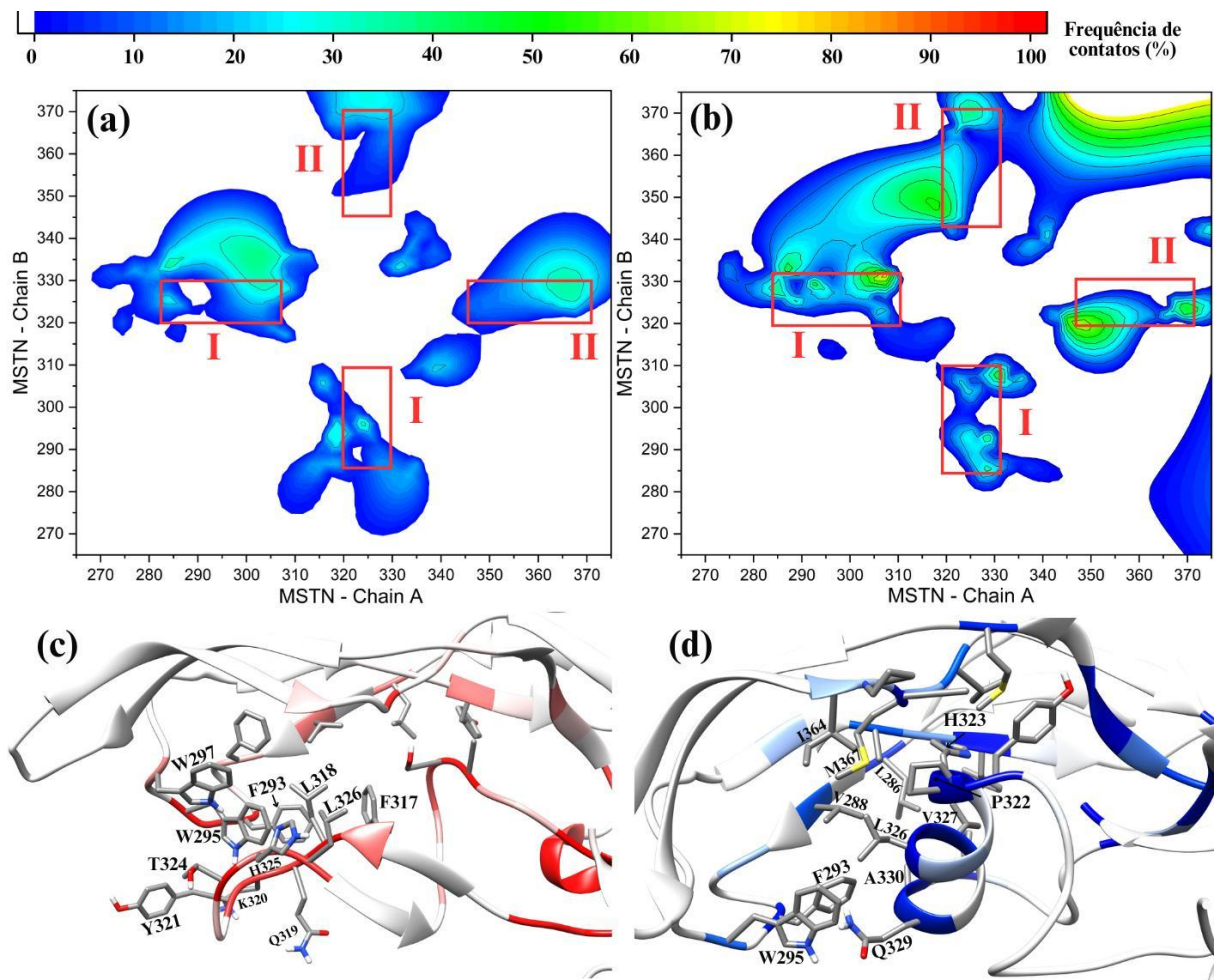
Em vista de observar se esse fenômeno apresenta tendência de retornar à conformação de folha β , realizou-se as simulações prolongadas (em replica) de 2,5 μ s. O algoritmo DSSP foi empregado para a estrutura inativa em vista de monitorar o progresso da formação da α hélice no segmento V327B – A330B, e para a estrutura ativa em vista de monitorar a estabilidade da hélice após formada. O Apêndice I mostra os resultados do DSSP obtidos na análise dos últimos 500 ns das simulações prolongadas para a estrutura inativa (Apêndice I – Figuras a,b) e ativa (Apêndice I – Figuras c,d). Para a estrutura inativa foi observado que o segmento V327B – A330B permaneceu com a conformação de α hélice por > 90% do tempo de simulação após ser formada (Apêndice I – Figuras a,b), contudo os demais resíduos dessa região não tendem a assumir essa mesma conformação. Esses resultados indicam que possivelmente há uma barreira que necessita ser transpassada para que a α hélice seja totalmente formada, e que a energia na simulação clássica não é suficiente para que o fenômeno ocorra totalmente. Em relação a conformação ativa, a hélice não apresenta tendência a retornar à conformação de folha β mesmo após longos períodos de simulação, o que indica a alta estabilidade da conformação ativa.

Em relação a estrutura da miostatina livre, na ausência do *forearm*, o sítio do tipo II, localizado na região exposta ao solvente da MSTN (Apêndice A), se torna livre

para interagir com o domínio extracelular da AcvR2A/B. No entanto o sítio do tipo I permanece bloqueado enquanto a proteína não assume a sua conformação ativa, dessa forma é importante avaliar as interações entre a região *pre/wrist* hélice com a outra cadeia da MSTN em sua conformação ativa e inativa. Por meio dos resultados dessa análise será possível identificar os resíduos chave que interagem com essa região mantendo-a inativa na conformação de folha β . Por fim, a partir desses resultados será possível propor modelos de fármacos que atuem no bloqueio da formação da hélice e conseqüente na ativação da MSTN.

A Figura 11 mostra os contatos entre as cadeias A e B da MSTN nas conformações inativa (Figura 11a,c) e ativa (Figura 11b,d). Comparando as Figuras 11a e 11b, observa-se uma diferença significativa entre o perfil de contatos para cada conformação da MSTN. A região I no perfil de contatos mostra as interações entre a *wrist* hélice e o *inferior finger* da cadeia oposta, enquanto a região II mostra as interações da *wrist* hélice com o *superior finger*. Ao analisar esses perfis, torna-se evidente que a conformação inativa apresenta poucos contatos (tempo de vida < 40 % da trajetória) entre as cadeias. Sendo as interações de maior intensidade localizadas fora das regiões associadas a formação da α hélice (Figura 11c), o que indica que a conformação inativa não há uma forte atração entre a *wrist* hélice e a cadeia oposta, de forma que a proteína assume uma conformação aberta que impossibilita a interação com a proteína tipo I. No entanto, essa conformação aberta com baixas interações entre as cadeias gera a formação de uma vacância na qual moléculas pequenas podem se ancorar o que resultaria no bloqueio da formação da hélice e manteria a proteína em sua forma inativa.

Figura 11 – Perfil de contatos nativos entre as cadeias A e B da MSTN para a forma ativa e inativa nos últimos 100 ns de simulação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Figura (a) apresenta os contatos nativos para a conformação inativa e a (b) para a conformação ativa da MSTN calculado nos últimos 100ns de trajetória. As regiões marcadas em vermelho no perfil de contatos são as interfaces entre o domínio *wrist* hélice e o *inferior* (região I) e *superior* (região II) *fingers*. (c) Representa os principais resíduos que interagem entre as cadeias para a MSTN inativa. (d) Representa os principais resíduos que interagem entre as cadeias para a MSTN ativa. A intensidade das cores nas figuras (c) e (d) indicam a frequência de contatos ao longo da trajetória.

Em contraste, para a conformação ativa, a Figura 11b mostra um aumento dos contatos entre a *wrist* hélice e a região dos *fingers*, indicando que a formação da α hélice promove a compactação da estrutura da proteína, o que por sua vez aumenta as interações intercadeias como pode ser visto na Figura 11d. Com isso, é evidente notar que a mudança conformacional da estrutura ativa para inativa gera uma mudança significativa no perfil de contatos entre as cadeias da proteína. Ou seja, os resultados mostram que a formação da α hélice requer uma mudança conformacional total da proteína, o que leva tempo, mas permanece sendo espontânea. Além disso,

observou-se que essa transformação da miostatina para a sua forma ativa pode ser um novo alvo de moléculas pequenas que podem se alojar essa região entre a *wrist* hélice e os *fingers* de forma a bloquear o rearranjo.

Baseado no perfil de contatos e na tendência de formação da α hélice, observou-se que um inibidor com alvo na MSTN livre pode ser proposto de diferentes formas de acordo com o seu alvo (forma ativa ou inativa). Considerando o sítio do tipo I como o meio dos *fingers*, como é observado experimentalmente, pode-se inferir que a formação da hélice é crucial para liberar o acesso do sítio à ALK4/5. Se o alvo do inibidor for a forma inativa, espera-se que o ancoramento ocorra entre a região da *wrist* hélice e os *fingers*, na região a qual o domínio $\alpha 1$ do *forearm* ocupa nas formas inativas da proteína, de forma a impedir a formação da hélice. Enquanto, se o alvo for a forma ativa, a droga deverá interagir com a α hélice de forma a bloquear a interação com o receptor tipo I na superfície do sarcolema.

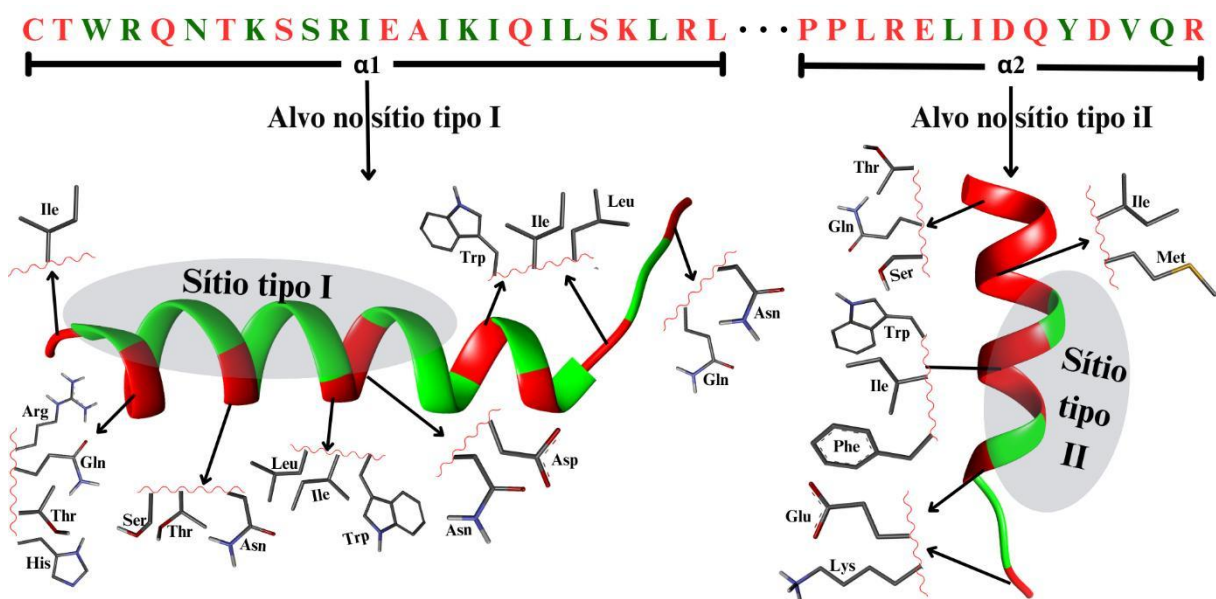
4.1.3 Principais fatores que um inibidor efetivo da MSTN livre deve apresentar

A partir dos dados apresentados e das análises realizadas, observou-se que certos resíduos interagem fortemente com a região que irá originar a miostatina durante todo o processo de ativação. Em destaque têm-se o *forearm*, o qual demonstrou possuir uma ação primordial de interagir com ambos os sítios da MSTN (tipo I e II), tornando-o um modelo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos. Os resultados indicam que, durante o processo de ativação, a região $\alpha 1$ do *forearm* bloqueia o sítio do tipo I, enquanto a região $\alpha 2$ bloqueia o sítio do tipo II. Além disso, após o fim da cascata de ativação e a desagregação da MSTN do prodomínio, ocorre um processo final de ativação que consiste em um rearranjo para a formação da α hélice na miostatina e conseqüentemente a liberação do sítio tipo I para interagir com o receptor. Dessa forma, ao compilar os resultados obtidos, observou-se que a completa formação da miostatina livre e ativa consiste em um processo espontâneo, porém lento, o que indica a possibilidade de moléculas atuarem como atenuantes desse processo de ativação.

Com base nas informações apresentadas, três estratégias foram propostas como formas de design de inibidores para a miostatina, variando de acordo com o alvo durante o processo de ativação e com o sítio. As estratégias consistem em inibir o

sítio tipo I, II e a formação da α hélice na MSTN livre. Em relação aos sítios I e II, o desenvolvimento de drogas baseadas em peptídeos destacou-se como uma via promissora na proposta de fármacos. Dessa forma, usando as regiões $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do forearm como base, propôs-se um modelo geral para o desenvolvimento de fármacos que atuem interagindo com os epítomos da MSTN de forma a bloquear a interação com as proteínas transmembranas (Figura 12) e consequentemente a transdução do sinal para a célula o que ocasionaria a redução do crescimento muscular. A Figura 12 mostra um modelo geral proposto para ser usado como base na construção de peptídeos terapêuticos com alvo na miostatina livre. Os resíduos em verde na Figura 12 são essenciais e devem ser preservados na construção dos inibidores, enquanto os resíduos em vermelho devem ser substituídos com os aminoácidos indicados.

Figura 12 – Modelo geral para o desenho de inibidores com alvo nos sítios tipo I e II da miostatina humana.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Os modelos para desenho de inibidores para o sítio tipo I e II foram construídos usando como base a região $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do forearm, respectivamente. Os resíduos marcados em vermelho são passíveis de serem substituídos pelos aminoácidos indicados, enquanto os resíduos em verde devem ser mantidos na droga.

Em relação ao sítio tipo II, um inibidor deve ser capaz de interagir por meio de contatos de natureza polar e apolar, por outro lado, para o sítio de tipo I é necessário resíduos que interajam majoritariamente por meio de forças apolares. Em ambos os casos, a estrutura de α hélice do peptídeo deve ser mantida para que a afinidade com

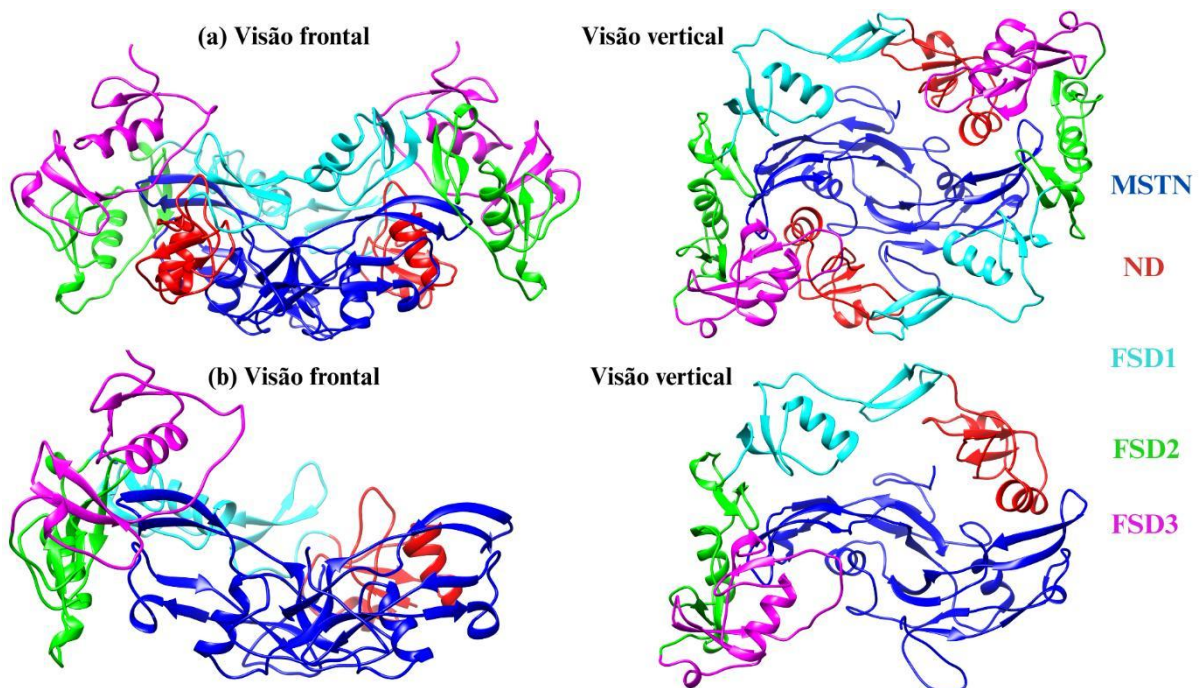
os sítios da MSTN seja eficaz (Figura 12). As duas estratégias apresentadas para inibir os sítios I e II focam no design de inibidores que podem bloquear a interação simultânea, ou não, dos sítios com domínios extracelulares dos receptores transmembrana. Por fim, a última estratégia consiste na proposta de moléculas pequenas, tais como produtos naturais, que possam atuar como inibidores da formação da α hélice durante o último processo de ativação da MSTN. Esses inibidores podem ancorar entre a região *pre/wrist* hélice e os *fingers*, impedindo a o rearranjo conformacional da folha β para a α hélice. Devido à natureza dos resíduos observados nessa região da MSTN (Ile, Leu, Phe, Val e Tyr), é recomendado que os inibidores possuam grupos hidrofóbicos em sua composição em vista de aumentar as interações não polares com os resíduos chave dessa região. Por fim, vale ressaltar que todos os inibidores propostos devem ser reversíveis, pois apesar de estar associada ao aumento da atrofia muscular, a miostatina também auxilia na manutenção do tamanho e população das fibras musculares, de forma que a total inibição da via pode resultar em efeitos colaterais indesejados.

Comparando os inibidores propostos nessa etapa com os disponíveis na literatura, observa-se diversas semelhanças, e alguns resultados novos obtidos no estudo. Takayama e colaboradores desenvolveram uma série de estudos experimentais que focam em identificar e avaliar a ação de pequenos peptídeos derivados da região do forearm e da folistatina como inibidores da MSTN (Rentier et al., 2019; Saitoh et al., 2020; Takayama et al., 2015, 2016, 2017, 2019, 2022). Os trabalhos desse grupo chegaram a algumas conclusões importantes: (I) Ile e Leu são resíduos chave na interação entre os inibidores e o sítio tipo I da MSTN; (II) W44 e A55, localizadas no início da região $\alpha 1$, podem ser substituídos por resíduos não canônicos ou de maior cadeia lateral apolar (ex: triptofano); (III) A conformação espacial, preferencialmente uma α hélice, se demonstrou crucial para uma ancoragem efetiva no sítio do tipo I; (IV) peptídeos cíclicos e lasso peptídeos, destacaram-se, como potencial linha de inibidores para a MSTN livre. De forma geral, todos esses resultados experimentais suportam os dados obtidos em silício, a partir da análise sistemática das interações entre os domínios das proteínas envolvidas no processo de ativação da miostatina. Dessa forma, a proposta de um modelo para o desenvolvimento de inibidores mostrada na Figura 12 se destaca como uma forte referência a ser usada no design sistemático de fármacos com alvo na MSTN, sendo a via de inibição como uma região específica da proteína ou não.

4.2 Processo de inibição endógena

Após a liberação da miostatina em sua forma livre e ativa a proteína tende a interagir com os receptores transmembrana para propagar o sinal. No entanto como foi discutido anteriormente, a MSTN pode ser bloqueada por meio do inibidor endógeno folistatina (FST). Em relação aos complexos com a FST, espera-se que a interação ocorra de forma efetiva quando uma molécula da miostatina interage com duas moléculas da FST (Cash et al., 2009), de forma que o inibidor envolva a MSTN e exerça um bloqueio estérico em seus epítomos ativos (Figura 13a), no entanto, não é conhecido se a formação do complexo ocorre de forma “concertada” com a miostatina complexando simultaneamente com duas estruturas da FST ou em etapas formando um intermediário MSTN:FST – 1:1 (Figura 13b). Dessa forma foram realizadas simulações de DM, usando o mesmo protocolo aplicado para o processo de ativação, em vista de avaliar a estabilidade dos complexos entre as duas proteínas em ambas as proporções. Sendo assim, foram realizadas simulações com complexos formados entre a MSTN ativa e a FST na proporção 1:1 e 1:2 (MSTN:FST) e os mesmos sistemas com a MSTN inativa (Apêndice J), com intuito de observar se há preferência para a formação do complexo antes ou após o rearranjo para formação da hélice discutido na seção 4.1.2.

Figura 13 – Estruturas dos complexos formados pela Miostatina ativa e a Folistatina nas proporções 1:2 e 1:1.

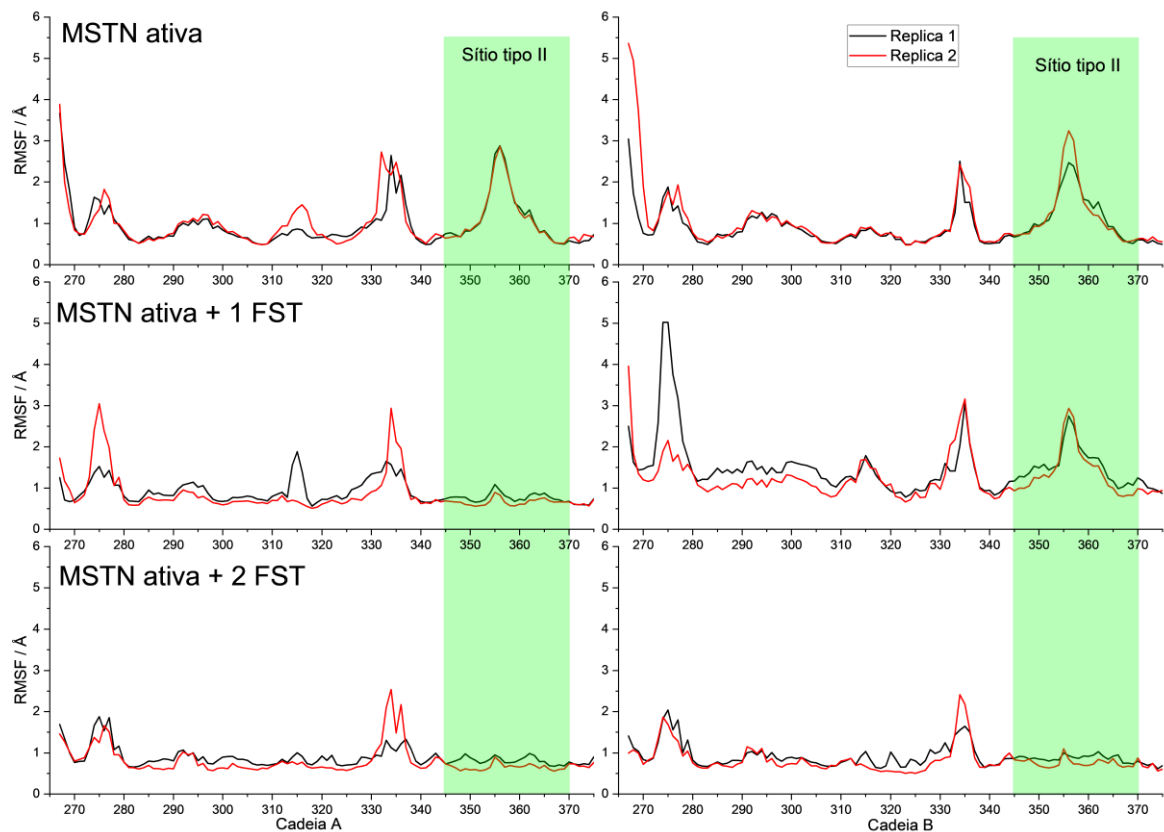


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Estrutura dos complexos da MSTN em sua forma ativa complexada na proporção 1:2 MSTN:FST (a) e complexada na proporção 1:1 MSTN:FST (b).

Todos os complexos entre a $MSTN_{ativa/inativa}$ e as diferentes proporções da FST foram construídos e simulados em condições fisiológicas. Após entrar em equilíbrio (ver Apêndice K) foram analisados os contatos entre as proteínas e as energias de estabilização advinda da formação do complexo. A Figura 14 mostra a flutuação média de cada resíduo (RMSF) da miostatina ao longo dos últimos 100 ns de simulação em diferentes sistemas, sendo a MSTN ativa livre e os complexos MSTN:FST na proporção 1:1 e 1:2. Analisando os resultados, nota-se que, assim como esperado, a presença da FST está associada a formação de diversas interações que estabilizam o complexo com a miostatina e podem ser identificadas por meio da variação da flutuação individual dos resíduos. Ao analisar o RMSF em cada sistema, alguns fenômenos se destacam ao comparar à MSTN livre com os complexos com a FST. Primeiramente, em relação as cadeias A e B da MSTN livre observa-se que há uma flutuação elevada nas regiões D267 – H275, A330 – C340 e M350 – P365, as quais estão associadas, respectivamente, a região N-terminal da MSTN, a região interna/estrutural da proteína (domínio entre a região *wrist* hélice e o *superior finger*) e ao sítio tipo II da MSTN.

Figura 14 – RMSF da MSTN ativa em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas de FST.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

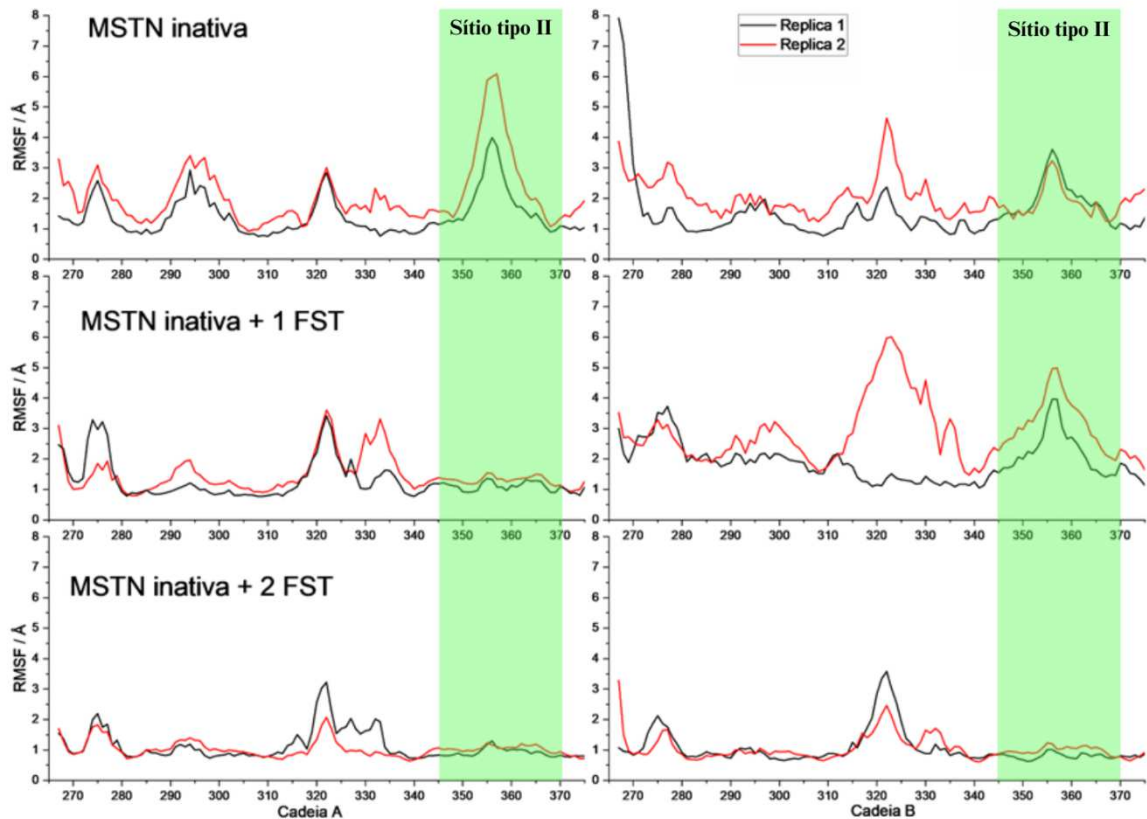
Nota: RMSF das estruturas da MSTN em sua forma ativa, complexada na proporção 1:1 MSTN:FST e complexada na proporção 1:2 MSTN:FST.

Sendo assim, em vista de avaliar se há necessidade de duas moléculas do inibidor para bloquear a miostatina, foram construídos dois complexos moleculares na proporção 1:1 e 1:2 de MSTN:FST. Na Figura 14, pode ser visto o RMSF da miostatina para os complexos com uma e duas moléculas da FST, e assim é possível comparar com a flutuação observada para proteína livre. Quanto as regiões que foram mencionadas anteriormente por apresentarem maior flutuação na miostatina livre, a região do sítio tipo II da MSTN foi a que sofreu maior efeito da complexação, o que indica que a formação do complexo com a FST gera um efeito significativo na movimentação dos resíduos nesse epítipo da miostatina. Analisando os complexos em questão, para a formação do complexo MSTN_{ativa} – FST, observou-se que a região onde a FST estava interagindo (cadeia A) sofreu uma redução significativa na flutuação dos resíduos da região do sítio do tipo II (destacado em verde) enquanto na

cadeia B esse efeito não foi observado. Ademais, para o complexo MSTN_{ativa} – FST₂ observou-se esse efeito nos sítios ativos do tipo II em ambas as cadeias, além de uma diminuição global da flutuação dos demais resíduos. Com isso, pode-se inferir que é necessário a interação com duas moléculas da FST para um total bloqueio da interação da miostatina com seus receptores. É também possível concluir que a interação com uma das moléculas do inibidor já causa um efeito significativo na MSTN ao ponto de reduzir a eficácia de sua interação com o receptor por meio de um bloqueio estérico.

Similarmente, foi complexado a miostatina em sua conformação inativa com a folistatina nas proporções 1:1 e 1:2 (Apêndice J) de forma a comparar o efeito gerado na estrutura da MSTN inativa pela folistatina, e auxiliar a entender se há preferência pela formação do complexo com a forma ativa ou inativa da MSTN. Primeiramente avaliou-se o RMSF para esses complexos, como pode ser observado na Figura 15. Similarmente ao observado na Figura 14 para a complexação com a MSTN ativa, também foram observadas as mesmas regiões com alta flutuação na miostatina, com adição para a região de wrist hélice, o que está associado à sua conformação em folha beta na MSTN inativa. Ao analisar o efeito de complexação da miostatina inativa com as moléculas da FST, observou-se a mesma redução na movimentação dos resíduos na região do sítio do tipo II da MSTN, tanto para o complexo MSTN_{inativa} – FST quanto para MSTN_{inativa} – FST₂. Sendo assim, até esse ponto pode-se inferir que, avaliando apenas o efeito estérico, a FST atua envolvendo a MSTN e interagindo majoritariamente com o sítio do tipo II de forma a bloquear a sua interação com a AcvR2B. Dessa forma, para avaliar quais resíduos que promovem essa forte interação com o sítio tipo II analisou-se o perfil de contatos da FST com a miostatina ativa e inativa nos diferentes complexos avaliados.

Figure 15 – RMSF da MSTN inativa em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas de FST.



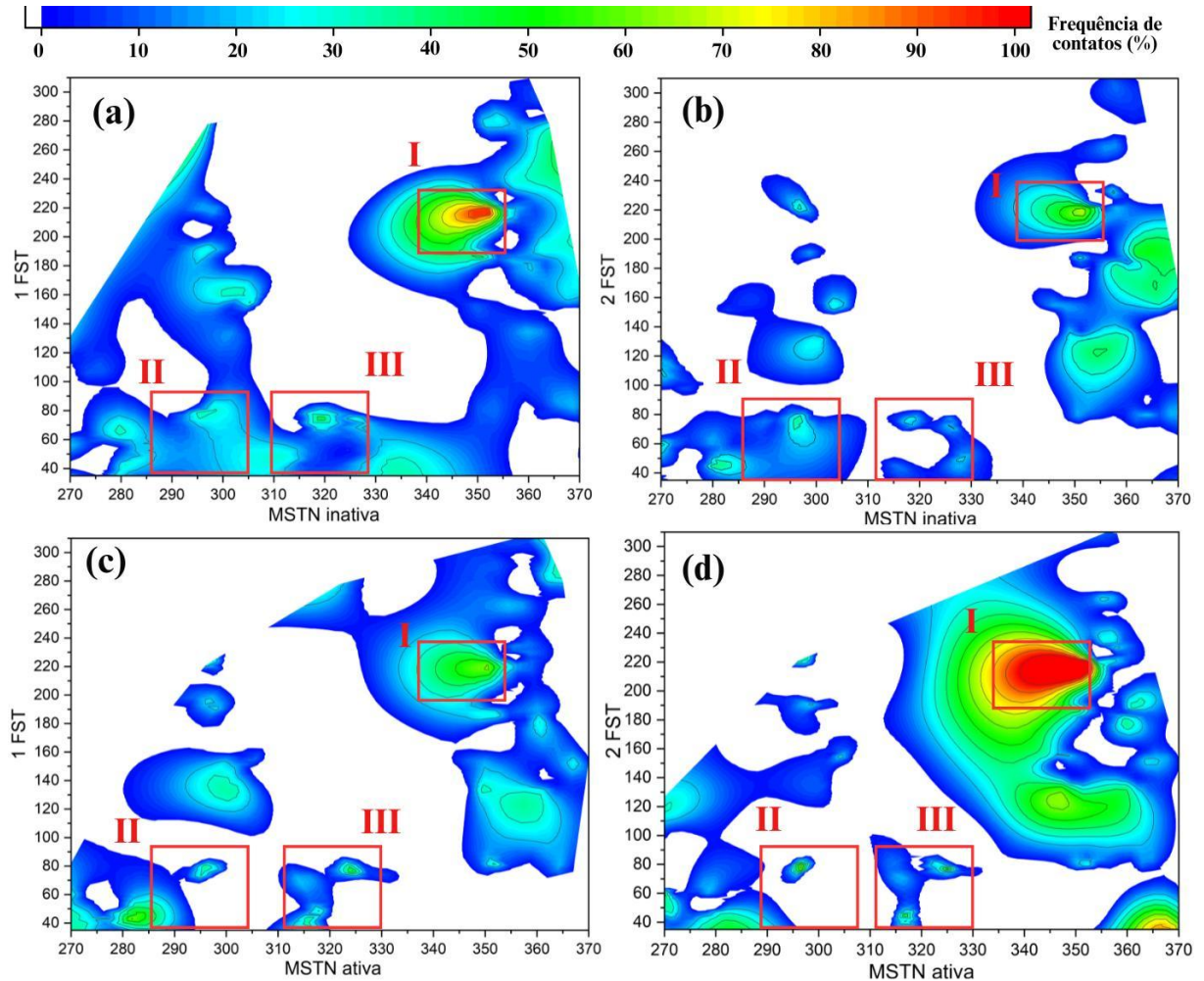
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025)

Nota: RMSF das estruturas da MSTN em sua forma inativa (a), complexada na proporção 1:1 MSTN:FST (b) e complexada na proporção 1:2 MSTN:FST.

A Figura 16 mostra o perfil de contatos nativos entre a miostatina e a FST nos diferentes complexos mostrados na Figura 13 e no Apêndice J. Comparando os quatro perfis de interação entre a MSTN e a folistatina, observa-se uma similaridade nas regiões de maior e menor contato em cada um dos complexos. Na região ND da FST (G30 – E93), observam-se interações fracas (< 30%) com todos os domínios da MSTN quando complexada em sua forma inativa (Figura 16a,b), enquanto para os complexos com a forma ativa da MSTN esses contatos se formaram em maior parte com as regiões do inferior finger e a wrist hélice. Essas diferenças nas interações se deram majoritariamente devido ao arranjo da MSTN inativa que apresenta a região de hélice em arranjo de folha beta, o que proporciona uma maior região para interação, o que se estende também a interações com o domínio FDS1. Já nos complexos com a MSTN ativa (Figura 16c,d), a região de pré/wrist hélice da MSTN está recolhida no

arranjo de alfa hélice e por isso as interações com a região ND da miostatina foram mais centradas na região III e no inferior finger.

Figure 16 – Contatos nativos entre a MSTN ativa e inativa com a FST nas proporções 1:1 e 1:2 (MSTN:FST).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Figura (a) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e inativa e 1 molécula da folistatina, (b) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN inativa e 2 moléculas da folistatina, (c) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN ativa e 1 molécula da folistatina, (d) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN ativa e 2 moléculas da folistatina. Todos os contatos foram calculados nos últimos 100ns de trajetória para cada replica. A região marcada em vermelho no perfil de contatos representa a região de interação entre o domínio FSD2 da folistatina e o sítio do tipo II da MSTN. A intensidade das cores nas figuras indica a frequência de contatos ao longo da trajetória.

Quanto aos demais contatos, tem-se que as interações de maior intensidade e duração (> 50 %) se concentraram na região de interação entre o superior finger da MSTN com o domínio FDS2 da folistatina, o qual pode ser visto na região I da Figura

16. De acordo com esse perfil de interações, é possível justificar o efeito observado nas Figuras 14 e 15 onde a região do superior finger da MSTN se tornou mais rígida ao complexar com a FST, o que pode ser associado às interações formadas com o domínio FDS2 da mesma, de forma que os resíduos travaram a sua movimentação. Além disso, ao comparar as regiões I nos quatro perfis de interação, observa-se uma maior intensidade (região vermelha == interações com duração ao longo de toda trajetória) de contatos no complexo $MSTN_{(ativa)} - FST_2$ o que mostra que a FST formou interações mais estáveis com o arranjo ativo da MSTN que o inativo, o que está de acordo com o esperado, pois todos os complexos obtidos da MSTN e homólogos com a FST observa-se a conformação ativa interagindo com o inibidor.

Além da análise de contatos, é importante avaliar o perfil de energia de interação entre a MSTN e a FST. Para isso realizou-se o cálculo da energia GBSA para todos os sistemas MSTN – FST discutidos anteriormente. A Tabela 5 mostra a energia de interação entre a MSTN ativa/inativa e a folistatina nas proporções 1:1 e 1:2. Analisando os valores de ΔG_{aq} para o complexo $MSTN_{ativa} - FST_2$ e $MSTN_{inativa} - FST_2$ foram observados valores de energia similares, sendo $-235 \pm 26 \text{ kcal mol}^{-1}$ para o complexo com a MSTN ativa e $-211 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$ para a miostatina inativa. Com isso, é possível inferir que em questão de estabilidade estrutural, a FST não apresenta diferença significativa ao complexar com a forma ativa ou inativa da MSTN, indicando que o rearranjo estrutural da MSTN para formar a α -hélice não é necessário para que a folistatina possa complexar e inibir a progressão do sinal da via. Em relação a estabilidade dos complexos $MSTN_{ativa} - FST$ e $MSTN_{inativa} - FST$ é visto um efeito similar na energia, com valores de interação de $-117 \pm 9 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-131 \pm 9 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente. Em relação aos valores absolutos, é visto que a complexação com a MSTN na proporção 1:1 é aproximadamente a metade do valor observado com a interação 1:2 indicando que as moléculas de FST não interagem entre si, de forma que a estabilização do complexo $MSTN-FST_2$ ocorre majoritariamente pelas interações entre a MSTN e a FST e não por interações entre as moléculas do inibidor.

Tabela 5 – Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para a interação MSTN – FST.

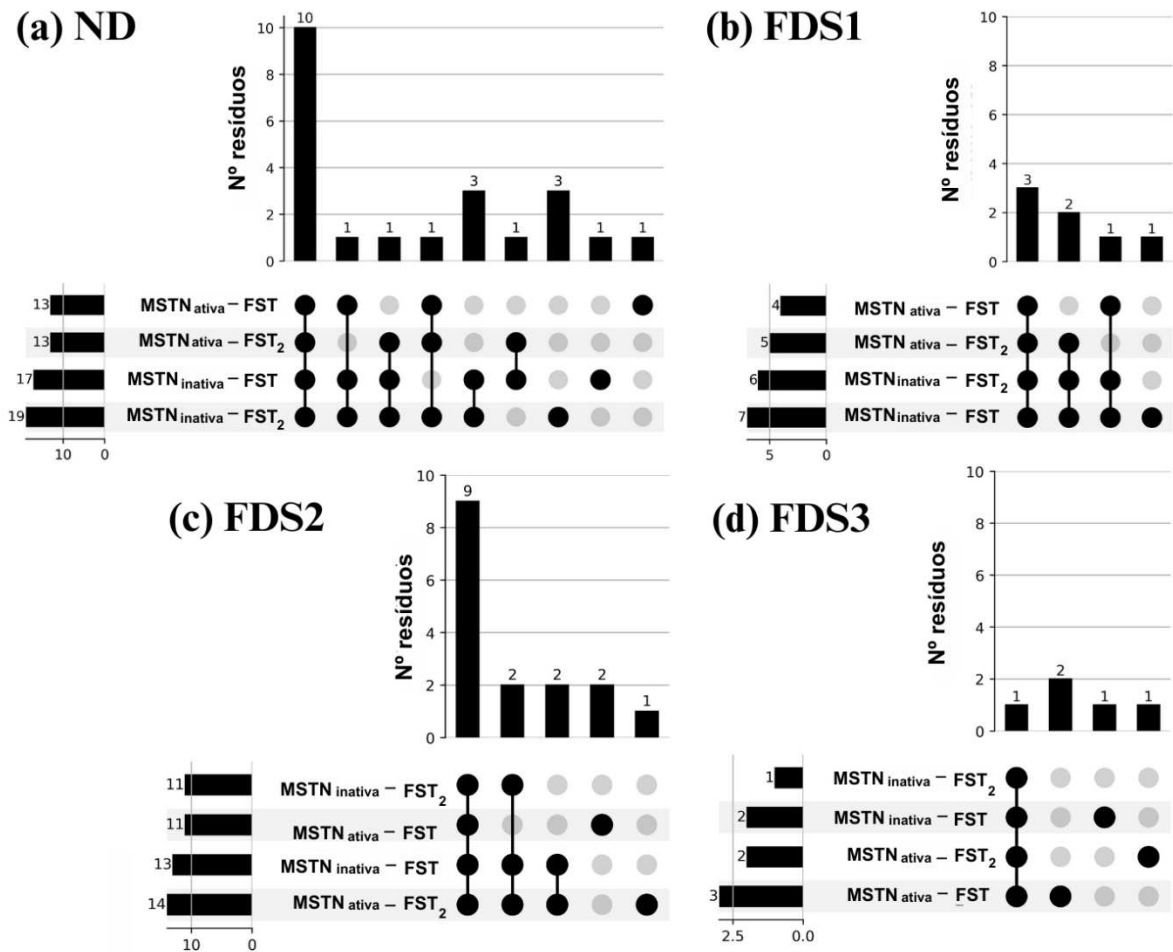
Complexos	Energia média
MSTN _{ativa} - FST ₂	-235 ± 26
MSTN _{ativa} - FST	-117 ± 9
MSTN _{inativa} - FST ₂	-211 ± 1
MSTN _{inativa} - FST	-131 ± 9

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Todos os valores de energia estão em kcal mol⁻¹. O ΔG_{aq} ($=\Delta G_{v.d.w.} + \Delta G_{ele} + \Delta G_{sol}$) representa a média da energia livre de interação, em fase aquosa, para os complexos MSTN ativa/inativa – FST nas proporções 1:1 e 1:2, respectivamente. Todas as energias foram calculadas nos últimos 100 ns da trajetória com um passo de 0,2 ns (=500 frames) e $igb = 2$ usando o método GBSA. Os valores de energia representam a média e o desvio padrão entre as duas réplicas.

Ainda em relação a energia de interação entre a FST e a MSTN nos diferentes complexos, é possível notar que o valor absoluto do ΔG_{aq} calculado não evidencia os resíduos que contribuíram para estabilizar esses complexos. Com isso, a Figura 17 mostra os hot spots para cada um dos sistemas em questão. Dessa forma é possível analisar o modo de interação entre as proteínas e as regiões que efetivamente contribuíram mantendo o complexo estável. Na Figura 17 é possível observar quatro gráficos distintos de acordo com cada região da FST. Os gráficos foram construídos com objetivo de destacar os hot spots, em cada domínio, que se mantiveram constante ao longo de todos os sistemas, com isso é possível inferir que estes são cruciais na estabilidade da interação entre a MSTN e a FST. Sendo assim, na região inferior de cada gráfico pode ser visto a relação entre os complexos e na parte superior indica quantos hot spots estão relacionados a esses complexos. A exemplo, na Figura 17a nota-se que há 10 resíduos que foram hot spots para todos os complexos, 1 hot spot simultâneo entre MSTN_{ativa} – FST, MSTN_{inativa} – FST e MSTN_{inativa} – FST₂, 3 hot spots simultâneos entre MSTN_{inativa} – FST e MSTN_{inativa} – FST₂, etc. Para mais detalhes quanto aos resíduos que atuaram como hot spot em cada complexo veja o Apêndice L.

Figura 17 – Hot spots calculados com o método MM-GBSA para todos os complexos envolvendo a interação MSTN – FST.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: A Figura mostra gráficos para cada um dos quatro domínios da FST e em quais complexos com a MSTN eles atuam como hot spots. (a) Hot spots para o domínio N-terminal, sendo que os resíduos L34, R35, L45, Y46, R60, N73, F76, K77, I80 e F81 atuaram como hot spots nos 4 complexos, os resíduos V44, M79 e K47 atuaram como hot spots em três complexos, os resíduos T48, T58, G59 e L61 atuaram como hot spots em 2 complexos e os resíduos V70, N71, L75, S62 e N82 atuaram como hot spots em apenas 1 complexo. (b) Hot spots para o domínio FDS1, sendo que L134, D135 e P154 atuaram como hot spots para todos os complexos, os resíduos R115, Q153 e E155 atuaram como hot spots em 3 complexos e o resíduo K104 atuou como hot spot em apenas 1 complexo. (c) Hot spots para o domínio FDS2, sendo que os resíduos Q183, Y188, V190, R194, L220, R221, S230, G232 e L233 atuaram como hot spots em todos os complexos, os resíduos D182 e N193 atuaram como hot spots em 3 complexos, os resíduos D182 e N193 atuaram como hot spots em 2 complexos e os resíduos T191, C192 e C225 atuaram como hot spots em apenas 1 complexo. (d) Hot spots para o domínio FDS3, apenas o resíduo E309 atuou como hot spots para todos os complexos, os resíduos S279, D280, C267 e K278 atuaram como hot spots para apenas 1 complexo. Para mais detalhes acerca de quais complexos cada hot spot está presente veja o Apêndice L.

Ao analisar os gráficos para cada complexo é possível notar claramente que os domínios ND (Figura 17a) e o domínio FDS2 (Figura 17c) apresentaram a maior

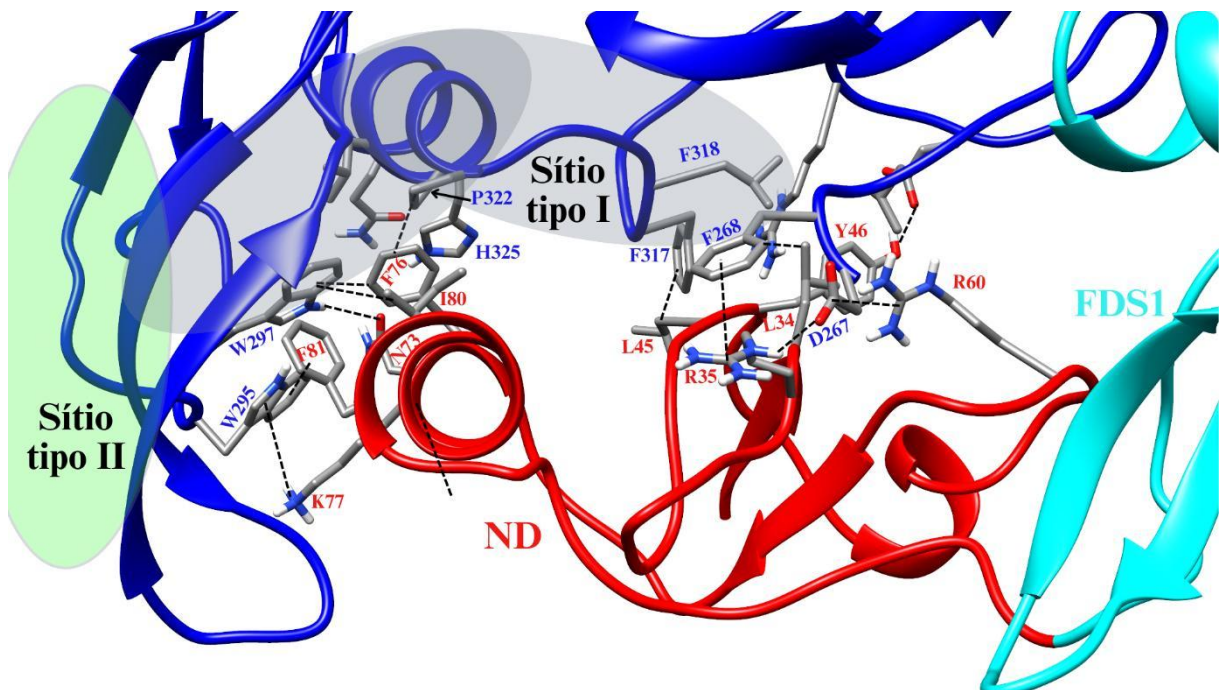
quantidade de resíduos que estabilizaram os complexos com a miostatina. Juntando todos os complexos avaliados, foram observados 62 hot spots para o domínio ND, 22 hot spots para o domínio FDS1, 49 hot spots para o domínio FDS2 e apenas 8 hot spots para o domínio FDS3. Dessa forma, nota-se que assim como foi observado nos contatos nativos na Figura 16, as regiões ND e FDS2 são os principais domínios de interação da FST e estabilizam o complexo com a MSTN. Logo, é necessário avaliar quais são os hot spots nas regiões ND e FDS2, e como ocorreu as interações que tornaram os complexos estáveis.

Primeiramente focando na Região ND da FST, nota-se que ela interage majoritariamente com a região relativa ao sítio I da MSTN (Figura 13). Como pode ser visto na Figura 17 e no apêndice Apêndice L, foram observados 10 resíduos como hot spots em todos os complexos, sendo eles L34, R35, L45, Y46, R60, N73, F76, K77, I80 e F81. Em relação a natureza dos resíduos, é interessante notar que assim como foi observado na interação forearm ($\alpha 1$) – MSTN ao longo do processo de ativação (Figura 10), os principais resíduos que estabilizaram os complexos MSTN – FST foram Leucina, Isoleucina, Arginina e tirosina. Com isso, nota-se que a forma de interação com o sítio do tipo I da MSTN se mantém aproximadamente igual entre o inibidor endógeno (folistatina) e a região N-terminal no complexo inativo (forearm). Os demais hot spots no domínio ND não se demonstram constantes em todos os complexos, no entanto é importante ressaltar que foram principalmente compostos por treonina, valina e leucinas os quais também foram observados como hot spots na região $\alpha 1$ do forearm durante o processo de ativação.

Logo, nota-se que as conclusões observadas para a natureza de inibição do sítio tipo I da MSTN se mantém com a adição das simulações com a FST. Sendo assim as interações hidrofóbicas prevalecem como a principal forma de interação com o sítio tipo I da MSTN, no entanto algumas interações de carga também se destacam, como pode ser visto na Figura 18. Ao analisar as regiões do domínio ND em que os hot spots se encontram (Figura 18), observa-se que as interações se dividem em dois blocos onde uma parte interage com a região do inferior e superior finger em conjunto com a wrist hélice enquanto a outra região interage com a região pré-hélice e o início da cadeia da MSTN. Na região que interage com o início da MSTN observam-se principalmente interações polares e de carga, com destaque para as interações $\text{cátion} - \pi$ (R35 – F268), interação de carga (R60 – D267 e R35 – D267), no entanto também são observadas interações apolares entre L45 – F317 e L34 – F268. Essas interações

auxiliam no posicionamento da FST e no bloqueio do sítio I da MSTN. Quanto a região do domínio ND que interage com a os fingers e a região de hélice, observaram-se principalmente interações apolares (F81 – W295, F81 – W297, F76 – W297, I80 – W297 e F76 – P322) da região de hélice do domínio ND com a MSTN, dentre os resíduos da FST a fenilalanina se destacou repetidamente por interagir com diversos resíduos apolares do sítio tipo I da MSTN. Além disso, assim como para a interação do forearm com a MSTN, observaram algumas interações polares entre o inferior finger da MSTN e a região de hélice do ND da FST, com destaque para as interações cátion – π dos resíduos K77 – W295 e a ligação de H dos resíduos N73 – W297.

Figura 18 – Interações entre os hot spots do domínio ND da folistatina com a MSTN.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

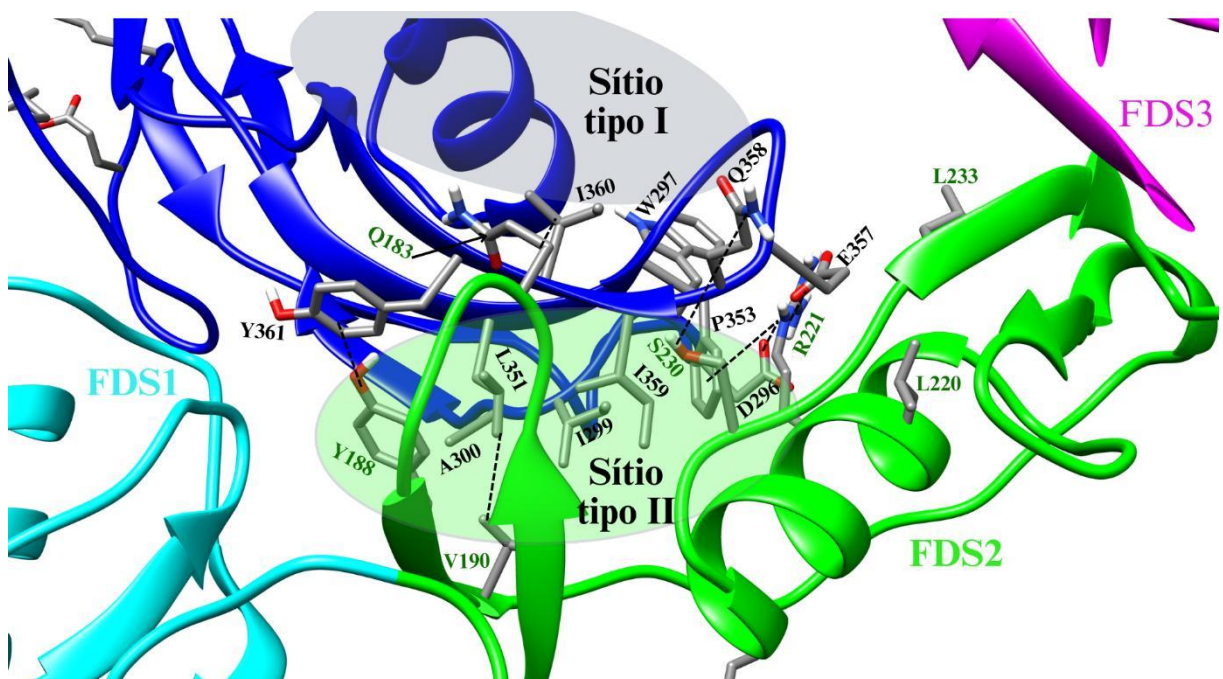
Nota: Interações observadas para os hot spots no domínio ND da FST. Os resíduos marcados em vermelho são referentes a FST, e os em azul a MSTN.

Em relação ao segundo domínio com maior número de hot spots, a região FDS2 interage majoritariamente com o sítio do tipo II da MSTN (Figura 13). Como pode ser visto na Figura 17c e no apêndice L, foram observados nove resíduos como hot spots em todos os complexos, sendo eles Q183, Y188, V190, R194, L220, R221, S230, G232 e L233. Similarmente ao observado para a interação entre o domínio ND e a MSTN, os hot spots da região FDS2 também foram similares aos observados na região $\alpha 2$ do forearm que interage com o sítio do tipo II da MSTN (Figura 10), com

destaque para os resíduos tirosina, glutamina, valina e leucina. Quanto os demais hot spots que não foram constantes em todos os complexos (Apêndice L), os principais resíduos foram cisteínas, as quais ainda não haviam sido observadas interagindo com a MSTN nos complexos relativos ao processo de ativação.

Com isso, observa-se que os resíduos do inibidor endógeno que estabilizam a interação com a miostatina são similares ao observado no processo de ativação, mantendo a natureza das interações que estabilizam o complexo. Como pode ser visto na Figura 19, a interação com o sítio do tipo II ocorre por meio de um misto de interações polares e apolares, com predominância das interações polares. Analisando as interações dispostas na Figura 19, observa-se que os hot spots da FST se encontram majoritariamente interagindo com o superior finger da MSTN como a interação entre as tirosinas Y188 – Y361, as forças de V.D.W entre a V190 – L351 e interações polares (S230 – Q358) e interações de carga (R221 – E357). Outras interações também foram observadas com o inferior finger, no entanto os principais contatos foram observados da região do superior finger, similarmente a região $\alpha 2$ do forearm.

Figura 19 - Interações entre os hot spots do domínio FDS2 da folistatina com a MSTN.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Nota: Interações entre os hot spots do domínio FDS2 da FST com a MSTN. Os resíduos em verde são referentes a FST e os resíduos em preto são referentes a MSTN.

A partir dos resultados observados, foi possível avaliar o modo de inibição da FST frente a MSTN em suas formas ativas e inativas. Com isso, foi possível mensurar o efeito da formação do complexo molecular na estrutura da MSTN, de forma que para todos os complexos, observou-se uma diminuição da mobilidade da região associada ao sítio de interação com os receptores do tipo II (Figuras 14 e 15). Além disso, foi possível medir as interações principais entre a FST e a MSTN ao longo dos complexos de forma que foi possível notar que a região FDS2 apresenta contatos muito duradouros com a miostatina, o que justifica a diminuição na flexibilidade da proteína, no entanto esses resultados não foram suficientes para definir o motivo pelo qual a FST é um inibidor endógeno muito potente para a MSTN. Logo, calculou-se a energia de interação MM-GBSA para todos os complexos, e observou-se que não há uma diferença significativa entre os complexos da FST com a miostatina ativa e inativa, de forma que o inibidor pode agir a qualquer momento em que ocorre a liberação da MSTN do prodomínio.

Por fim, com objetivo de compreender quais resíduos efetivamente estabilizam a interação com a MSTN, foi realizada a decomposição e seleção dos hot spots de todos os complexos. Com isso, foi possível observar que a interação da FST com a MSTN ocorre de forma similar ao prodomínio mantendo-a inativa, ou seja, a região ND tende a interagir com o sítio tipo I da MSTN por meio de interações majoritariamente apolares, enquanto o domínio FDS2 tende a interagir com o sítio tipo II da MSTN por meio de uma mistura de interações polares e apolar. Dessa forma, é possível concluir que inibidores da MSTN podem ser propostos de forma que interajam de forma apolar com a região do sítio I da MSTN e/ou que se ancorem no sítio II da MSTN.

4.3 Interação extracelular com os receptores transmembrana

Como foi descrito anteriormente, após a liberação da miostatina ativa no meio extracelular é possível que a proteína forme o complexo com a FST ou que a via de sinalização progrida e ocorra a interação com os receptores transmembranas. Sendo assim, foram avaliadas as principais possibilidades de interação entre a MSTN e os domínios extracelulares das proteínas AcvR2A, AcvR2B, ALK4 e ALK5 em vista de determinar os principais pontos de ancoramento da miostatina nesses receptores e a

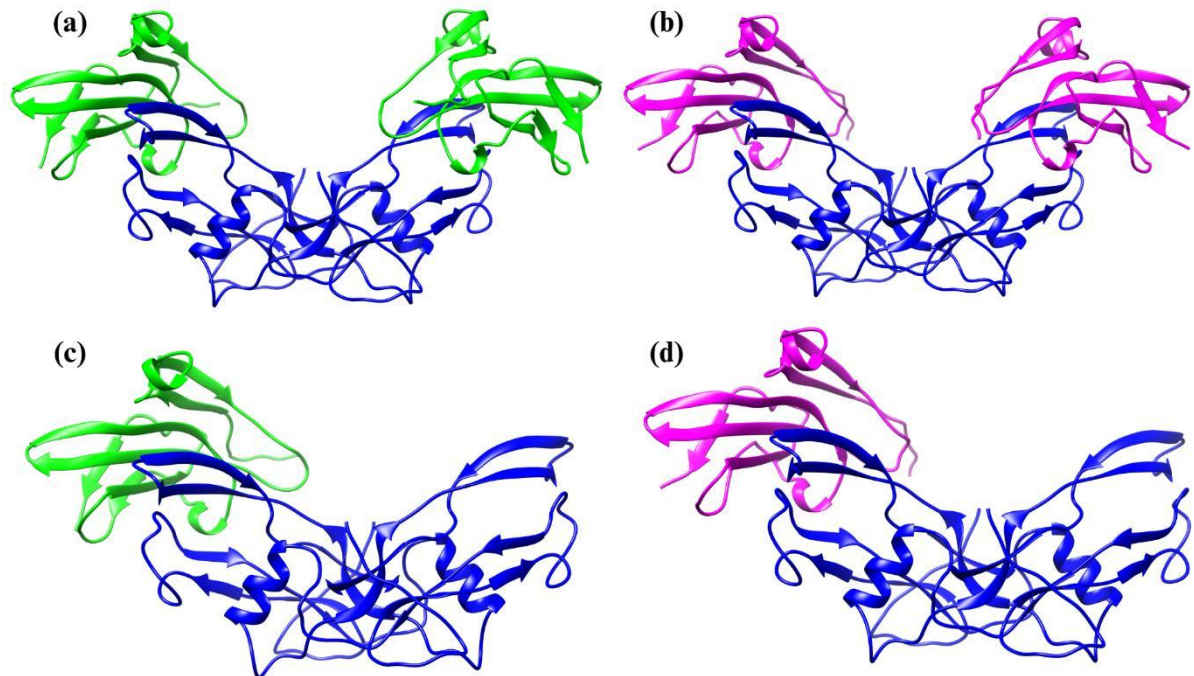
natureza da interação entre eles. Com isso, será possível propor, assim como no processo de ativação e inibição endógena, as principais interações que devem ser formadas para que um fármaco atue na inibição da miostatina.

Dessa forma foram construídos 12 complexos com objetivo de avaliar de forma isolada e conjunta as interações da miostatina com os receptores. Em vista de analisar o processo inicial da transdução do sinal, foram construídos os complexos MSTN – AcvR2A, MSTN – AcvR2A₂, MSTN – AcvR2B₂ e MSTN – AcvR2B. Além disso, apesar de não ser reportado interações entre a MSTN e os receptores do tipo I sem a presença do tipo II, foram construídos os complexos MSTN – ALK4, MSTN – ALK4₂, MSTN – ALK5₂ e MSTN – ALK5 com objetivo de buscar as principais interações entre a MSTN e esses receptores de forma a desenvolver uma base para se comparar com os sistemas completos. Por fim, foram construídos os complexos MSTN – AcvR2A₂ – ALK4₂, MSTN – AcvR2B₂ – ALK4₂, MSTN – AcvR2A₂ – ALK5₂ e MSTN – AcvR2B₂ – ALK5₂ com objetivo de representar a estrutura esperada para o efetivo modo de interação da MSTN com seus receptores.

4.3.1 Avaliação do provável modo de interação MSTN – AcvR2A/2B

Primeiramente, como foi descrito na Figura 5 espera-se que a miostatina interaja primariamente com os receptores do tipo II (AcvR2B ou 2A). Com isso, foram construídos quatro complexos com objetivo de avaliar e comparar o modo de interação da MSTN com essas proteínas. A Figura 20 mostra as estruturas de todos os complexos entre a miostatina os receptores tipo II que foram avaliados nesse estudo. Assim como para a FST foram construídos complexos nas proporções 1:1 e 1:2 (MSTN:AcvR2A/2B) em vista de avaliar a presença de algum efeito alostérico entre os sítios de interação dessas proteínas em cada cadeia. Além disso, com esses complexos foi possível comparar as diferenças entre as interações da AcvR2A e AcvR2B com a MSTN de forma a observar a preferência reportada entre os receptores.

Figura 20 – Estruturas dos complexos MSTN – AcvR2A, MSTN – AcvR2A₂, MSTN – AcvR2B₂ e MSTN – AcvR2B.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

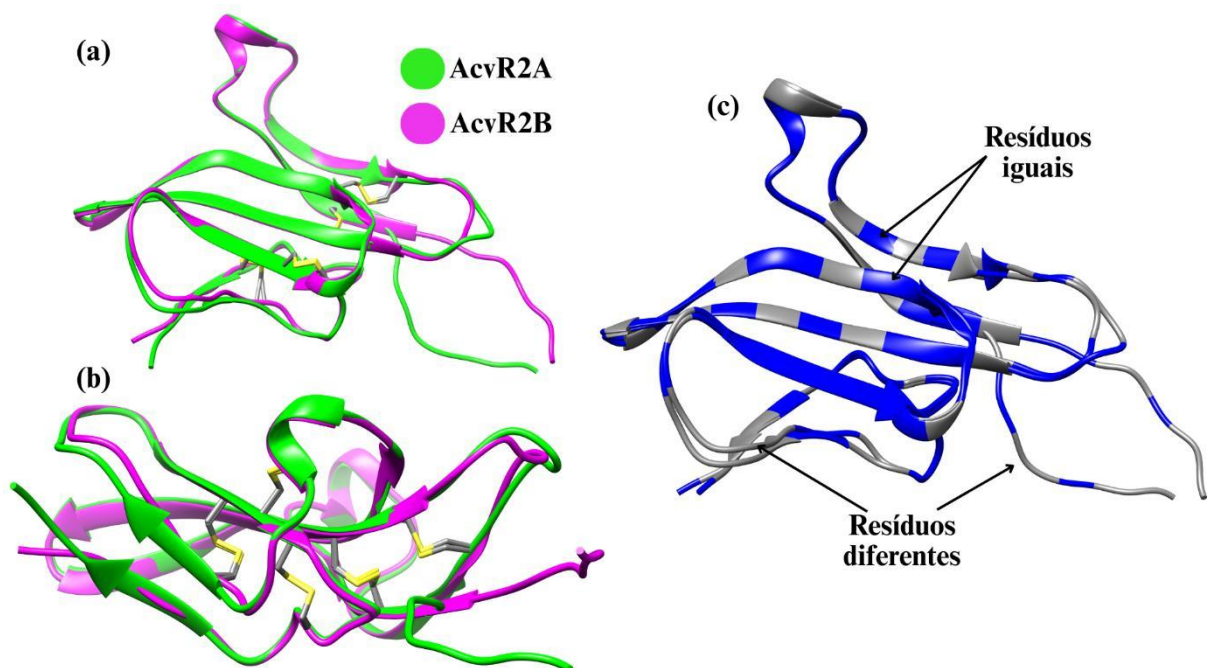
Nota: Estrutura dos complexos iniciais formados entre a MSTN e os receptores de activina do tipo II nas proporções 1:1 e 1:2. (a) complexo MSTN – AcvR2A₂, (b) complexo MSTN – AcvR2B₂, (c) complexo MSTN – AcvR2A e (d) complexo MSTN – AcvR2B.

Como pode ser visto na Figura 20, não há diferença significativa entre o arranjo terciário expresso pelos domínios extracelulares das proteínas AcvR2B (Roxo) e AcvR2A (Verde). No entanto, diversos trabalhos destacam que, diferentemente de outros membros da superfamília TGF- β , há uma diferença significativa entre a afinidade da MSTN pela AcvR2A e AcvR2B, sendo que o complexo MSTN – AcvR2B é mais estável e apresenta maior probabilidade de ser formado no meio biológico (Bonnieu; Carnac; Vernus, 2007; Morvan et al., 2017; Rebbapragada et al., 2003). Dessa forma, é necessário comparar as sequências primárias de ambas as proteínas de forma a avaliar as diferenças entre cada sítio de interação dos receptores com a miostatina.

Em relação ao modo de interação da AcvR2A e AcvR2B, ambas interagem com o epítipo convexo da MSTN (sítio tipo II) de forma que a posição e a região de contato com a MSTN não justificam a diferença da força de interação dessas proteínas. Com isso, a Figura 21a,b apresenta uma comparação entre os arranjos terciários das proteínas de forma que fica evidente a similaridade estrutural das mesmas (RMSD =

0,485 Å), inclusive o arranjo das ligações dissulfeto, de forma que o modo de interação com a MSTN será muito similar para ambas as proteínas. Já a Figura 21c mostra uma comparação entre a sequência primária da AcvR2A (Figura 4c) e AcvR2B (Figura 4b), com destaque para a moderada identidade (60%) entre as sequências proteicas. Ao analisar a Figura 21c, as regiões em azul indicam que os resíduos são iguais e em cinza são diferentes, com isso nota-se que os resíduos localizados nas folhas beta são mais conservados enquanto os resíduos nas regiões de conexão são diferentes. Dessa forma, tem-se que pela comparação estrutural não é claro o motivo da diferença da força de interação entre a MSTN a AcvR2B e a AcvR2A, de forma que será necessário avaliar os perfis de interação dos complexos em vista de encontrar se os resíduos que se diferem entre as proteínas são cruciais para a efetiva interação dos receptores transmembrana com a miostatina humana.

Figura 21 – Comparação entre as estruturas e o arranjo espacial da AcvR2A e AcvR2B.



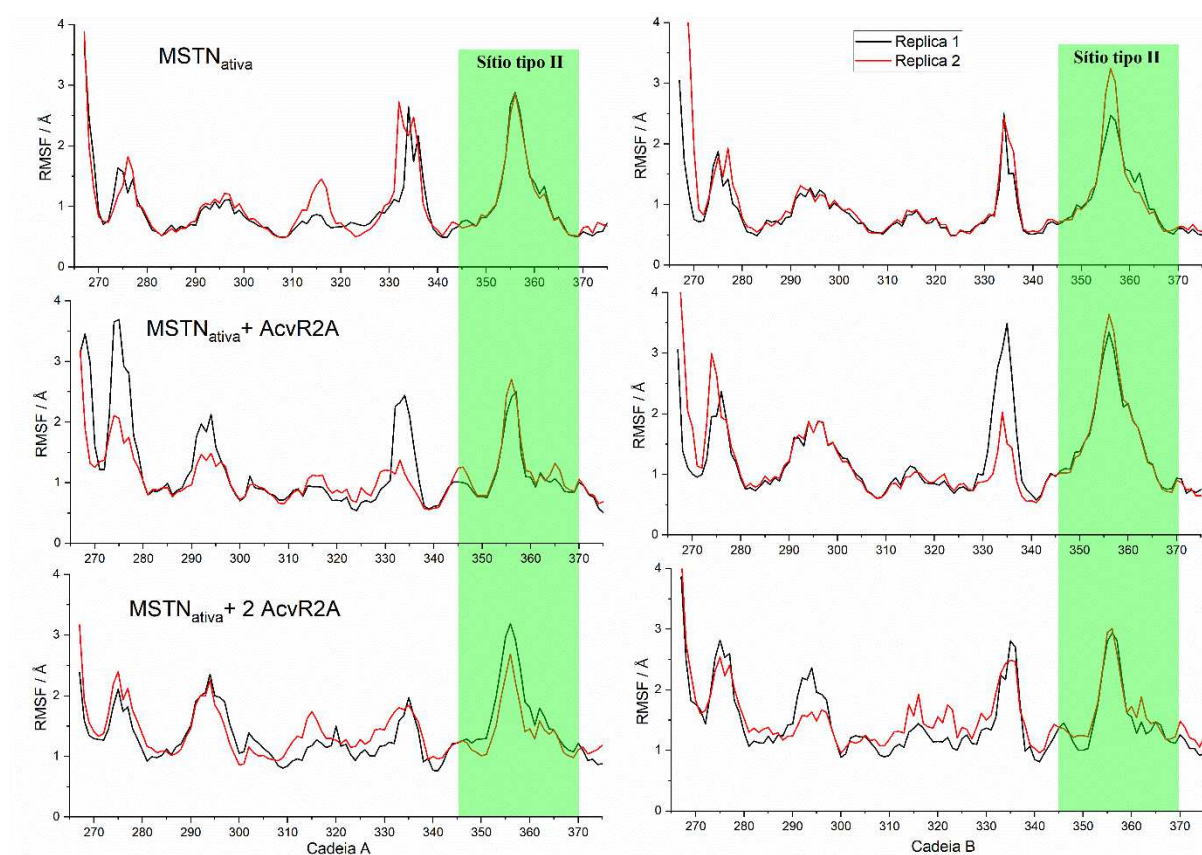
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: As figuras (a) e (b) mostram o alinhamento entre as estruturas das proteínas AcvR2A e AcvR2B. (c) mostra a conservação dos resíduos ao comparar entre as proteínas.

Dessa forma, buscou-se avaliar se a formação dos complexos com o receptor estaria associada ao aumento da rigidez dos resíduos no sítio de interação com a miostatina, similarmente ao observado nos complexos com a FST. A Figura 22 mostra

a flutuação média de cada resíduo da MSTN em sua forma livre, no complexo MSTN – AcvR2A e no complexo MSTN – AcvR2A₂. Ao analisar os gráficos da Figura 22 é possível notar que, diferentemente dos complexos da MSTN com a FST, a interação do receptor AcvR2A com a MSTN não foi associada a um decréscimo da flutuação dos resíduos no sítio II, ou seja, a interação com o receptor não demonstrou formar fortes contatos com esse sítio de forma a bloquear a movimentação dos resíduos. A partir desses resultados, já é possível propor que a afinidade do complexo MSTN – AcvR2A é baixa, pois a interação entre as proteínas não causou mudança significativa nas regiões da miostatina onde o receptor interage. Com isso, é necessário comparar esse efeito observado com o efeito da AcvR2B nos resíduos dessa região ao complexar com a MSTN.

Figura 22 – RMSF da MSTN em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas de AcvR2A.

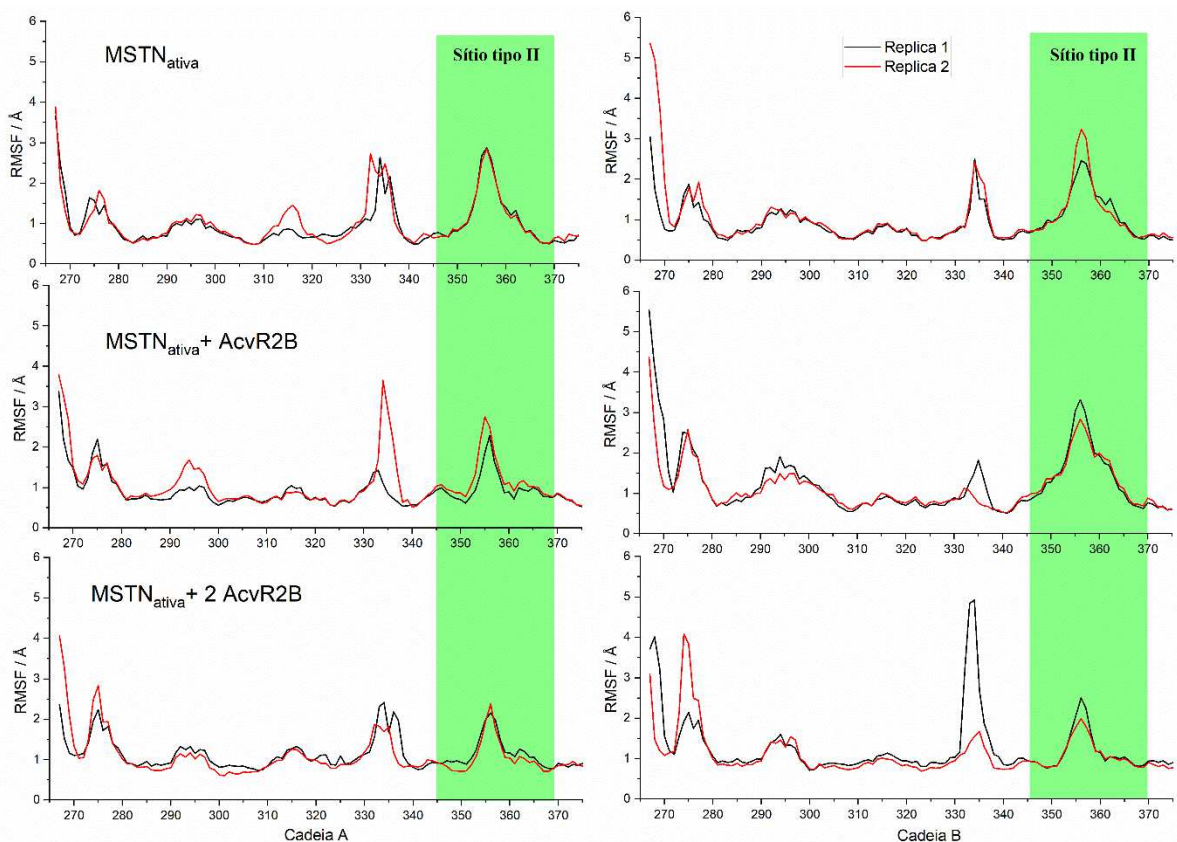


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: RMSF das estruturas da MSTN em sua forma ativa livre, complexada na proporção 1:1 MSTN:AcvR2A (Figura 20c) e complexada na proporção 1:2 MSTN:AcvR2a (Figura 20a).

Sendo assim, a Figura 23 mostra a flutuação média (RMSF) dos resíduos da MSTN livre e nos complexos MSTN – AcvR2B e MSTN – AcvR2B₂. Ao analisar os gráficos na Figura 23 é possível notar uma leve diminuição na flutuação dos resíduos na região do sítio do tipo II na cadeia A do complexo MSTN – AcvR2B, enquanto para o complexo MSTN – AcvR2B₂ é possível observar uma diminuição mais significativa da flutuação dos resíduos nessa região. Dessa forma é possível supor que a AcvR2B está interagindo com o sítio tipo II da MSTN de forma mais eficiente que a AcvR2A, e menos eficiente do que o domínio FDS2 da FST. Sendo assim, espera-se que os contatos entre a MSTN e o receptor do tipo IIB sejam mais intensos do que com o receptor IIA, o que corrobora os resultados experimentais de maior afinidade da MSTN pela AcvR2B. Além disso, a partir desses resultados é possível começar a desenvolver a hipótese de que a interação com o inibidor endógeno FST é favorecida ao comparar com a interação direta com os receptores.

Figura 23 – RMSF da MSTN em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas de AcvR2B.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

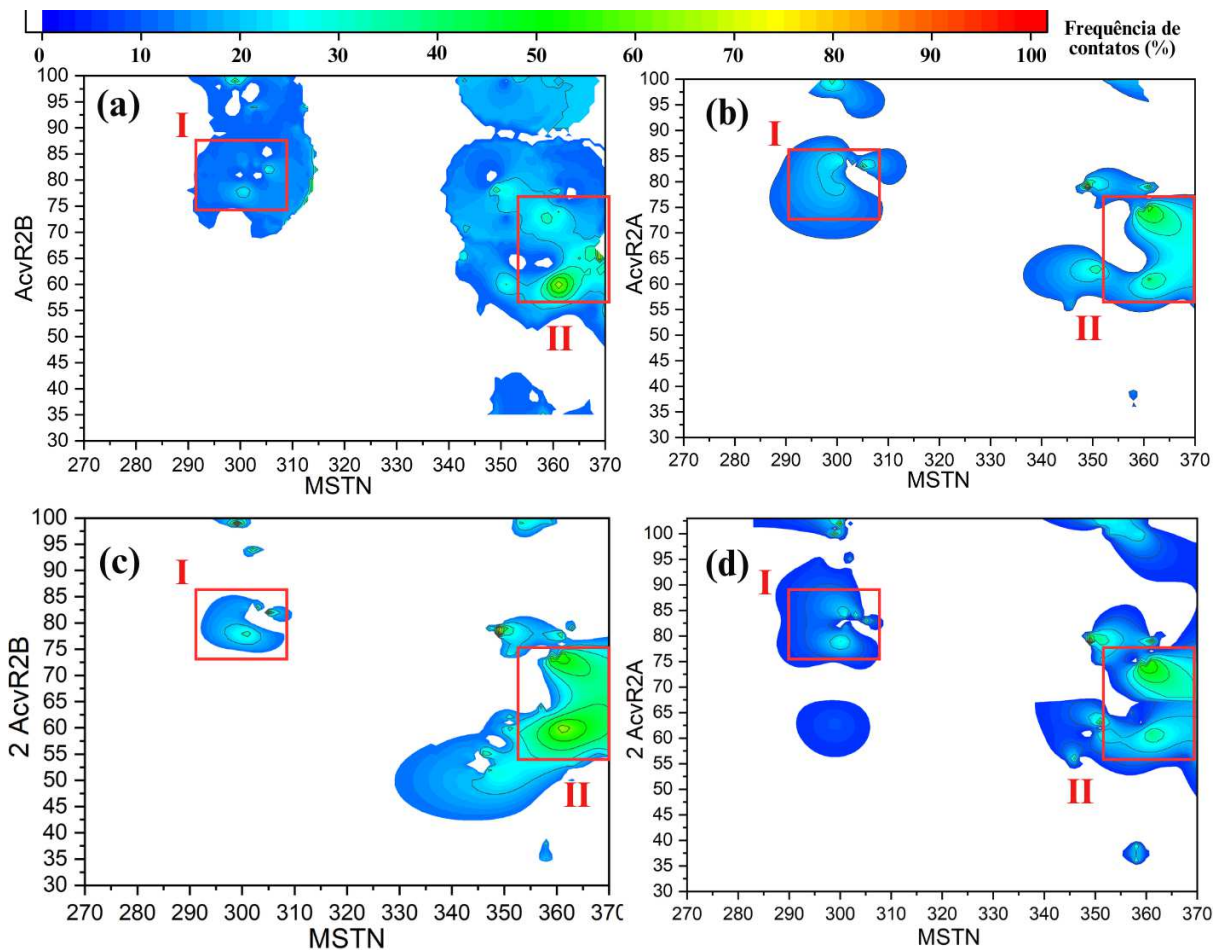
Nota: RMSF das estruturas da MSTN em sua forma ativa livre, complexada na proporção 1:1 MSTN:AcvR2B (Figura 20d) e complexada na proporção 1:2 MSTN:AcvR2B (Figura 20b).

De acordo com os resultados obtidos a partir dos gráficos de RMSF para os complexos entre a miostatina e os receptores do tipo II, é notável a necessidade da avaliação do perfil de contatos entre essas proteínas, de forma a corroborar a baixa influência dos receptores no perfil de movimentação dos resíduos da MSTN nos complexos em questão. Sendo assim, com objetivo de desvendar as principais regiões de interação entre as proteínas e a miostatina, realizou-se a análise de contatos nativos entre os receptores e a MSTN para todos os complexos da Figura 20. A Figura 24 mostra os contatos nativos entre a miostatina e os receptores com ênfase nas principais regiões em que foram observadas interações. Ao analisar os perfis de interação entre essas proteínas foi possível destacar duas regiões principais em todos os quatro gráficos, sendo a região I focada na interação entre o inferior finger da MSTN (F290 – S310) com a região final dos receptores e a região II focada na interação entre o superior finger da MSTN (M350 – D370) e a região central dos receptores. Dessa forma, é possível analisar os principais contatos que foram observados em cada complexo em vista de comparar os tipos majoritários de interação para cada receptor.

Em relação aos perfis de contatos observados na Figura 24, é possível notar uma diferença significativa entre os complexos com o a AcvR2B (Figuras 24a,c) dos complexos com a AcvR2A (Figuras 24b,d), onde é visto nos primeiros uma maior densidade de contatos de baixa intensidade (< 40% - azul ao ciano) em conjunto com contatos de maior duração na região II. Com isso já é possível observar alguns fatores que estabilizam o complexo com a AcvR2B em detrimento da AcvR2A, pois apesar de serem poucos contatos e com baixo tempo de vida, essas interações auxiliam na manutenção do complexo com o receptor e consequentemente em sua estabilidade. Dessa forma é necessário analisar as regiões I e II em busca de compreender as diferenças entre as interações de cada um dos receptores. Em relação a região I, como foi discutido anteriormente, ela compreende a região entre o inferior finger da MSTN e a região final do domínio extracelular da AcvR2A/2B, de forma que são observadas poucas interações, com destaque principal para o contato hidrofóbico entre os resíduos A300 (MSTN) com F102 (AcvR2A) o qual se manteve por aproximadamente 40% do tempo de simulação, e a interação entre os resíduos P299 (MSTN) e D99 (AcvR2B) a qual durou por aproximadamente 77% do tempo de simulação. Com isso, é possível observar que apesar dessa região não possuir interações muito relevantes na estabilização do complexo, a AcvR2B forma contatos

mais duradouros que a AcvR2A, o que pode vir a influenciar na estabilidade do sistema.

Figure 24 - Contatos nativos entre a MSTN ativa com as proteínas AcvR2A e AcvR2B nos complexos MSTN – AcvR2A, MSTN – AcvR2A₂, MSTN – AcvR2B₂ e MSTN – AcvR2B.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Figura (a) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e 1 molécula da AcvR2B, (b) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e 1 molécula da AcvR2A, (c) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e 2 moléculas da AcvR2B, (d) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e 2 moléculas da AcvR2A. A intensidade das cores nas figuras indica a frequência de contatos ao longo da trajetória.

Analisando a Figura 24, é nítida a diferença entre a magnitude dos contatos da miostatina com a AcvR2B ao comparar com a AcvR2A, de forma que as interações são mais intensas e de maior duração com a AcvR2B. A região II na Figura 24 mostra a interação dos receptores com o superior finger da MSTN. Em relação aos contatos observados, notou-se uma concentração mista de interações polares e apolares,

como ocorreu nos complexos com a FST, e no processo de ativação com a região $\alpha 2$ do forearm. Quanto as principais interações que foram observadas se destacam a ligação de H entre o resíduo N36 da AcvR2A com a carbonila da cadeia principal da I350 da MSTN, e interações apolares entre a I359 da MSTN e a V73 da AcvR2B. Dessa forma é possível associar a menor duração das interações observadas na região II dos complexos da MSTN com a AcvR2B com a diminuição da movimentação dos resíduos na região do sítio tipo II. No entanto, apesar da diversidade de interações que foram observadas a mais entre a AcvR2B e a MSTN, é necessário avaliar a estabilidade energética dos complexos de forma a buscar entender a maior afinidade de complexação da miostatina entre as duas proteínas.

Em vista de analisar a diferença de interação entre os receptores e a MSTN, foram calculadas as energias GBSA para interação entre as proteínas em cada complexo. A Tabela 6 mostra as energias livres para a interação MSTN-receptor nos complexos MSTN-AcvR2A₂, MSTN-AcvR2A, MSTN-AcvR2B₂ e MSTN-AcvR2B. Assim como é observado experimentalmente, a interação entre a MSTN e a AcvR2B é mais favorável do que com a AcvR2A em ambas as proporções avaliadas. Nas simulações realizadas observou-se que a afinidade do complexo MSTN-AcvR2B₂ ($\Delta G_{\text{aq}} = -84 \pm 4 \text{ kcal mol}^{-1}$) é aproximadamente o dobro do observado para o complexo MSTN-AcvR2A₂ ($\Delta G_{\text{aq}} = -45 \pm 2 \text{ kcal mol}^{-1}$). Esse mesmo fenômeno se repete para os complexos na proporção 1:1. Sendo assim, é possível inferir que apesar da similaridade na expressão terciária que as proteínas expressam, as interações específicas que realizam com o sítio do tipo II da MSTN são duas vezes mais efetivas com o receptor AcvR2B do que com o AcvR2A.

Tabela 6 – Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para a interação MSTN e AcvR2A/2B.

Complexos	Energia média
MSTN-AcvR2A ₂	-45 ± 2
MSTN-AcvR2A	-22 ± 0
MSTN-AcvR2B ₂	-84 ± 4
MSTN-AcvR2B	-40 ± 14

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Todos os valores de energia estão em kcal mol⁻¹. O ΔG_{aq} ($=\Delta G_{\text{v.d.w.}} + \Delta G_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{sol}}$) representa a média da energia livre de interação, em fase aquosa, para os complexos MSTN – AcvR2A/2B nas proporções 1:1 e 1:2. Todas as energias foram calculadas nos últimos 100 ns da trajetória com um passo de 0,2 ns (=500 frames) e igb = 2 usando o método MM-GBSA.

Além disso, também é possível comparar os complexos nas diferentes proporções. Onde nota-se um efeito similar ao observado para o inibidor FST, em que neste caso os receptores não apresentam nenhum efeito alostérico na interação do outro com a miostatina. Ao analisar os complexos MSTN-AcvR2A e MSTN-AcvR2B, foram observados energia de interação de -22 ± 0 kcal mol⁻¹ e -40 ± 14 kcal mol⁻¹, respectivamente, as quais são aproximadamente a metade das observadas para os complexos MSTN-AcvR2A₂ ($\Delta G_{\text{aq}} = -45 \pm 2$ kcal mol⁻¹) e MSTN-AcvR2B₂ ($\Delta G_{\text{aq}} = -84 \pm 4$ kcal mol⁻¹). Dessa forma é possível reforçar a ausência de efeito alostérico entre os sítios da MSTN. Também é importante ressaltar a diferença entre as energias de interação da miostatina com o receptor AcvR2B ($\Delta G_{\text{aq}} = -84 \pm 4$ kcal mol⁻¹) e a FST ($\Delta G_{\text{aq}} = -235 \pm 26$ kcal mol⁻¹) em seus complexos finais, indicando que a afinidade com o inibidor endógeno é favorecida em detrimento do receptor. Essa conclusão também é vista ao comparar com a interação 1:1 da MSTN com a FST.

Com auxílio da energia GBSA foi possível confirmar a afinidade esperada entre a miostatina e os receptores, no entanto até esse ponto ainda não foi possível justificar essa diferença de afinidade para a interação com cada um dos receptores do tipo II. Sendo assim, foram analisados os hot spots presentes em cada um dos complexos de forma avaliar a natureza das interações majoritárias entre a miostatina e cada receptor. O Quadro 3 mostra os resíduos que atuaram como hot spots, nos receptores, em todos os complexos avaliados. Ao analisar o Quadro 3 nota-se que para os complexos com a AcvR2A apenas os resíduos N36 e K95 não apareceram em ambos os complexos, e para os sistemas com a AcvR2B apenas o L38 não se manteve em

ambos, de forma que é possível concluir que os hot spots observados são cruciais para qualquer interação entre os receptores e a MSTN.

Quadro 3 – Hot spots calculados, usando o método MM-GBSA, para a interação entre a MSTN e as proteínas AcvR2A e AcvR2B.

Complexos	Hot spots
MSTN – AcvR2A ₂	N36 F61 W79 L80 I83 N84 K95 V100 F102
MSTN – AcvR2A	F61 W79 L80 I83 N84 V100 F102
MSTN – AcvR2B ₂	N35 Y60 R64 V73 C77 W78 L79 F82 N83 E94 V99 F101
MSTN – AcvR2B	N35 L38 Y60 R64 V73 C77 W78 L79 F82 N83 E94 V99 F101

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Todos os cálculos foram realizados para a interação MSTN e os receptores AcvR2A e AcvR2B nos complexos MSTN-AcvR2A₂, MSTN-AcvR2A, MSTN-AcvR2B₂ e MSTN-AcvR2B. Os resíduos selecionados como hot spots apresentam contribuição para o $\Delta G_{aq} \leq -1$ kcal mol⁻¹. Todos os hot spots destacados nesta tabela estão nos receptores. Todas as análises foram realizadas nos últimos 100 ns da trajetória para cada replica. O cálculo MM-GBSA foi feito usando um passo de 0.2 ns (=500 frames) e igb=2.

Em relação aos hot spots observados nos complexos com os receptores, fica evidente a diferença entre a AcvR2B e a AcvR2A quanto a capacidade de formar interações cruciais para manter o complexo estável. Considerando a forma final da interação com os complexos MSTN – AcvR2A₂ e MSTN – AcvR2B₂, nota-se que o primeiro apresentou 10 hot spots enquanto o segundo apresentou 12. Esses resultados, em conjunto com tudo o que foi discutido até esse ponto com os contatos nativos, a energia GBSA, o RMSF e o arranjo terciário, entra em acordo com a evidência experimental de que há um favorecimento para a formação do complexo MSTN – AcvR2B₂ em detrimento do outro. De forma que, essa preferência de interação com o receptor do tipo IIB pode ser associada a uma série de pequenos fatores que juntos auxiliam a tornar o complexo mais estável. No entanto, apesar da AcvR2A apresentar menos hot spots com a MSTN, as interações que são formadas são fortes, duradouras e apresentam a mesma natureza de contato que a AcvR2B de forma que também podem ser usadas como base na proposta de um farmacóforo para drogas com alvo no sítio II da MSTN. Para mais detalhes dessas interações entre a MSTN e a AcvR2A veja o Apêndice M.

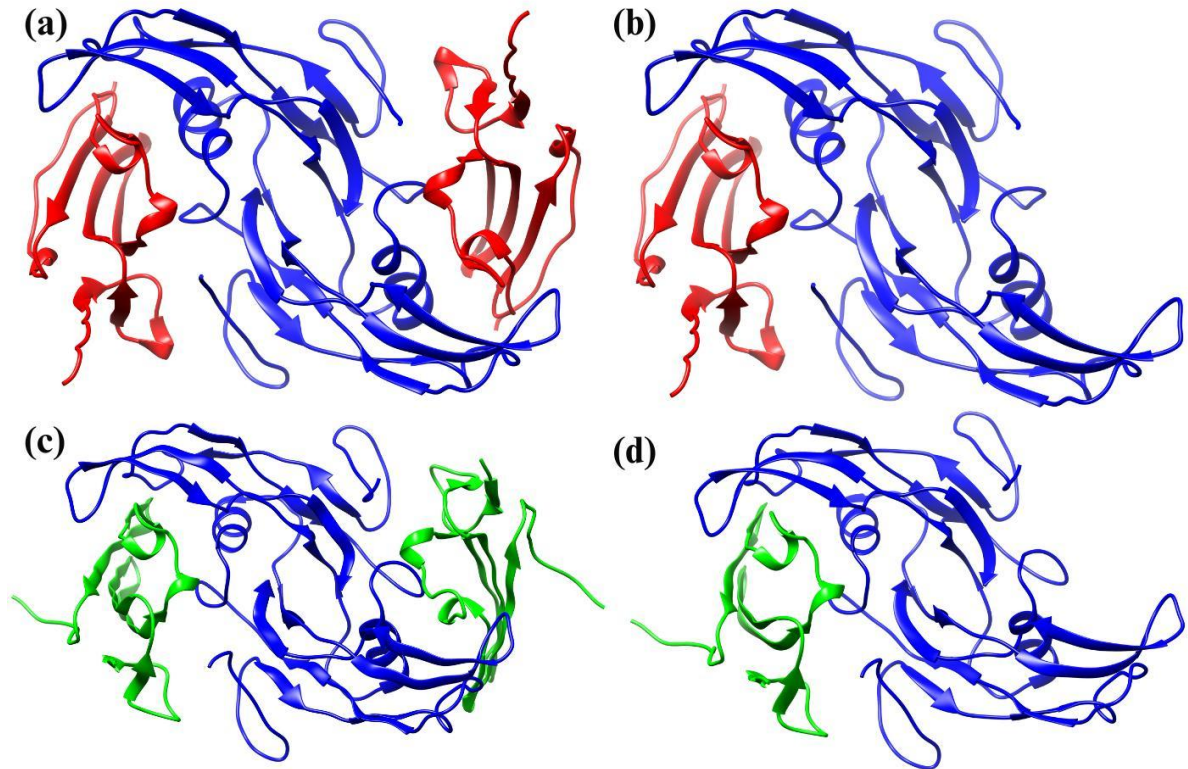
Logo, de acordo com as informações apresentadas, foi possível elucidar os principais fatores que diferenciam a afinidade da miostatina pelos receptores AcvR2A

e AcvR2B. Embora ambas as proteínas apresentem uma alta similaridade estrutural (RMSD = 0,485 Å), os resultados de energia livre (MM-GBSA) corroboram as evidências experimentais de que a miostatina possui preferência por interagir com a AcvR2B, apresentando uma afinidade aproximadamente duas vezes superior em comparação à AcvR2A. Esta estabilidade é justificada pela maior duração dos contatos nativos entre o superior finger da MSTN e os receptor (Figura 24a,c – região II) e pela identificação de um maior número de *hot spots* com a AcvR2B (12 resíduos). Adicionalmente, a proporcionalidade energética observada entre os complexos 1:1 e 1:2 confirmou a ausência de efeitos alostéricos entre os sítios de ligação, indicando que as interações ocorrem de forma independente e cooperativa. Além disso, também é importante ressaltar que a afinidade calculada pelo receptor AcvR2B é 65% menor do que pela FST, de forma que seria esperado a formação única do complexo da miostatina com o inibidor. No entanto, como há evidências experimentais de que a MSTN interage com o receptor mesmo na presença do inibidor endógeno, é possível que a cinética para a formação do complexo MSTN – FST₂ seja lenta, apesar da termodinâmica ser favorecida. Por fim, esses resultados forneceram um mapa detalhado dos resíduos essenciais para a estabilização dos complexos entre a MSTN e os receptores do tipo II, os quais podem ser usados como base para o desenho racional de fármacos direcionados ao sítio II da miostatina.

4.3.2 Avaliação do provável modo de interação MSTN – ALK4/5

Similarmente ao estudo realizado com os complexos entre a miostatina e os receptores do tipo II, foram construídos os complexos entre a MSTN e os receptores do tipo I nas proporções 1:1 e 1:2 (MSTN:receptor). Como foi descrito na Figura 5, não é esperado que a MSTN interaja com os receptores do tipo I na ausência dos receptores do tipo II. No entanto, para ter um bom referencial acerca das interações entre a MSTN e a ALK4/5 sem a influência dos outros receptores, foram construídos os complexos MSTN – ALK4, MSTN – ALK4₂, MSTN – ALK5 e MSTN – ALK5₂, como pode ser visto na figura 25. Em relação a interação entre a MSTN e os receptores do tipo I, não há evidências de uma preferência da MSTN por interagir com algum dos receptores como é visto na complexação com os receptores do tipo II. Sendo assim, espera-se que todas as interações observadas possam ser consideradas como promissoras referências a construção do modelo de inibidor.

Figura 25 – Estruturas dos complexos MSTN – ALK4, MSTN – ALK4₂, MSTN – ALK5 e MSTN – ALK5₂.

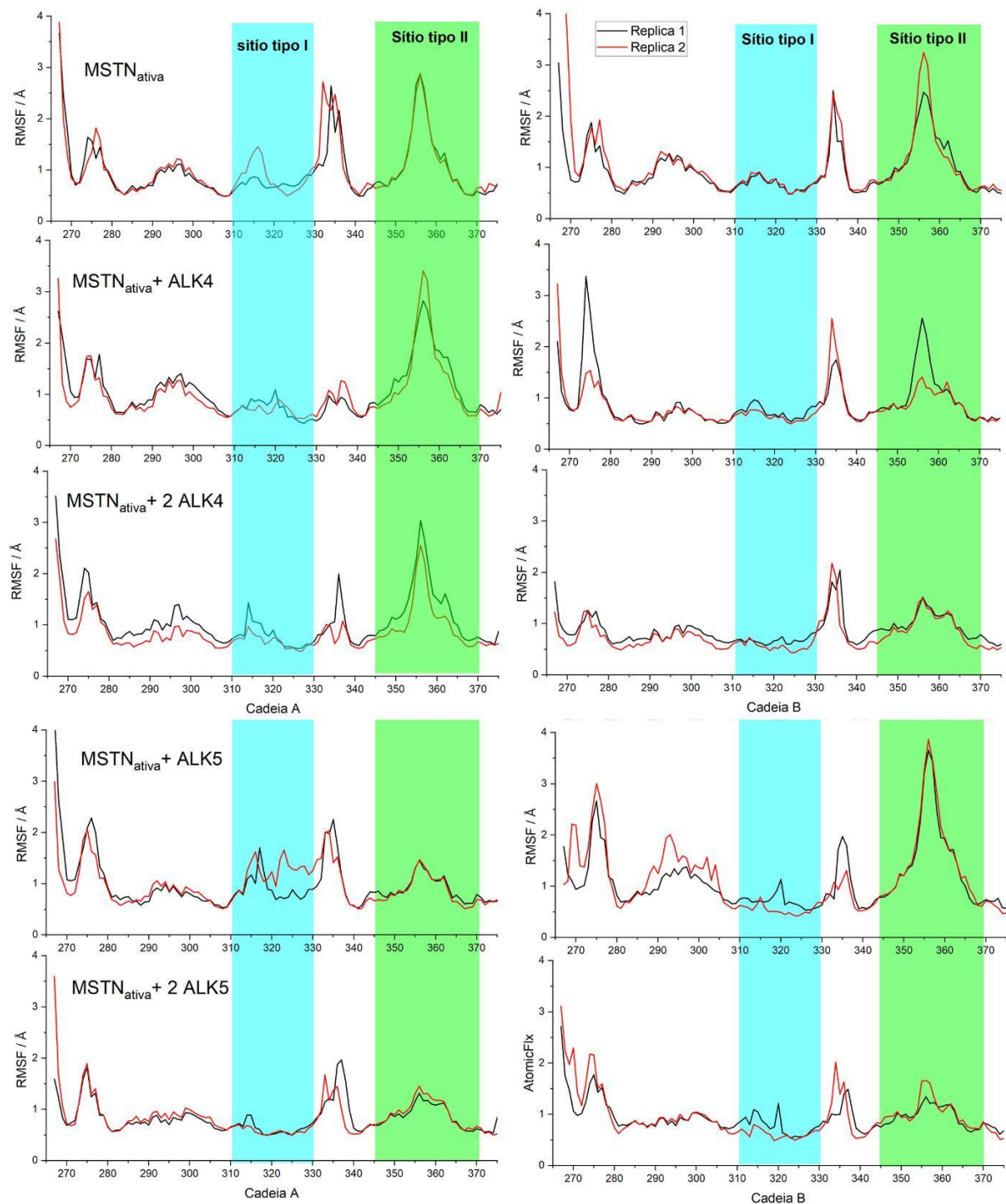


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Estrutura dos complexos iniciais formados entre a MSTN e os receptores de activina do tipo I nas proporções 1:1 e 1:2. (a) complexo MSTN – ALK5₂, (b) complexo MSTN – ALK5, (c) complexo MSTN – ALK4₂ e (d) complexo MSTN – ALK4.

Primeiramente, de forma similar aos complexos com os receptores do tipo II foi analisado o RMSF para os complexos da miostatina com os receptores do tipo I. Como foi discutido anteriormente, e como pode ser visto na Figura 25, a ALK4 e a ALK5 interagem com a MSTN na região côncava, a qual compreende o sítio tipo I da miostatina, as regiões internas dos fingers e a região pré-hélice. Dessa forma é esperado que a interação com os receptores forme contatos capazes de alterar a flexibilidade dos resíduos da MSTN, ou seja, diminuir o RMSF. Com isso, a Figura 26 mostra os gráficos de RMSF para todos os complexos da miostatina com os receptores AcvR2A e AcvR2B.

Figura 26 - RMSF da MSTN em sua forma livre, complexada com uma e duas moléculas da AcvR2B e AcvR2A.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: RMSF das estruturas da MSTN em sua forma ativa livre, complexada na proporção 1:1 MSTN:ALK4/5 e complexada na proporção 1:2 MSTN:ALK4/5.

Analisando o perfil dos gráficos de RMSF, estão em destaque duas regiões principais em azul (sítio tipo I) e verde (sítio tipo II), onde é esperado que ocorra a interação dos receptores do tipo I. Em relação aos complexos com a ALK4, nota-se

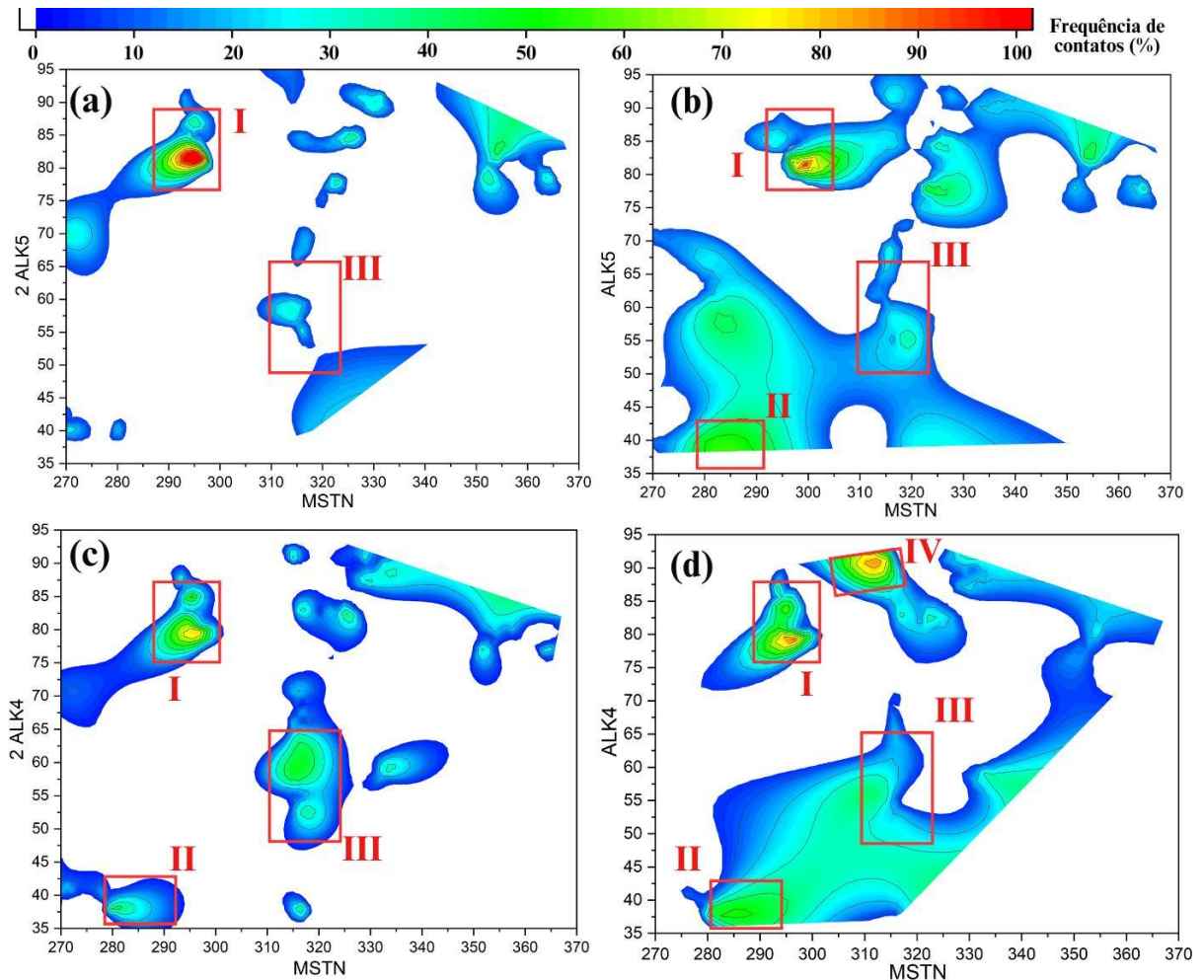
que não há uma grande variação no RMSF da MSTN ao complexar com a ALK4, com exceção da cadeia B para o complexo MSTN – ALK4₂, onde observou-se uma diminuição global da flexibilidade dos resíduos da miostatina. Sendo assim é possível que a interação da miostatina com a ALK4 seja menos intensa de forma isolada, o que pode ser associado a inexistência desse complexo experimentalmente, sendo observado apenas com a presença do receptor AcvR2B no meio. Além disso, em relação ao receptor ALK5 observou-se uma diminuição significativa da flexibilidade dos resíduos da miostatina ao complexar com o receptor, dessa forma diferentemente do seu homólogo, a ALK5 formou interações fortes capazes de bloquear a movimentação dos resíduos da miostatina. Logo, é esperado observar contatos mais intensos entre a MSTN e a ALK5.

Em relação ao modo de interação da MSTN com esses receptores, espera-se que ocorra por meio do sítio tipo I, similarmente ao domínio ND da FST. Como pode ser visto na Figura 27, os receptores do tipo I apresentam um perfil de interação disperso ao se comparar com os receptores do tipo II (Figura 24), de forma que são observadas interações com todos os principais domínios da MSTN. Com isso observa-se que devido a maior região de interação, os receptores do tipo I são uma base promissora para se avaliar a forma em que é possível bloquear a MSTN de modo que todos os domínios sejam afetados pelo inibidor. Além disso é notável que os complexos com o receptor ALK5 apresentam contatos mais duradouros na região I, o que pode ser associado ao maior efeito observado no RMSF desses complexos com a MSTN em comparação com os complexos com a ALK4 (Figura 26).

Ao comparar o perfil de contatos com os receptores de tipo II com os de tipo I, nota-se uma mudança fundamental na estratégia de reconhecimento molecular da MSTN. Enquanto a interface com a AcvR2A/B é centrada e dependente de pontos específicos nos fingers para o ancoramento, a ALK4 e a ALK5 apresentam um perfil expansivo, interagindo com demais regiões da MSTN. Esse “abraço” molecular, evidenciado na Figura 27, sugere que a sinalização via receptores de tipo I não depende de um único ponto de ancoragem, mas de uma vasta superfície de interação que se assimila ao modo de interação do domínio ND do inibidor endógeno como a miostatina. Essa característica de contatos dispersos é um indicativo de estabilidade, pois ao distribuir as interações por múltiplos domínios da MSTN, o sistema cria uma interface de ligação mais resistente a variações conformacionais. Como será demonstrado a seguir pelos dados de energia livre, essa maior área de contato é o

fator determinante para a estabilidade termodinâmica observada especialmente para a ALK4.

Figura 27 – Contatos nativos entre a MSTN ativa com as proteínas ALK4 e ALK5 nos complexos MSTN – ALK4, MSTN – ALK4₂, MSTN – ALK5₂ e MSTN – ALK5.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025)

Nota: Figura (a) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e 2 moléculas da ALK5, (b) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e 1 molécula da ALK5, (c) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e 2 moléculas da ALK4, (d) apresenta os contatos nativos para a interação entre a MSTN e 1 molécula da ALK4. A intensidade das cores nas figuras indica a frequência de contatos ao longo da trajetória.

Especificamente quanto as interações, foram observadas diversas regiões de alta densidade de contatos (> 70%) em todos os sistemas, o que está associado a estabilidade dos complexos. Dentre as regiões em destaque, poucas foram observadas com a mesma intensidade em todos os complexos, no entanto a região I (Figura 27) se demonstrou um ponto constante de interação entre o inferior finger e

as proteínas do tipo I. As demais regiões destacadas também demonstraram contatos muito duradouros com a MSTN, mas não foram observadas em todos os sistemas.

Como foi mencionado anteriormente, foi realizado o cálculo da energia GBSA para todos os complexos em vista de avaliar a estabilidade dos sistemas. A Tabela 7 mostra as energias calculadas para todos os complexos com os receptores do tipo I. Os valores de energia livre de interação para a ALK4 e ALK5 são significativamente mais negativos que os dos receptores de tipo II, com destaque para o complexo MSTN-ALK4₂, que obteve uma energia de interação de -182 ± 27 kcal mol⁻¹. Quanto aos complexos do tipo I, nota-se que a ALK4 formou um complexo mais estável com a MSTN, no entanto, ao analisar o desvio padrão das energias, o complexo com a MSTN-ALK5₂ também se manteve estável na mesma magnitude, de forma que é possível haver a interação da miostatina com ambas as proteínas.

Tabela 7 – Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para a interação MSTN e ALK4/5.

Complexos	Average
MSTN-ALK4 ₂	-182 ± 27
MSTN-ALK4	-99 ± 5
MSTN-ALK5 ₂	-150 ± 15
MSTN-ALK5	-85 ± 14

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Todos os valores de energia estão em kcal mol⁻¹. O ΔG_{aq} ($=\Delta G_{v.d.w.} + \Delta G_{ele} + \Delta G_{sol}$) representa a média da energia livre de interação, em fase aquosa, para os complexos MSTN ativa/inativa – ALK4/5 nas proporções 1:1 e 1:2. Todas as energias foram calculadas nos últimos 100 ns da trajetória com um passo de 0,2 ns (=500 frames) e igb = 2 usando o método GBSA. Os valores de energia representam a média e o desvio padrão entre as duas réplicas.

Além disso, é interessante notar que afinidade entre os receptores do tipo I obtidas foram significativamente maiores do que para os receptores do tipo IIB (MSTN-AcvR2B₂ – $\Delta G_{aq} = -84 \pm 4$ kcal mol⁻¹). Com isso apesar da interação da MSTN com os receptores do tipo I serem mais estáveis do que com os receptores do tipo II, a preferência de interação da miostatina ocorre inicialmente com a AcvR2B e posteriormente com os receptores do tipo I. Dessa forma é possível supor que há algum efeito não considerado nessas simulações que pode justificar a diferença de afinidade pela complexação da MSTN com os receptores de activina. Também, ao

comparar com a inibição endógena pela FST, nota-se que a soma das energias de interação da MSTN com os receptores do tipo I e II resulta em uma afinidade superior a observada com o inibidor. Logo, é possível inferir que a formação do complexo final entre a MSTN e os 4 receptores de activina será mais estável que o processo de inibição, no entanto cada etapa individual até obter o complexo com os receptores é menos estável que o bloqueio da via pela FST. De forma que a competição cinética entre esses dois processos será crucial para a inibição ou progressão do sinal da via.

Por fim, similarmente aos demais complexos, a energia GBSA foi decomposta em termos dos resíduos, com objetivo de compreender as diferenças na estabilidade dos sistemas, como pode ser visto no Quadro 4. A maior estabilidade da ALK4 em relação à ALK5 fundamenta-se, em princípio, no seu núcleo hidrofóbico que interage com toda a região de wirst hélice da MSTN. Enquanto a ALK5 baseia sua ancoragem em resíduos alifáticos como I78 e V85, a ALK4 possui uma rede densa de resíduos aromáticos, como a F82 e a Y83. A presença desses anéis volumosos promove uma interação mais efetiva, pois além de excluírem o solvente da interface de forma mais drástica, permitem interações de empilhamento que conferem maior rigidez e estabilidade conformacional ao complexo MSTN–ALK4₂.

Quadro 4 – Hot spots calculados, usando o método MM-GBSA, para a interação entre a MSTN e as proteínas ALK4 e ALK5.

Complexos	Hot spots
MSTN – ALK4 ₂	Q30 C39 L40 Q41 A42 C46 E47 M53 F57 L59 D60 H64 V66 P71 V76 P77 A78 K80 F82 Y83 L85 S87 E88 L90 R91
MSTN – ALK4	C39 L40 Q41 M53 L59 D60 V66 P77 K80 F82 Y83 L85 S87 E88 L90 R91
MSTN – ALK5 ₂	L40 C41 K43 F55 T59 I66 N68 M70 D76 I78 P79 R82 F84 V85 A87 P88 S89 S90 K91
MSTN – ALK5	L40 C41 K43 C48 F55 S57 T59 T61 D63 K64 I66 N68 M70 I75 I78 P79 R82 F84 V85 A87 P88 S89 K91

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Todos os cálculos foram realizados para a interação MSTN e os receptores ALK4 e ALK5 nos complexos MSTN-ALK4₂, MSTN-ALK4, MSTN-ALK5₂ e MSTN-ALK5. Os resíduos selecionados como hot spots apresentam contribuição para o $\Delta G_{aq} \leq -1$ kcal mol⁻¹. Todos os hot spots destacados nesta tabela estão nos receptores. Todas as análises foram realizadas nos últimos 100 ns da trajetória para cada replica. O cálculo MM-GBSA foi feito usando um passo de 0.2 ns (=500 frames) e igb=2.

Complementarmente à estabilização apolar, a ALK4 exibe uma rede de interações eletrostáticas e polares significativamente mais forte e específica. A presença de resíduos carregados, como a arginina (R91) e o glutamato (E88), permitem a formação de pontes salinas que atuam restringindo a movimentação dos resíduos na interface entre as proteínas. Em contraste, a ALK5 apresenta uma dependência maior de resíduos polares neutros e pequenos, como as serinas (S89, S90) e a asparagina (N68). Embora esses resíduos possam formar ligações de H eles não possuem a mesma força atrativa que as interações carregadas da ALK4, o que pode ser associado a diferença de aproximadamente 30 kcal mol^{-1} observada entre a energia de afinidade dos dois sistemas.

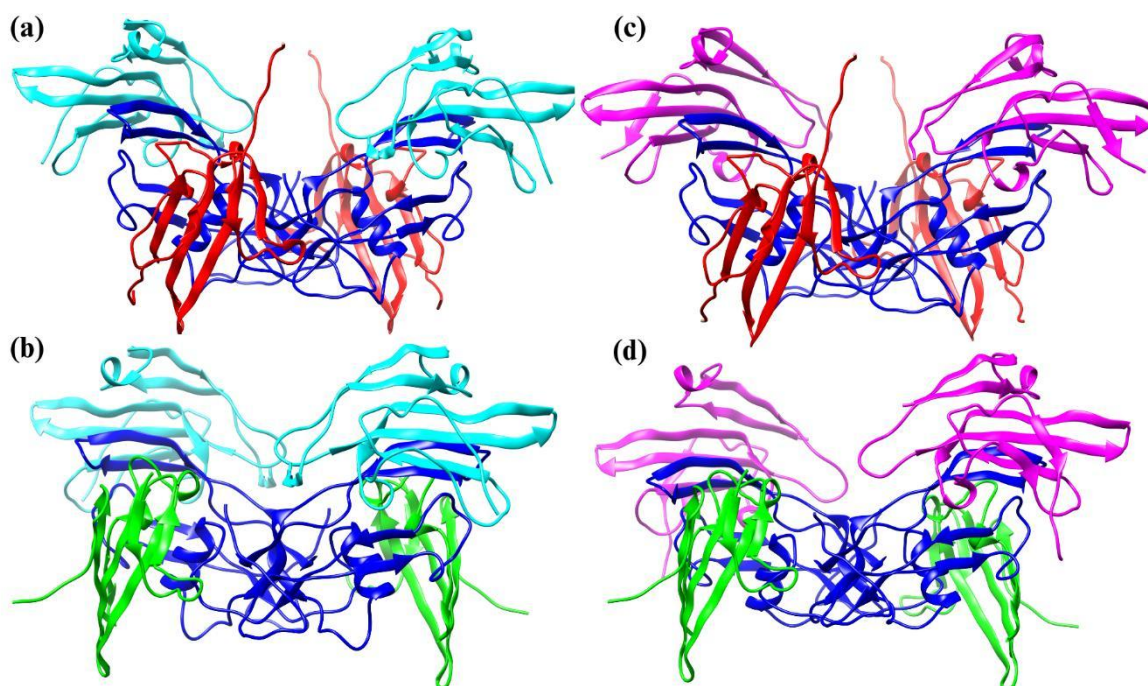
Por fim, a diferença de *hot spots*, 26 resíduos na ALK4 contra 20 na ALK5, reflete uma interface quimicamente mais heterogênea e com maior possibilidade de formação de interações. A presença de um maior número de contatos e a natureza anfipática (polar e apolar) de seus resíduos exclusivos cria um sistema de estabilização cooperativa: se uma interação local oscila, a rede de contatos auxilia a formar outra interação para substituí-la. Essa combinação de resíduos consolida a ALK4 como o molde estrutural mais promissor para o desenho de inibidores, indicando que um ligante sintético ideal deve ser capaz de mimetizar tanto o empilhamento aromático quanto as pontes de salinas identificadas nesta análise. No entanto, a ALK5 permanece como um potencial molde a ser utilizada como base na construção dos fármacos

4.3.3 Avaliação da interação MSTN – ALK4/5 – AcvR2B/2A

Por fim, após todas as análises individuais, foram construídos os complexos finais após a interação entre a MSTN e os seus receptores nas proporções esperadas. Para isso, foram construídos os complexos MSTN-AcvR2A₂-ALK4₂, MSTN-AcvR2B₂-ALK4₂, MSTN-AcvR2A₂-ALK5₂ e MSTN-AcvR2B₂-ALK5₂, como pode ser visto na figura 28. A partir das simulações desses complexos foi possível compreender o modo de interação da miostatina com seus receptores e avaliar por meio da comparação com os complexos livres discutidos nos tópicos 4.3.1 e 4.3.2 se há influência entre os receptores que auxiliem na estabilidade final dos complexos.

Similarmente aos demais sistemas, foi realizado o cálculo da energia de interação MM-GBSA para todos os complexos entre a MSTN e os receptores do tipo I e II, como pode ser observado na Tabela 8. Ao analisar os resultados nota-se um comportamento muito interessante, onde os complexos formados com o receptor AcvR2B (MSTN-AcvR2B₂-ALK4₂ e MSTN-AcvR2B₂-ALK5₂) foram aproximadamente 40 kcal mol⁻¹ mais estáveis do que os complexos formados com o receptor AcvR2A (MSTN-AcvR2A₂-ALK4₂ e MSTN-AcvR2A₂-ALK5₂). Esses resultados demonstram que a baixa instabilidade oriunda da complexação entre a MSTN e a AcvR2A se propaga ao complexo final com o receptor do tipo I, indicando que apesar de não haver preferência significativa entre a complexação com os receptores do tipo I, a MSTN sempre que possível ira formar o complexo com o receptor do tipo II AcvR2B. Além disso, nota-se que os resultados de energia para os complexos com a ALK4 ($\Delta G_{\text{aq}} = -214 \pm 7$ kcal mol⁻¹) e ALK5 ($\Delta G_{\text{aq}} = -208 \pm 21$ kcal mol⁻¹) não apresentam diferença significativa ao complexar com a AcvR2B, de forma que a preferência será governada por fatores cinéticos.

Figura 28 – Estruturas dos complexos MSTN-AcvR2B₂-ALK4₂, MSTN-AcvR2B₂-ALK5₂, MSTN-AcvR2A₂-ALK4₂ e MSTN-AcvR2A₂-ALK5₂.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: (a) complexo MSTN-AcvR2A₂-ALK4₂, (b) complexo MSTN-AcvR2B₂-ALK4₂, (c) complexo MSTN-AcvR2A₂-ALK5₂ e (d) complexo MSTN-AcvR2B₂-ALK5₂.

Tabela 8 – Energia livre de interação em fase aquosa (ΔG_{aq}) obtida com o método MM-GBSA para a interação MSTN – ALK4/5 – AcvR2A/2B

Complexos	Energia média
MSTN-AcvR2A ₂ -ALK4 ₂	-162 ± 15
MSTN-AcvR2B ₂ -ALK4 ₂	-214 ± 7
MSTN-AcvR2A ₂ -ALK5 ₂	-173 ± 22
MSTN-AcvR2B ₂ -ALK5 ₂	-208 ± 21

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Todos os valores de energia estão em kcal mol⁻¹. O ΔG_{aq} ($=\Delta G_{\text{v.d.w.}} + \Delta G_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{sol}}$) representa a média da energia livre de interação, em fase aquosa, para os complexos entre a MSTN, receptores tipo I e receptores tipo II. Todas as energias foram calculadas nos últimos 100 ns da trajetória com um passo de 0,2 ns (=500 frames) e igb = 2 usando o método GBSA. Os valores de energia representam a média e o desvio padrão entre as duas réplicas.

Como foi discutido, a análise dos complexos completos revela que a estabilidade termodinâmica da sinalização da miostatina é governada primariamente pela identidade do receptor de tipo II. A discrepância de aproximadamente 40 kcal mol⁻¹ em favor dos complexos contendo a AcvR2B (Tabela 8) confirma que a alta afinidade deste receptor atua estabilizando todo o sistema. Notavelmente, observa-se um fenômeno de propagação de instabilidade: a menor afinidade da AcvR2A não é compensada pela entrada dos receptores de tipo I; pelo contrário, ela limita o teto energético do complexo final. Esse resultado sugere um modelo de montagem hierárquico, onde a formação do dímero MSTN-AcvR2B é o evento determinante que garante a integridade estrutural necessária para o recrutamento subsequente das ALKs, como foi proposto inicialmente no mecanismo descrito na Figura 5.

Um ponto de destaque surge ao compararmos o comportamento das ALK4 e ALK5 dentro dos complexos completos. Enquanto nos estudos isolados a ALK4 apresentava uma superioridade energética marcante, no sistema associado à AcvR2B, os valores de energia livre tornam-se estatisticamente equivalentes ($\Delta G_{\text{aq}} \approx -214$ vs -208 kcal mol⁻¹). Essa uniformidade energética indica que a presença do receptor de tipo II pode induzir ajustes conformacionais ou estabilizar epítomos na MSTN que favorecem a acomodação de ambos os receptores de tipo I de maneira similar. Assim, a escolha entre a sinalização via ALK4 ou ALK5 no organismo parece ser ditada pela disponibilidade celular, uma vez que, do ponto de vista termodinâmico,

o complexo final apresenta estabilidade comparável após a complexação com a AcvR2B.

Além disso, comparando com a FST ($-235 \pm 26 \text{ kcal mol}^{-1}$), os complexos formados com a AcvR2B e os receptores do tipo I apresentam valores equivalentes. Dessa forma, é possível concluir que apesar da interação da MSTN com a FST seja mais intensa quando se compara isoladamente (proporção 1:1), ao analisar o sistema completo é possível notar que ambos os complexos são energeticamente favoráveis na mesma proporção. Com isso, a inibição ou propagação do sinal será definida por meio da concentração do inibidor e dos receptores no meio.

Por fim, é possível afirmar que a análise das interações com os receptores foi de crucial importância para entender os principais fatores que estabilizam uma molécula interagindo com os sítios da MSTN. Dessa forma é possível usar o conhecimento construído para propor um modelo de farmacóforo com base nas propriedades observadas ao longo desse estudo.

4.4 Qual a estrutura base de um inibidor para a via de sinalização da MSTN humana

Por fim, após a análise de todo o processo de ativação da MSTN, da inibição endógena e da transdução do sinal à célula, é possível compilar as principais interações e resultados observados para propor um modelo geral que auxilie no desenvolvimento de novos fármacos com alvo nessa via de sinalização. Para isso foram reunidos todos os hot spots observados em todos os complexos avaliados nesse estudo, de forma a compreender quais eram o tipo principal de interação (hidrofílica, hidrofóbica, catiônica, aniônica ou aromática) que eles apresentavam com os sítios ativos da MSTN e a posição dessas interações.

Primeiramente em relação ao sítio do tipo II, a Tabela 9 e a Figura 29 mostram a posição dos grupos farmacofóricos essenciais para drogas agirem no sítio II da MSTN. Em relação a determinação do tipo de interação dos grupos farmacofóricos e da orientação espacial, foi realizado o seguinte procedimento: (I) Alinhamento dos complexos MSTN – FST, MSTN – FST₂, MSTN – AcvR2A, MSTN – AcvR2A₂, MSTN – AcvR2B, MSTN – AcvR2B₂, complexo latente, TLD – p1, TLD – p1 inter, TLD – p2 e TLD – p2 inter com a MSTN ativa livre; (II) Seleção de todos os resíduos que se destacaram como hot spots em cada complexo da etapa (I); (III) Determinação do

centro de massa da cadeia lateral de cada resíduo selecionado na etapa (II); (IV) Definição do grupo farmacofórico (doador de ligação de H, acceptor de ligação de H, catiônico, aniônico ou aromático) para cada centro obtido na etapa (III) com base no tipo de interação observada ao longo de cada DM realizada e (V) por fim determinação do centroide entre os grupos, obtidos na etapa IV, de mesma interação que estejam próximos. Dessa forma, foi possível obter um modelo geral de farmacóforo com 9 pontos para o sítio do tipo II como pode ser visto na Figura 29 e na Tabela 9. Para mais detalhes acerca de todos os grupos observados ao alinhar os complexos citados anteriormente veja o Apêndice N.

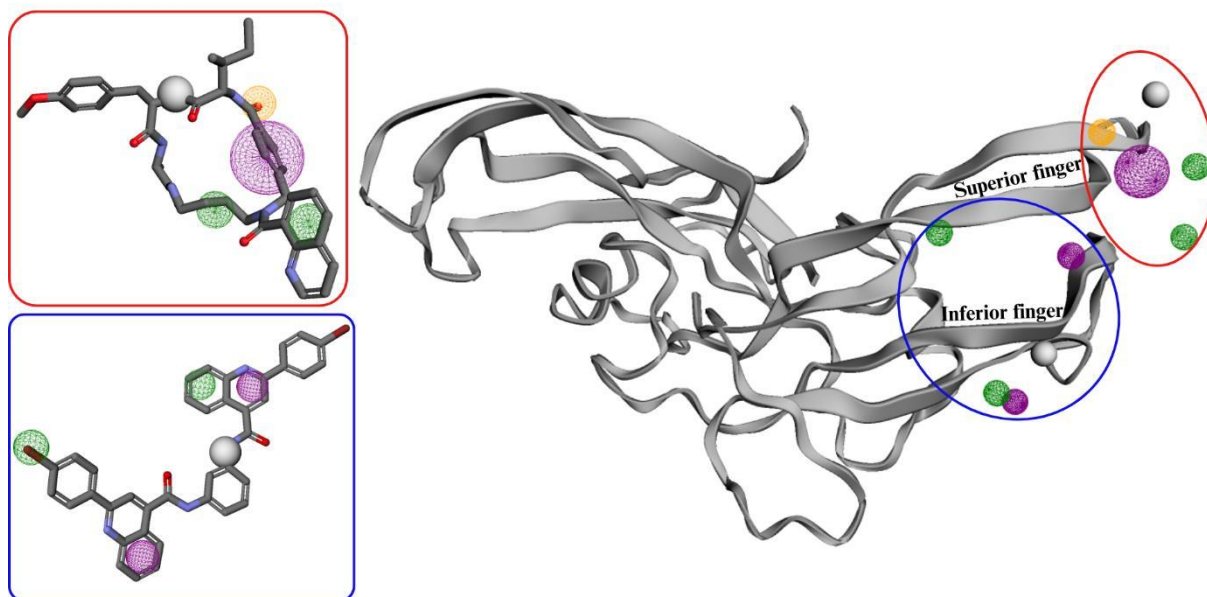
Tabela 9 – Regiões para o modelo farmacofórico obtido para o sítio tipo II com base nas interações entre a MSTN e as proteínas AcvR2A, AcvR2B, FST e o forearm do prodomínio.

Grupo farmacofórico	X	Y	Z
Aromático	-18,75	8,67	-16,88
Hidrofóbico	-13,83	1,83	-11,83
Hidrofóbico	-18,25	17,41	-22,52
Doador de ligação de H	-11,38	11,44	-28,92
Doador de ligação de H	-20,53	12,46	-9,67
Hidrofóbico	-17,67	13,03	-27,24
Aromático	-15,21	11,99	-24,27
Acceptor de ligação de H	-12,30	8,99	-24,47
Hidrofóbico	-21,84	10,11	-5,57
Aromático	-21,16	13,42	-5,24

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: As coordenadas de cada grupo farmacofórico foram obtidas como uma média ao alinhar os complexos MSTN – FST, MSTN – FST₂, MSTN – AcvR2A, MSTN – AcvR2A₂, MSTN – AcvR2B, MSTN – AcvR2B₂, complexo latente, TLD – p1, TLD – p1 inter, TLD – p2 e TLD – p2 inter com a MSTN ativa livre.

Figura 29 – Grupos farmacofóricos esperados para um inibidor do sítio tipo II da MSTN.



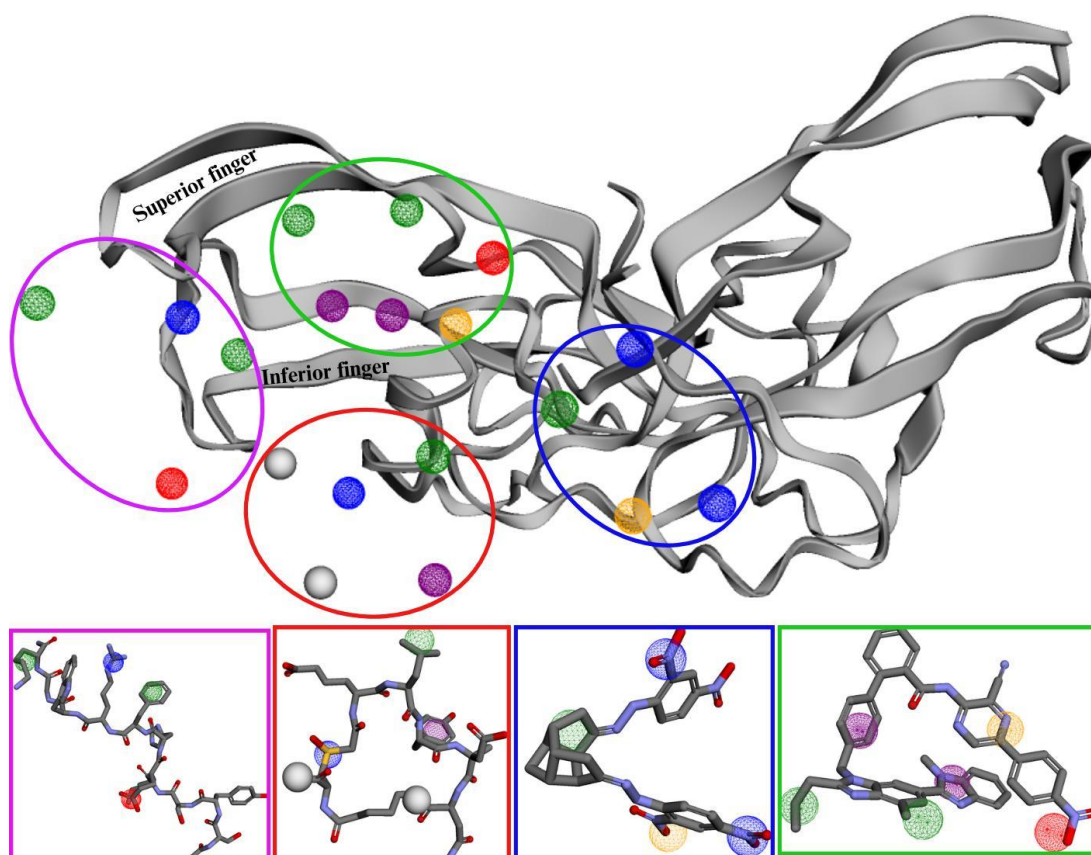
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Grupos farmacofóricos médios obtidos para o sítio tipo II da MSTN. As regiões em roxo indicam interação aromática, em verde interações hidrofóbicas, em amarelo aceitador de ligação de H e em branco doador de ligação de H.

Em relação ao modelo construído para o sítio II (Figura 29) é possível destacar alguns pontos importantes que foram observados. Primeiramente, nota-se que há uma mistura de interações polares e apolares com destaque, respectivamente, para formação de ligação de H e interações de empilhamento. Outro ponto crucial a ser destacado é a grande distância entre os grupos farmacofóricos, a exemplo a distância de $\sim 22 \text{ \AA}$ entre o grupo doador de ligação de H no superior finger a grupo aromático no inferior finger. Com isso, para um ligante único compreender todas essas regiões seria necessário um volume molecular muito grande, o que tornaria o fármaco inviável com base em solubilidade, toxicidade, excreção etc. Dessa forma, apenas duas formas seriam possíveis de inibir a MSTN, uso de peptídeos terapêuticos que podem apresentar tamanhos maiores e acessar mais regiões de interação ou por meio de moléculas orgânicas pequenas que podem apresentar apenas alguns grupos farmacofóricos dentre os vários possíveis e interagir em regiões específicas. Com isso a Figura 29 mostra duas moléculas pequenas que esperasse apresentar afinidade pelo inferior finger (azul), por compreender os grupos farmacofóricos que interagem nessa região, e pelo superior finger (vermelho) por apresentar grupos que favorecem interação nessa região.

Igualmente ao processo realizado para a construção do modelo para o sítio II, foram determinados os grupos farmacofóricos para o sítio tipo I da MSTN. Todo o procedimento de construção foi idêntico ao descrito anteriormente, com exceção para a etapa I onde o alinhamento foi realizado com os complexos MSTN – FST, MSTN – FST₂, MSTN – ALK4, MSTN – ALK4₂, MSTN – ALK5, MSTN – ALK5₂, complexo latente, TLD – p1, TLD – p1 inter, TLD – p2 e TLD – p2 inter com a MSTN ativa livre. A Tabela 10 e a Figura 30 mostra as coordenadas e o arranjo dos grupos farmacofóricos obtidos para o sítio tipo I da MSTN. Comparando os grupos observados no sítio tipo I com o sítio II, destaca-se o maior número de regiões para o sítio do tipo I e uma maior abrangência de interações na superfície da proteína. Para mais detalhes acerca de todos os grupos observados ao alinhar os complexos citados anteriormente veja o Apêndice O.

Figura 30 – Grupos farmacofóricos esperados para um inibidor do sítio tipo I da MSTN.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Grupos farmacofóricos médios obtidos para o sítio tipo I da MSTN. As regiões em roxo indicam interação aromática, em verde interações hidrofóbicas, em amarelo acceptor de ligação de H e em branco doador de ligação de H, em azul as interações catiônicas e em vermelho interações aniônicas.

Tabela 10 – Pontos para o modelo farmacofórico obtido para o sítio tipo I com base nas interações entre a MSTN e as proteínas ALK4, ALK5, FST e a região $\alpha 1$ do forearm do prodomínio.

grupo farmacofórico	X	Y	Z
Carga positiva	-2,07	23,48	-18,50
Hidrofóbico	-3,74	28,29	-25,29
Doador de ligação de H	-4,94	25,42	-6,83
Aromático	-4,65	15,87	-10,69
Carga positiva	-3,96	24,09	-2,39
Hidrofóbico	-0,35	9,50	-12,33
Hidrofóbico	6,20	21,39	-4,00
Hidrofóbico	17,14	17,64	-4,83
Hidrofóbico	-4,80	13,38	-15,87
Hidrofóbico	-3,41	22,56	-13,94
Aromático	1,15	15,41	-9,46
Carga negativa	-10,28	29,92	-9,66
Receptor de ligação de H	0,83	12,89	-5,64
Carga positiva	20,39	16,26	4,49
Aromático	2,73	25,95	2,63
Carga negativa	5,54	9,90	-8,38
Carga positiva	17,02	12,08	-3,28
Doador de ligação de H	0,05	30,20	-2,06
Receptor de ligação de H	16,63	18,88	2,93

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: As coordenadas de cada grupo farmacofórico foram obtidas como uma média ao alinhar os complexos MSTN – FST, MSTN – FST₂, MSTN – ALK4, MSTN – ALK4₂, MSTN – ALK5, MSTN – ALK5₂, complexo latente, TLD – p1, TLD – p1 inter, TLD – p2 e TLD – p2 inter com a MSTN ativa livre.

Em relação ao modelo construído para sítio do tipo I (Figura 30) é possível notar que há uma predominância de interações apolares (hidrofóbicas e aromáticas) no cerne da proteína, enquanto nas regiões laterais do sítio I há um maior número de interações polares (ligações de hidrogênio e interações de carga). Diferentemente do sítio II, o sítio I da MSTN compreende uma grande área da proteína de forma que a inibição é facilitada por proteínas que possam englobar toda a região do sítio. Dessa

forma, é possível dividir os grupos farmacofóricos observados em diversos modelos de farmacóforos de forma que cada um irá ter preferência por interagir em uma região da proteína. Como pode ser visto na figura 30, foram divididos a priori 4 regiões e selecionadas algumas moléculas que possam interagir com a MSTN por meio dos modelos farmacofóricos gerados. Analisando essas moléculas é interessante notar a diversidade de estruturas possíveis de inibir a miostatina, como o peptídeo na região em roxo, ao ciclo da região em vermelho e a molécula altamente poli-insaturada na região verde.

Por fim, a partir de todos esses modelos é possível concluir que existem diversas formas de inibir a MSTN. Os modelos descritos nas Figuras 12, 29 e 30 apresentam diversas possibilidades de bloquear a via de sinalização da MSTN, desde o desenvolvimento de peptídeos terapêuticos à pequenas moléculas orgânicas. Com isso, é possível afirmar que diversas técnicas de inibição podem ser empregadas no desenvolvimento de inibidores para essa via, a exemplo os peptídeos terapêuticos podem ser usados como bloqueadores da proteína ao mimetizar o inibidor e os receptores naturais da MSTN (Figura 12), enquanto as moléculas pequenas podem atuar como bloqueadores de regiões específicas do sítio da MSTN (Figura 29 e 30). Dessa forma é notável a possibilidade de novos estudos acerca dos possíveis modos de inibição de ligantes não naturais a miostatina humana.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que esse trabalho apresentou uma análise profunda do processo de ativação da miostatina humana (MSTN) por meio de simulações de DM. Além disso, foi analisado os principais pontos do processo de inibição endógena pela Folistatina humana 288 (FST) e o processo de transdução do sinal da MSTN por meio da interação com os domínios extracelulares dos receptores de activina do tipo I e II. Primeiramente em relação ao processo de ativação, foram conduzidas análises sistemáticas de todos os possíveis intermediários para o processo de ativação, partindo da proteína precursora (promiostatina) até a forma ativa da MSTN. A estrutura da promiostatina foi dividida em três regiões baseadas em suas funções na proteína e ao longo do processo de ativação, sendo elas a região do *forearm*, a qual atua como região inibitória da MSTN, a região do *arm*, que atua mantendo a proteína em uma conformação adequada (conformação em V), e a região da MSTN que irá compor a estrutura final da miostatina ativa. Os principais resíduos do *forearm* e do *arm* que interagem com a MSTN ao longo do processo de ativação, foram identificados a partir da frequência de contatos e da energia de interação entre esses domínios.

O processo de ativação da miostatina envolve seis intermediários entre a promiostatina e a MSTN ativa, sendo que o complexo latente é a forma mais abundante em que a miostatina é encontrada no corpo humano. Na etapa final do processo de ativação, a MSTN é liberada em sua forma inativa, a qual não existem muitos estudos que foquem nessa estrutura como alvo de inibidores. A estrutura inativa exibe uma conformação em folha β na região da *wrist* hélice, a qual sofre um rearranjo conformacional para uma α hélice, sendo essa uma etapa crucial na ativação da proteína. Os resultados discutidos ao longo desse trabalho sugerem que inibidores podem ser desenhados para interagir com a forma inativa e bloquear essa transição, bloqueando a ativação da miostatina e conseqüentemente impedindo a interação com os receptores. Apesar do processo ser espontâneo, as simulações indicam que é necessário um longo tempo para o fenômeno ser observado, indicando que os inibidores terão tempo suficiente para interagir com a MSTN.

Quanto ao processo de inibição endógena, foram analisados os modos de interação MSTN – FST nas proporções 1 – 1 e 1 – 2 com a MSTN em sua forma ativa e inativa. Os complexos construídos tiveram por objetivo avaliar se há preferência pela

complexação após o fim do processo de ativação da miostatina, ou se após a liberação do prodomínio já é possível interagir com o inibidor, além disso foram avaliados os principais aminoácidos e as regiões do inibidor que estabilizam a interação MSTN – FST. A partir das simulações realizadas foi possível determinar que a complexação com a FST ocasiona uma diminuição na flexibilidade dos resíduos na região do sítio tipo II da MSTN o que foi associado a uma intensa rede de contatos entre o domínio FDS2 da FST com o sítio da MSTN. Também foi possível avaliar a diferença de interação com as estruturas ativas e inativas da miostatina, onde foi possível observar que a formação da α hélice na região do sítio tipo I da MSTN não é necessária para que o complexo seja formado com o inibidor.

O processo de transdução do sinal foi avaliado por meio da modelagem da interação da miostatina com os domínios extracelulares das proteínas do tipo I (ALK4 e ALK5) e do tipo II (AcvR2A e AcvR2B). Foram construídos quatro complexos entre a MSTN e os receptores do tipo I, quatro complexos entre a MSTN e os receptores do tipo II, e quatro complexos entre a miostatina com dois receptores do tipo I e dois receptores do tipo II. A partir dos resultados das simulações foi possível desenvolver algumas hipóteses acerca do modo de interação da MSTN com seus receptores para uma efetiva propagação do sinal. Quanto as interações com o receptor do tipo II, observou-se que há o dobro de afinidade da MSTN por interagir com a AcvR2B do que com a AcvR2A, o que condiz com os resultados experimentais. No entanto ao comparar com a afinidade pela FST é notável que a interação com o inibidor é favorecida em detrimento do receptor IIB. Além disso, por meio dos complexos com os receptores do tipo I, foi possível determinar que não há preferência pela complexação entre os receptores avaliados, no entanto é necessário destacar que a interação com os receptores ainda não foram observadas isoladamente na natureza. Por fim, ao avaliar os complexos completos com os quatro receptores, é notável que a presença da AcvR2A torna o sistema menos estável, de forma que não há compensação pela interação com os receptores tipo I, além disso nota-se que ao comparar com a FST, o complexo apresenta aproximadamente a mesma energia de interação, de forma que é possível propor que apesar da interação inicial com a AcvR2B ser fraca, o complexo final rivaliza com o processo de inibição de forma que fatores cinéticos serão cruciais para determinar a preferência que a via de sinalização irá seguir.

Em relação a proposta de novos inibidores, usou-se a região do *forearm* como um modelo para criar uma estrutura base que motive a síntese de inibidores baseados em peptídeos. Os resultados revelaram que a região $\alpha 1$, responsável por bloquear a interação da MSTN com o receptor transmembrana do tipo I, contém majoritariamente resíduos apolares (Leu e Ile), os quais interagem fortemente com a miostatina por meio de forças de VDW. Em vista de intensificar essas interações, foram propostas modificações na região $\alpha 1$, de forma a aumentar o número de resíduos apolares com cadeias laterais longas. Adicionalmente, a região $\alpha 2$ do *forearm* e a região $\beta 1$ do *arm* interagem com o sítio do tipo II da MSTN, sendo que as interações chave foram mediadas por resíduos polares e apolares, com isso levando a inferir que para o bloqueio desse sítio o inibidor deve ser capaz de interagir por forças polares e apolares. Por fim, os resultados indicam que drogas baseadas em peptídeos podem atuar como bons inibidores para o processo de ativação da miostatina. Além disso, apesar da forma ativa da MSTN ser o alvo mais comum para os inibidores, essa forma não deve ser a única a ser considerada como um alvo. Também, a partir dos hot spots observados nos processos de inibição e transdução do sinal, foi possível desenvolver dois modelos gerais de farmacóforo para os sítios do tipo I e II da MSTN, de forma que é possível selecionar os grupos farmacofóricos de interesse e por meio deles propor moléculas pequenas que possam atuar inibindo a miostatina por meio de interações em regiões específicas da proteína.

Em relação aos frutos do estudo, o projeto possibilitou a elaboração e desenvolvimento de diversos trabalhos. Quanto a apresentação em eventos, resultados do projeto foram apresentados no *II Conesul symposium on biomolecular simulation* que ocorreu no segundo semestre de 2024 em Buenos Aires – AR, na 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASBQ) que ocorreu no primeiro semestre de 2025 em Campinas – São Paulo, no I workshop *Drug Hunters* que ocorreu na Universidade Federal de São João del Rei – São João del Rei e também no 37º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – Ouro Preto, ambos no último semestre de 2025. Além disso, a partir da proposta do projeto de estudo da miostatina humana foi possível obter uma verba de R\$ 98.320,00 a partir de um edital de demanda universal da FAPEMIG (APQ01772-24), o que possibilitou a compra de duas novas GPUs (Nvidia 4080 super) que auxiliaram na execução do projeto. Também, com os resultados apresentados nessa qualificação foi escrito o artigo “Exploring the Myostatin Activation Pathway: A Promising Target for Treating Muscle

Atrophy” o qual foi publicado na revista *Journal of chemical Information and Modeling* (JCIM), sob o DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5c00639> (Quintanilha; Dos Santos, 2025).

Quanto a perspectivas para continuidade do trabalho, espera-se continuar a execução desse estudo durante o Doutorado. Tem-se por objetivo empregar os modelos de farmacóforos desenvolvidos e estudar com mais detalhes o processo de transdução do sinal dessa via, considerando a estrutura completa dos receptores e a membrana da célula muscular. Além disso, no momento está em fase de escrita de um segundo artigo relacionado a proposta de inibidores a base de peptídeos que apresentem como alvo a forma livre da miostatina humana.

REFERÊNCIAS

- ABATI, Elena *et al.* Inhibition of myostatin and related signaling pathways for the treatment of muscle atrophy in motor neuron diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 7, p. 374, 21 jul. 2022.
- AHMAD, Syed Sayeed *et al.* Computational identification of dithymoquinone as a potential inhibitor of myostatin and regulator of muscle mass. **Molecules**, v. 26, n. 17, 1 set. 2021.
- ALI, Shahid *et al.* Identification and Evaluation of Traditional Chinese Medicine Natural Compounds as Potential Myostatin Inhibitors: An In Silico Approach. **Molecules**, v. 27, n. 13, 1 jul. 2022.
- ALLEN, David L.; HITTEL, Dustin S.; MCPHERRON, Alexandra C. Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 10, p. 1828–1835, out. 2011.
- AMTHOR, Helge *et al.* Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. **Developmental Biology**, v. 270, n. 1, p. 19–30, 1 jun. 2004.
- ANDERSON, Sarah B.; GOLDBERG, Alfred L.; WHITMAN, Malcolm. Identification of a Novel Pool of Extracellular Pro-myostatin in Skeletal Muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 11, p. 7027–7035, 14 mar. 2008.
- ANTFOLK, Daniel *et al.* Molecular mechanism of Activin receptor inhibition by DLK1. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 5976, 1 jul. 2025.
- APGAR, James R. *et al.* Beyond CDR-grafting: Structure-guided humanization of framework and CDR regions of an anti-myostatin antibody. **mAbs**, v. 8, n. 7, p. 1302–1318, 2 out. 2016.
- ASAI-COAKWELL, Mika *et al.* GDF6, a novel locus for a spectrum of ocular developmental anomalies. **American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 2, p. 306–315, 1 fev. 2007.
- BAIG, Mohammad Hassan *et al.* Myostatin and its Regulation: A Comprehensive Review of Myostatin Inhibiting Strategies. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 23 jun. 2022.
- BATEMAN, Alex *et al.* UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D523–D531, 6 jan. 2023.
- BERMAN, Helen M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.
- BONAFoux, Dominique *et al.* 2-Aminoimidazoles inhibitors of TGF- β receptor 1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 3, p. 912–916, 1 fev. 2009.

BONNIEU, Anne; CARNAC, Gilles; VERNUS, Barbara. Myostatin in the Pathophysiology of Skeletal Muscle. **Current Genomics**, v. 8, n. 7, p. 415–422, 1 nov. 2007.

CASE, David A. *et al.* AmberTools. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 20, p. 6183–6191, 23 out. 2023.

CASH, Jennifer N. *et al.* The structure of myostatin:follistatin 288: Insights into receptor utilization and heparin binding. **EMBO Journal**, v. 28, n. 17, p. 2662–2676, 2 set. 2009.

CHEN, Mantian *et al.* Reduction of Activin Receptor-Like Kinase 4 Expression Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibiting TGF β Signaling Pathway. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2022, n. 1, p. 5242323, 1 jan. 2022.

CHEN, Ming-Ming *et al.* Regulation of Myostatin on the Growth and Development of Skeletal Muscle. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 785712, 24 dez. 2021.

CHENG, Wei *et al.* Growth differentiation factor 1-induced tumour plasticity provides a therapeutic window for immunotherapy in hepatocellular carcinoma. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 7142-, 8 dez. 2021.

CHU, Kit Yee *et al.* Type II BMP and activin receptors BMPR2 and ACVR2A share a conserved mode of growth factor recognition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 7, p. 102076, 1 jul. 2022.

COTTON, Thomas R. *et al.* Structure of the human myostatin precursor and determinants of growth factor latency. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 3, p. 367–383, 12 fev. 2018.

CUNNINGHAM, Noreen S. *et al.* Growth/Differentiation Factor-10: A New Member of the Transforming Growth Factor- β Superfamily Related to Bone Morphogenetic Protein-3. **Growth Factors**, v. 12, n. 2, p. 99–109, 1995.

CZODROWSKI, Paul *et al.* Selection of fragments for kinase inhibitor design: Decoration is key. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 457–465, 1 dez. 2014.

DAGBAY, Kevin B. *et al.* Structural basis of specific inhibition of extracellular activation of pro- or latent myostatin by the monoclonal antibody SRK-015. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 16, p. 5404–5418, 17 abr. 2020.

DE WINTER, Johan P. *et al.* Truncated Activin Type II Receptors Inhibit Activin Bioactivity by the Formation of Heteromeric Complexes with Activin Type I Receptors. **Experimental Cell Research**, v. 224, n. 2, p. 323–334, 1 maio 1996.

DUCY, Patricia; KARSENTY, Gerard. The family of bone morphogenetic proteins. **Kidney International**, v. 57, n. 6, p. 2207–2214, 1 jun. 2000.

ELKINA, Yulia *et al.* The role of myostatin in muscle wasting: an overview. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 2, n. 3, p. 143–151, 1 set. 2011.

FOROUZESH, Negin *et al.* Optimal Dielectric Boundary for Binding Free Energy Estimates in the Implicit Solvent. **Journal of chemical information and modeling**, v. 64, n. 24, p. 9433–9448, 23 dez. 2024.

FRANCIS-WEST, Philippa H. *et al.* BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. **Cell and Tissue Research**, v. 296, n. 1, p. 111–119, 1999.

FRONTERA, Walter R.; OCHALA, Julien. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183–195, 8 mar. 2015.

GELFI, Cecilia; VASSO, Michele; CERRETELLI, Paolo. Diversity of human skeletal muscle in health and disease: Contribution of proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 6, p. 774–795, 16 maio 2011.

GELLIBERT, F. *et al.* Design of novel quinazoline derivatives and related analogues as potent and selective ALK5 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 8, p. 2277–2281, 15 abr. 2009.

GELLIBERT, Françoise *et al.* Identification of 1,5-naphthyridine derivatives as a novel series of potent and selective TGF- β type I receptor inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 18, p. 4494–4506, 26 ago. 2004.

GENHEDEN, Samuel; RYDE, Ulf. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449–461, 1 maio 2015a.

GENHEDEN, Samuel; RYDE, Ulf. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449–461, 4 maio 2015b.

GOEBEL, Erich J. *et al.* Structural characterization of an activin class ternary receptor complex reveals a third paradigm for receptor specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 31, p. 15505–15513, 30 jul. 2019.

GOEBEL, Erich J. *et al.* Structures of activin ligand traps using natural sets of type I and type II TGF β receptors. **iScience**, v. 25, n. 1, 21 jan. 2022.

GOEBEL, Erich J. *et al.* CryoEM structure of ALK2:BMP6 reveals distinct mechanism that allow ALK2 to interact with both BMP and activin ligands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 122, n. 35, p. e2502788122, 2 set. 2025.

GOLDBERG, Frederick W. *et al.* Rapid generation of a high quality lead for transforming growth factor- β (TGF- β) type I receptor (ALK5). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7901–7905, 10 dez. 2009.

GOLDBERG, Frederick W. *et al.* Identification and optimisation of a series of N-(4-anilino-2-pyridyl)acetamide activin receptor-like kinase 1 (ALK1) inhibitors. **MedChemComm**, v. 7, n. 6, p. 1204–1208, 16 jun. 2016.

GROPPE, Jay *et al.* Cooperative Assembly of TGF- β Superfamily Signaling Complexes Is Mediated by Two Disparate Mechanisms and Distinct Modes of Receptor Binding. **Molecular Cell**, v. 29, n. 2, p. 157–168, 1 fev. 2008.

GROSDIDIER, Solène; FERNÁNDEZ-RECIO, Juan. Identification of hot-spot residues in protein-protein interactions by computational docking. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 21 out. 2008.

GRYNBLAT, Julien *et al.* Pulmonary vascular phenotype identified in patients with GDF2 (BMP9) or BMP10 variants: an international multicentre study. **European Respiratory Journal**, v. 63, n. 4, 4 abr. 2024.

GUCKIAN, Kevin *et al.* Pyrazolone based TGF β R1 kinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p. 326–329, 1 jan. 2010.

GUTIERREZ-SALMEAN, Gabriela *et al.* Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 91–94, jan. 2014.

HAN, H. Q. *et al.* Myostatin/activin pathway antagonism: Molecular basis and therapeutic potential. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2333–2347, 1 out. 2013.

HAN, Seungil *et al.* Crystal structure of activin receptor type IIB kinase domain from human at 2.0 Å resolution. **Protein Science**, v. 16, n. 10, p. 2272–2277, out. 2007.

HANEL, Meredith L.; HENSEY, Carmel. Eye and neural defects associated with loss of GDF6. **BMC Developmental Biology**, v. 6, n. 1, p. 43–, 29 set. 2006.

HANSON, Andrea M. *et al.* Inhibiting myostatin signaling partially mitigates structural and functional adaptations to hindlimb suspension in mice. **npj Microgravity**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2023.

HARIKRISHNAN, Lalgudi S. *et al.* Heterobicyclic inhibitors of transforming growth factor beta receptor I (TGF β RI). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1026–1034, 1 mar. 2018.

HOOGAARS, Willem M. H.; JASPERS, Richard T. Past, present, and future perspective of targeting myostatin and related signaling pathways to counteract muscle atrophy. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. [S.l.]: Springer New York LLC, 2018. v. 1088 p. 153–206.

HOPKINS, Delana R.; KELES, Sunduz; GREENSPAN, Daniel S. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. **Matrix Biology**, v. 26, n. 7, p. 508–523, 1 set. 2007.

HORBELT, Daniel *et al.* Small molecules dorsomorphin and LDN-193189 inhibit myostatin/GDF8 signaling and promote functional myoblast differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 6, p. 3390–3404, 6 fev. 2015.

HREINSSON, Julius Gisli *et al.* Growth Differentiation Factor-9 Promotes the Growth, Development, and Survival of Human Ovarian Follicles in Organ Culture. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 1, p. 316–321, 1 jan. 2002.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1 fev. 1996.

HUSE, Morgan *et al.* Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Type I TGF β Receptor in Complex with FKBP12. **Cell**, v. 96, n. 3, p. 425–436, 5 fev. 1999.

HUSE, Morgan *et al.* The TGF β Receptor Activation Process: An Inhibitor- to Substrate-Binding Switch. **Molecular Cell**, v. 8, n. 3, p. 671–682, 1 set. 2001.

IZADI, Saeed; ANANDAKRISHNAN, Ramu; ONUFRIEV, Alexey V. Building water models: A different approach. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 5, n. 21, p. 3863–3871, 6 nov. 2014.

JIANG, Man Shiow *et al.* Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 3, p. 525–531, 12 mar. 2004.

JOUNG, In Suk; CHEATHAM, Thomas E. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 30, p. 9020–9041, 31 jul. 2008.

JUENGEL, J. L. *et al.* Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 447–460, 1 jul. 2004.

KANBAY, Mehmet *et al.* Effect of Bimagrumab on body composition: a systematic review and meta-analysis. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 36, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2024.

KEUTMANN, Henry T.; SCHNEYER, Alan L.; SIDIS, Yisrael. The Role of Follistatin Domains in Follistatin Biological Action. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 228–240, 1 jan. 2004.

KORTEMME, Tanja; KIM, David E.; BAKER, David. Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2004, n. 219, 10 fev. 2004.

- LEE, Se Jin *et al.* Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 35, 28 ago. 2012.
- LERCH, Thomas F. *et al.* Structural and Biophysical Coupling of Heparin and Activin Binding to Follistatin Isoform Functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15930–15939, 25 maio 2007.
- LEVINE, Ariel J.; BRIVANLOU, Ali H. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. **Development**, v. 133, n. 2, p. 209–216, 15 jan. 2006a.
- LEVINE, Ariel J.; BRIVANLOU, Ali H. GDF3 at the Crossroads of TGF-beta Signaling. **Cell Cycle**, v. 5, n. 10, p. 1069–1073, 15 maio 2006b.
- LI, Jian *et al.* Overview of growth differentiation factor 15 (GDF15) in metabolic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 176, p. 116809, 1 jul. 2024.
- MA, Yuting *et al.* Growth differentiation factor 11: a “rejuvenation factor” involved in regulation of age-related diseases? **Aging**, v. 13, n. 8, p. 12258–12272, 22 abr. 2021.
- MACUGLIA, Daniele. SHAKE and the exact constraint satisfaction of the dynamics of semi-rigid molecules in Cartesian coordinates, 1973–1977. **Archive for History of Exact Sciences**, v. 77, n. 4, p. 345–371, 1 jul. 2023.
- MAIER, James A. *et al.* ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 8, p. 3696–3713, 7 jul. 2015.
- MANSOUR, Mai A. *et al.* Advances in the discovery of activin receptor-like kinase 5 (ALK5) inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 147, p. 107332, 1 jun. 2024.
- MARK, Pekka; NILSSON, Lennart. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 1 nov. 2001.
- MCPHERRON, Alexandra C.; LEE, Se-Jin. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 23, p. 12457–12461, 11 nov. 1997.
- MONROY, Jenna A. *et al.* What is the role of titin in active muscle? **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 40, n. 2, p. 73–78, abr. 2012.
- MORVAN, Frederic *et al.* Blockade of activin type II receptors with a dual anti-ActRIIA/IIB antibody is critical to promote maximal skeletal muscle hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 47, p. 12448–12453, 21 nov. 2017.

MOUSTAKAS, Aristidis; HELDIN, Carl Henrik. The regulation of TGF β signal transduction. **Development**, v. 136, n. 22, p. 3699–3714, 15 nov. 2009.

NAGY-FAZEKAS, Dóra *et al.* Inhibitor Design Strategy for Myostatin: Dynamics and Interaction Networks Define the Affinity and Release Mechanisms of the Inhibited Complexes. **Molecules**, v. 28, n. 15, p. 5655, 1 ago. 2023a.

NAGY-FAZEKAS, Dóra *et al.* Inhibitor Design Strategy for Myostatin: Dynamics and Interaction Networks Define the Affinity and Release Mechanisms of the Inhibited Complexes. **Molecules**, v. 28, n. 15, p. 5655, 26 jul. 2023b.

NEUMANN, Paul E.; NEUMANN, Eve E. General histological woes: Definition and classification of tissues. **Clinical Anatomy**, v. 34, n. 5, p. 794–801, 1 jul. 2021.

NUNAN, Emily *et al.* Targeting Myostatin as an Adjunct Treatment for the Preservation of Cardiometabolic and Skeletal Muscle Function in Type 1 Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 10, p. 4830, 18 maio 2025.

OGUNJIMI, Abiodun A. *et al.* Structural basis for specificity of TGF β family receptor small molecule inhibitors. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 2, p. 476–483, 1 fev. 2012.

OLIVEIRA, R. S. *et al.* A Miostatina no melhoramento genético animal para a produção de carne. **Archivos de Zootecnia**, v. 72, n. 277, p. 78–84, 15 jan. 2023.

OZEK, Ceren *et al.* Growth Differentiation Factor 11 treatment leads to neuronal and vascular improvements in the hippocampus of aged mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17293–, 23 nov. 2018.

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, 1 out. 2004.

PHILLIPS, David J.; DE KRETZER, David M. Follistatin: A Multifunctional Regulatory Protein. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 287–322, out. 1998.

PULLMAN, Philip. **Clockwork, or All Wound Up**. Reino Unido, Doubleday, 1996.

PIRRUCCELLO-STRAUB, M. *et al.* Blocking extracellular activation of myostatin as a strategy for treating muscle wasting. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2292, 2 fev. 2018.

QUINTANILHA, Daniel B.; DOS SANTOS, Hélio F. Exploring the Myostatin Activation Pathway: A Promising Target for Treating Muscle Atrophy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 65, n. 13, p. 7039–7053, 14 jul. 2025.

QUINTANILHA, Daniel B.; SANTOS, Hélio F. Dos. Pharmacophore Modeling for Pleurotin Derivatives Targeting Human Thioredoxin Reductase. **Article J. Braz. Chem. Soc**, v. 35, p. 1–11, 2024.

QUINTANILHA, Daniel B.; SANTOS, Hélio F. Dos. Analysis of Pleurotin binding to human thioredoxin reductase using docking and molecular dynamics simulation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 12, p. 5646–5659, 2023.

RADAEV, Sergei *et al.* Ternary Complex of Transforming Growth Factor- β 1 Reveals Isoform-specific Ligand Recognition and Receptor Recruitment in the Superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14806–14814, 7 maio 2010.

REBBAPRAGADA, A. *et al.* Myostatin Signals through a Transforming Growth Factor β -Like Signaling Pathway To Block Adipogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 20, p. 7230–7242, 1 out. 2003.

RENTIER, Cédric *et al.* Design and synthesis of potent myostatin inhibitory cyclic peptides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 7, 2019.

ROCHETTE, Luc *et al.* GDF15: an emerging modulator of immunity and a strategy in COVID-19 in association with iron metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 11, p. 875–889, 1 nov. 2021.

RODRIGUEZ BUITRAGO, Jhon A.; LANDSTRÖM, Maréne; WOLF-WATZ, Magnus. Human transforming growth factor β type I receptor in complex with kinase inhibitor SB505124. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 80, n. 11, p. 314–319, 1 nov. 2024.

ROTH, Gerald J. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of indolinones as inhibitors of the transforming growth factor β receptor i (TGF β RI). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7287–7295, 28 out. 2010.

SABAT, Mark *et al.* Design, synthesis and optimization of 7-substituted-pyrazolo[4,3-b]pyridine ALK5 (activin receptor-like kinase 5) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 9, p. 1955–1961, 1 maio 2017.

SAITOH, Mariko *et al.* Discovery of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 3, p. 126892, fev. 2020.

SAWYER, J. Scott *et al.* Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted 5,6-dihydro-4H-pyrrolo[1,2-b]pyrazole inhibitors of the transforming growth factor- β type I receptor kinase domain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3581–3584, 5 jul. 2004.

SHARMA, Sonakshi; PATIL, Amol S. Myostatin's marvels: From muscle regulator to diverse implications in health and disease. **Cell Biochemistry and Function**, v. 42, n. 6, p. e4106, 14 ago. 2024.

SMITH, Rosamund C. *et al.* Inhibition of myostatin prevents microgravity-induced loss of skeletal muscle mass and strength. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, 1 abr. 2020.

SUN, Huiyong *et al.* Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 7. Entropy effects on the performance of end-point binding free energy

calculation approaches. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 21, p. 14450–14460, 30 maio 2018.

TAKAYAMA, Kentaro *et al.* Identification of the Minimum Peptide from Mouse Myostatin Prodomain for Human Myostatin Inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1544–1549, 12 fev. 2015.

TAKAYAMA, Kentaro *et al.* Effect of N-Terminal Acylation on the Activity of Myostatin Inhibitory Peptides. **ChemMedChem**, v. 11, n. 8, p. 845–849, 19 abr. 2016.

TAKAYAMA, Kentaro *et al.* Development of Potent Myostatin Inhibitory Peptides through Hydrophobic Residue-Directed Structural Modification. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 7, p. 751–756, 13 jul. 2017.

TAKAYAMA, Kentaro *et al.* Chain-Shortened Myostatin Inhibitory Peptides Improve Grip Strength in Mice. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 6, p. 985–990, 13 jun. 2019.

TAKAYAMA, Kentaro *et al.* Development of Myostatin Inhibitory D-Peptides to Enhance the Potency, Increasing Skeletal Muscle Mass in Mice. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 492–498, 10 mar. 2022.

TEBBEN, Andrew J. *et al.* Crystal structures of apo and inhibitor-bound TGF β R2 kinase domain: Insights into TGF β R isoform selectivity. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 72, n. 5, p. 658–674, 26 abr. 2016.

THOMPSON, Thomas B. *et al.* The Structure of the Follistatin:Activin Complex Reveals Antagonism of Both Type I and Type II Receptor Binding. **Developmental Cell**, v. 9, n. 4, p. 535–543, 1 out. 2005.

THOMPSON, Thomas B.; WOODRUFF, Teresa K.; JARDETZKY, Theodore S. Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF- β ligand:receptor interactions. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 7, p. 1555–1566, 1 abr. 2003.

TIAN, Chuan *et al.* Ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 1, p. 528–552, 14 jan. 2020.

TOWNSON, Sharon A. *et al.* Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 33, p. 27313–27325, 10 ago. 2012.

TZAVLAKI, Kalliopi; MOUSTAKAS, Aristidis. TGF- β Signaling. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 487, 23 mar. 2020.

VELAPARTHI, Upender *et al.* Discovery of BMS-986260, a Potent, Selective, and Orally Bioavailable TGF β R1 Inhibitor as an Immuno-oncology Agent. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 2, p. 172–178, 13 fev. 2020.

WAGNER, Kathryn R. *et al.* A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. **Annals of Neurology**, v. 63, n. 5, p. 561–571, 1 maio 2008.

WALKER, Ryan G. *et al.* Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin: Similarities, Differences, and Questions for Future Investigation. **Circulation Research**, v. 118, n. 7, p. 1125–1142, 1 abr. 2016.

WALKER, Ryan G. *et al.* Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 3 mar. 2017.

WALPURGIS, Katja *et al.* Myostatin inhibitory peptides in sports drug testing. **Drug Testing and Analysis**, v. 15, n. 11–12, p. 1477–1487, 1 nov. 2023.

WANG, Xuelu; FISCHER, Gerhard; HYVÖNEN, Marko. Structure and activation of pro-activin A. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12052, 4 jul. 2016.

WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, n. 1, p. 5.6.1-5.6.37, 1 jun. 2016.

WEBER, Dionys *et al.* A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor. **BMC Structural Biology**, v. 7, n. 1, p. 6–, 12 fev. 2007.

WETZLICH, Brock; NYAKUNDI, Benard B.; YANG, Jinzeng. Therapeutic applications and challenges in myostatin inhibition for enhanced skeletal muscle mass and functions. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 480, n. 3, p. 1535–1553, 28 mar. 2025.

WIETESKA, Łukasz *et al.* Structures of TGF- β with betaglycan and signaling receptors reveal mechanisms of complex assembly and signaling. **Nature Communications** 2025 16:1, v. 16, n. 1, p. 1778–, 26 fev. 2025.

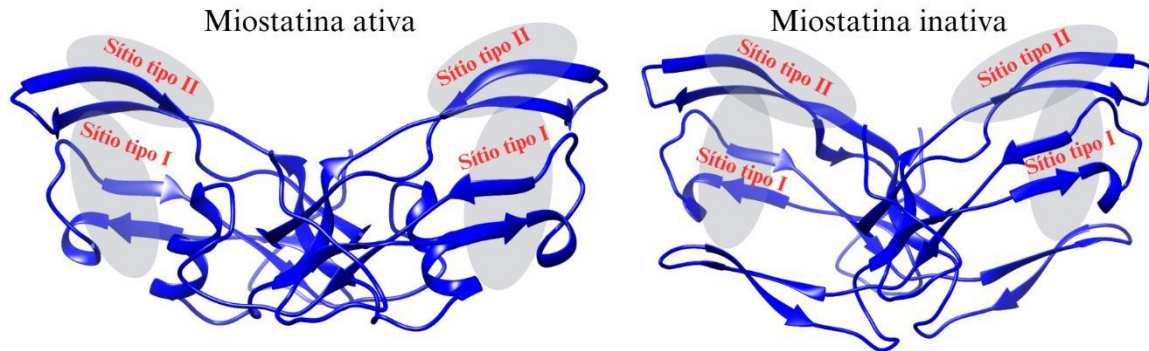
WOODERCHAK-DONAHUE, Whitney L. *et al.* BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. **American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 3, p. 530–537, 5 set. 2013.

ZHANG, Yong *et al.* Discovery of 4-Azaindole Inhibitors of TGF β RI as Immunoncology Agents. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 11, p. 1117–1122, 8 nov. 2018.

ZUMBAUGH, Morgan D. *et al.* Molecular and biochemical regulation of skeletal muscle metabolism. **Journal of Animal Science**, v. 100, n. 8, 1 ago. 2022.

ZUNIGA, Jorge E. *et al.* The T β R-I Pre-Helix Extension Is Structurally Ordered in the Unbound Form and Its Flanking Prolines Are Essential for Binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 412, n. 4, p. 601–618, 30 set. 2011.

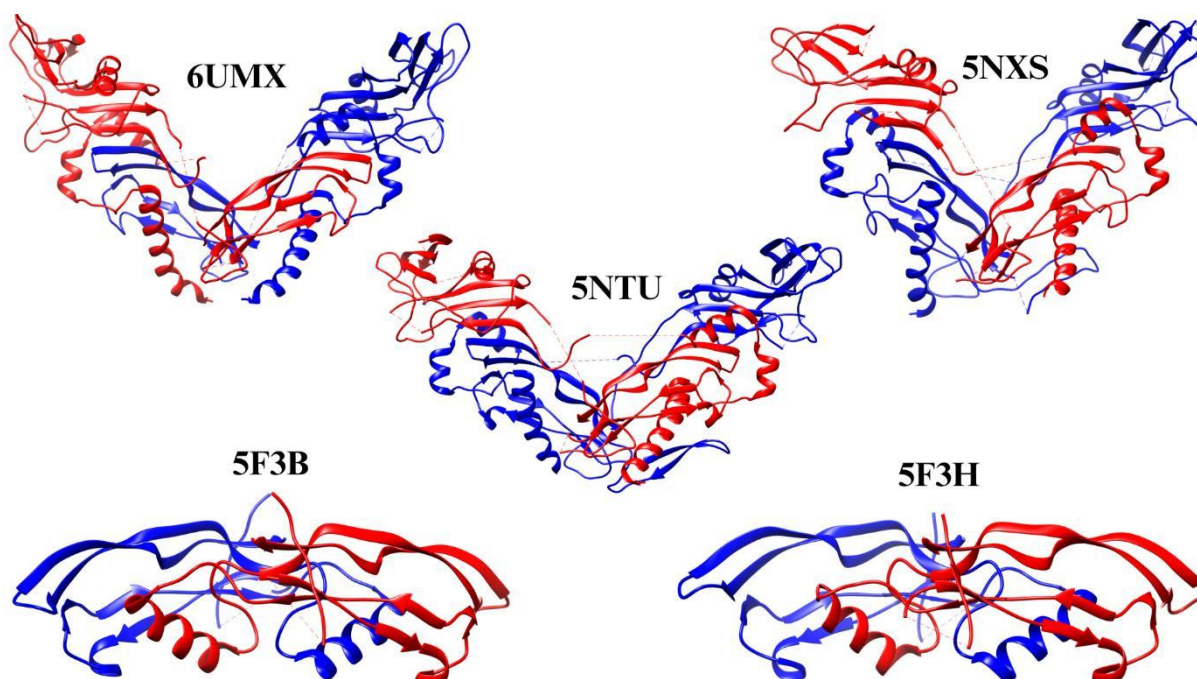
APÊNDICE A – Representação dos epítomos da miostatina humana em sua conformação ativa e inativa.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: A figura apresenta as estruturas da miostatina em sua conformação ativa e inativa com destaque para as prováveis localizações do sítio de interação com os domínios extracelulares da ALK4/5 (tipo I) e com a AcvR2A/2B (tipo II).

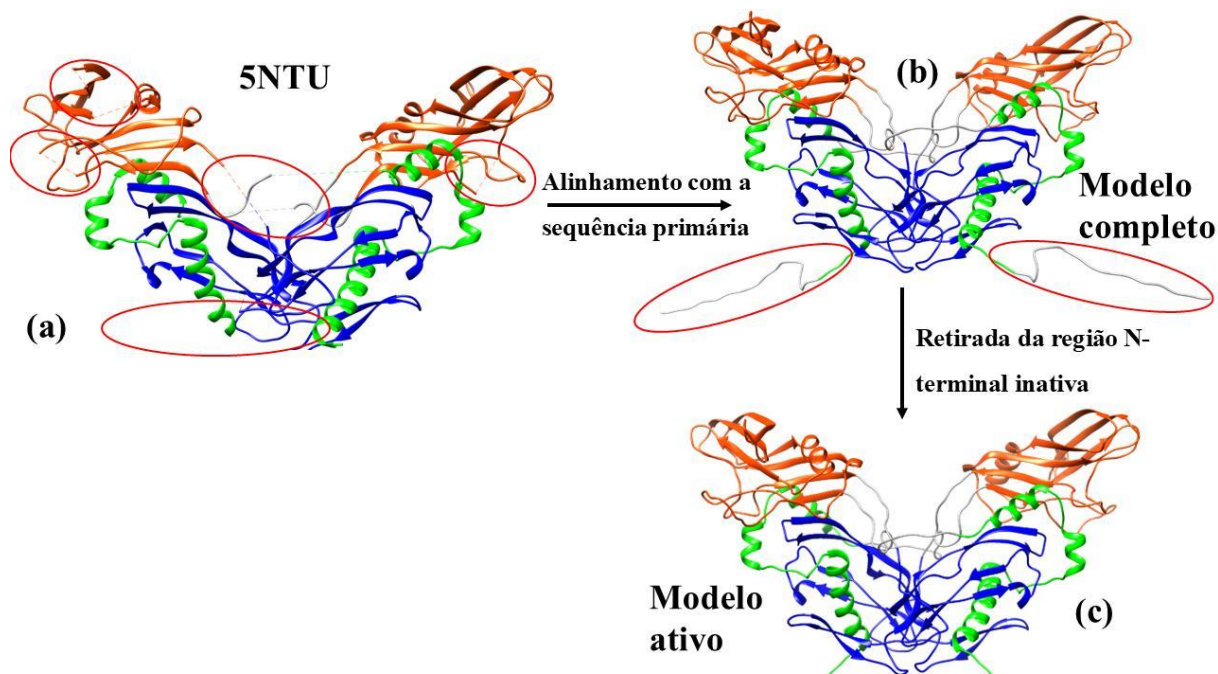
APÊNDICE B – Estruturas cristalográficas disponíveis no PDB para a miostatina humana.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: A figura apresenta as estruturas cristalográficas da miostatina humana disponíveis no PDB. As estruturas 5NTU, 6UMX e 5NXS são referentes ao precursor da miostatina, enquanto as estruturas 5F3B e 5F3H são referentes as estruturas da miostatina ativa. As cores azul e vermelho indicam as duas cadeias da miostatina.

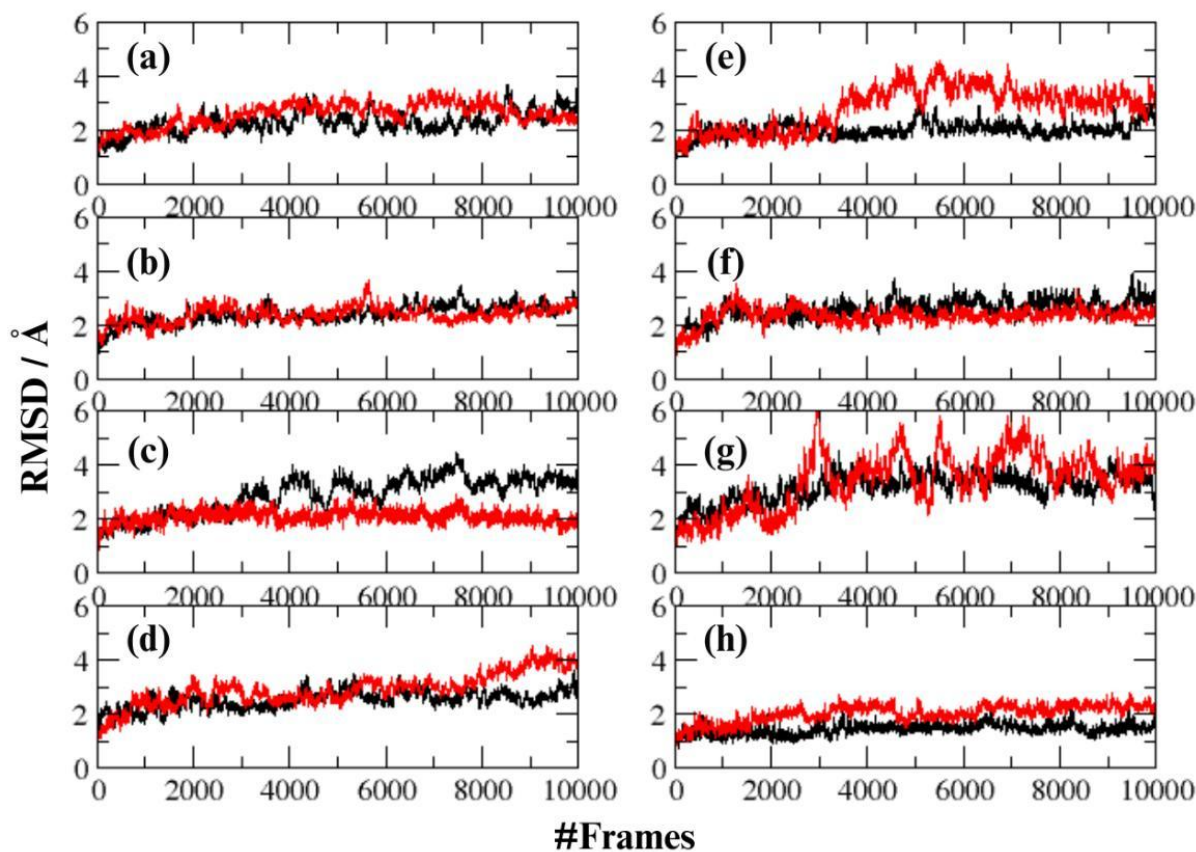
APÊNDICE C – Construção do modelo da promiostatina humana a partir do PDB 5NTU.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Estruturas da promiostatina humana. (a) PDB 5NTU com destaque para as regiões ausentes que necessitam de modelagem. (b) Modelo completo da miostatina construído com o software Modeller implementado no programa USCF Chimera. (c) Modelo ativo da promiostatina construído com o software Modeller implementado no programa USCF Chimera. A coloração das regiões, para todas as estruturas, está de acordo com o proposto na Figura 2 para os domínios da promiostatina.

APÊNDICE D – RMSD calculado para todas as proteínas envolvidas no processo de ativação nos últimos de 100 ns de simulação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: RMSD calculado nos últimos 100 ns para cada réplica, sendo a cor preta a primeira réplica e a vermelha a segunda. (a) Promiostatina, (b) complexo latente, (c) TLD – p1, (d) p1 – inter, (e) TLD – p2, (f) p2 – inter, (g) MSTN inativa e (h) MSTN ativa.

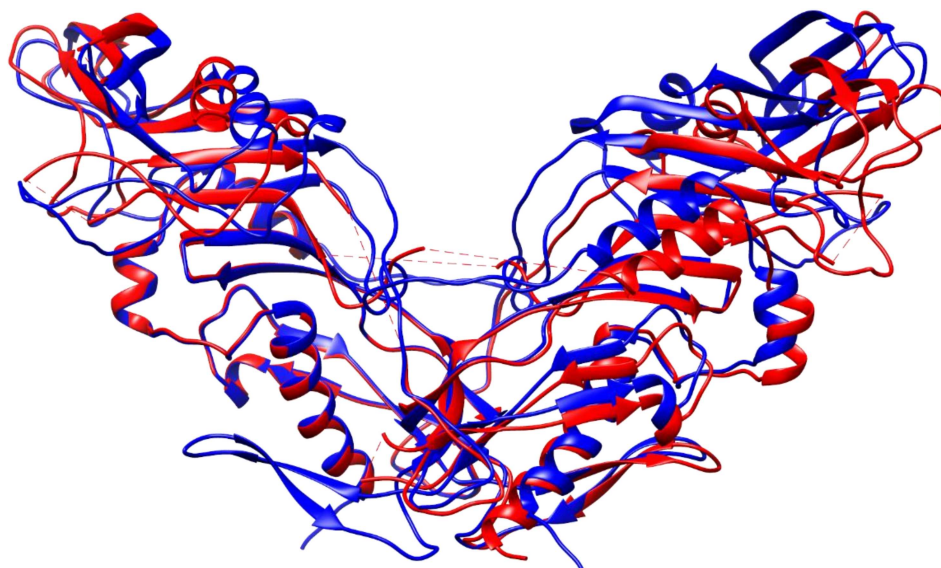
APÊNDICE E – Valores de RMSD para todas as proteínas envolvidas no processo de ativação da miostatina humana.

	Replica 1	Replica 2	Média
Promiostatina	2,3 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,2
Complexo latente	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,0
TLD-p1	2,9 ± 0,7	2,3 ± 0,5	2,6 ± 0,4
p1-inter	2,7 ± 0,3	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1
TLD-p2	2,0 ± 0,3	2,9 ± 0,8	2,4 ± 0,4
p2-inter	3,1 ± 0,4 (2,5 ± 0,2)	2,4 ± 0,4 (2,1 ± 0,3)	2,8 ± 0,4 (2,3 ± 0,3)
MSTN inativa	3,2 ± 0,5 (2,5 ± 0,4)	3,5 ± 1,0 (2,8 ± 0,6)	3,3 ± 0,1 (2,6 ± 0,2)
MSTN ativa	1,4 ± 0,2 (1,9 ± 0,3)	2,0 ± 0,3 (2,0 ± 0,5)	1,7 ± 0,3 (2,0 ± 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota: Todos os valores estão em Å e foram calculados nos últimos 100 ns de simulação. Os valores entre parêntesis são referentes ao cálculo final envolvendo os 2,5 µs de simulação, com o RMSD calculado nos últimos 500 ns de simulação.

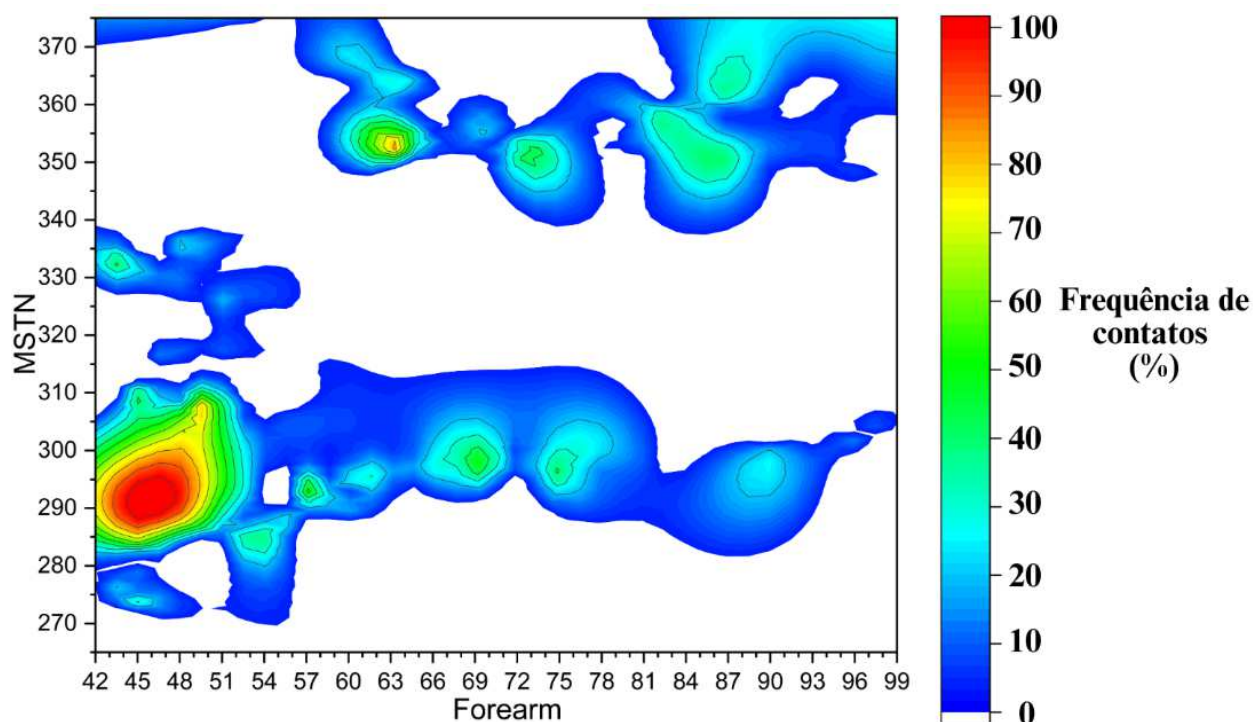
APÊNDICE F – Comparação entre a estrutura da estrutura cristalográfica da promiostatina e a estrutura de equilíbrio oriunda da DM.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Comparação estrutural entre a estrutura em fase sólida da promiostatina (PDB 5NTU) (vermelho) e a estrutura de equilíbrio obtida do último frame dos últimos 500 ns de simulação de DM (azul). O RMSD calculado entre as duas estruturas foi de 1.31 Å.

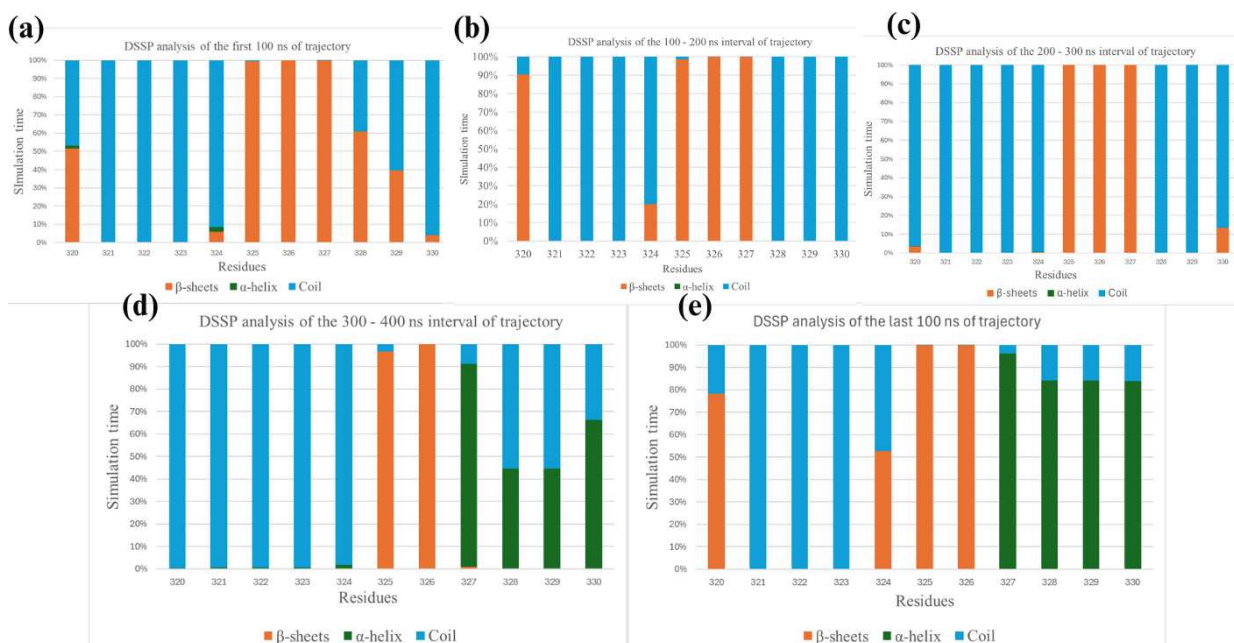
**APÊNDICE G – Contatos nativos entre o *forearm* e *mstn* para o complexo p2 –
inter em simulação extensa de 2,5 μ s.**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: A figura mostra os contatos nativos entre o *forearm* e a *MSTN* calculados ao longo dos últimos 500 ns de cada simulação de 2,5 μ s para o complexo p2 – inter. A frequência de contatos representa a média observada entre ambas as replicas. Regiões com alta frequência de contatos (> 50%) corresponde as interações entre o início da região $\alpha 1$ no *forearm* (C42 – I53) e o a região do *inferior finger* da *MSTN* (R283 – S310).

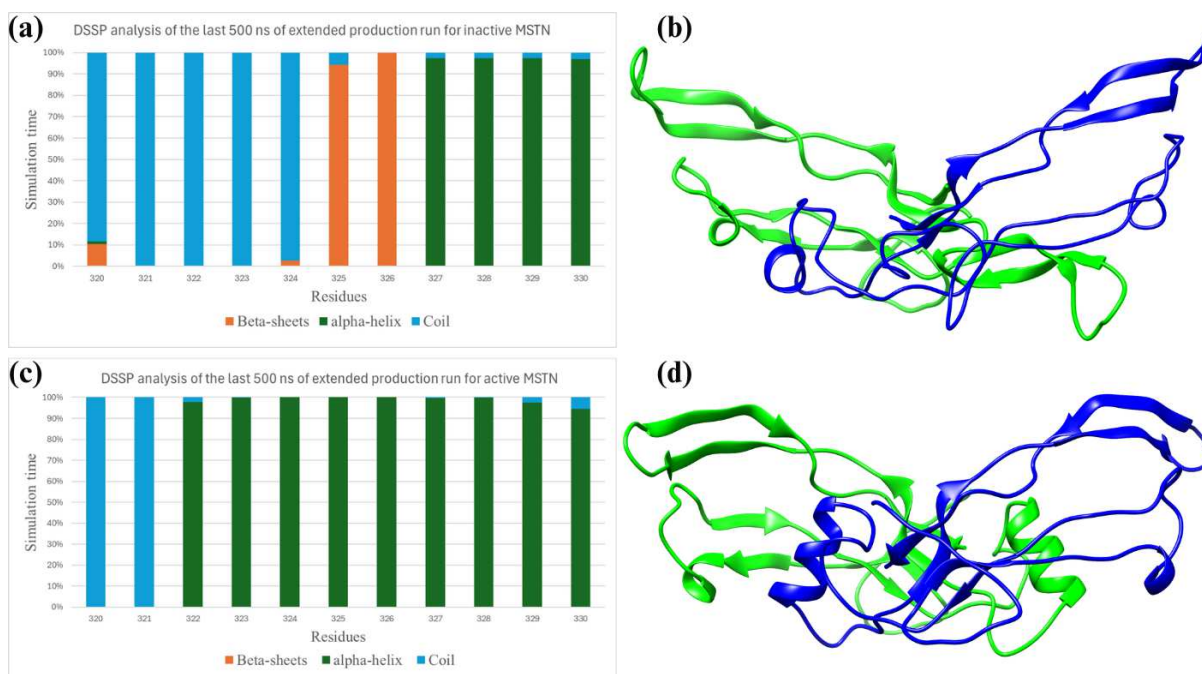
APÊNDICE H – Análise dssp da região wrist hélice da miostatina inativa (cadeia b) durante os 500 ns simulação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: As análises foram separadas em intervalos de 100 ns de simulação: (a) 0 – 100 ns, (b) 100 – 200 ns, (c) 200 – 300 ns, (d) 300 – 400 ns e (e) 400 – 500 ns.

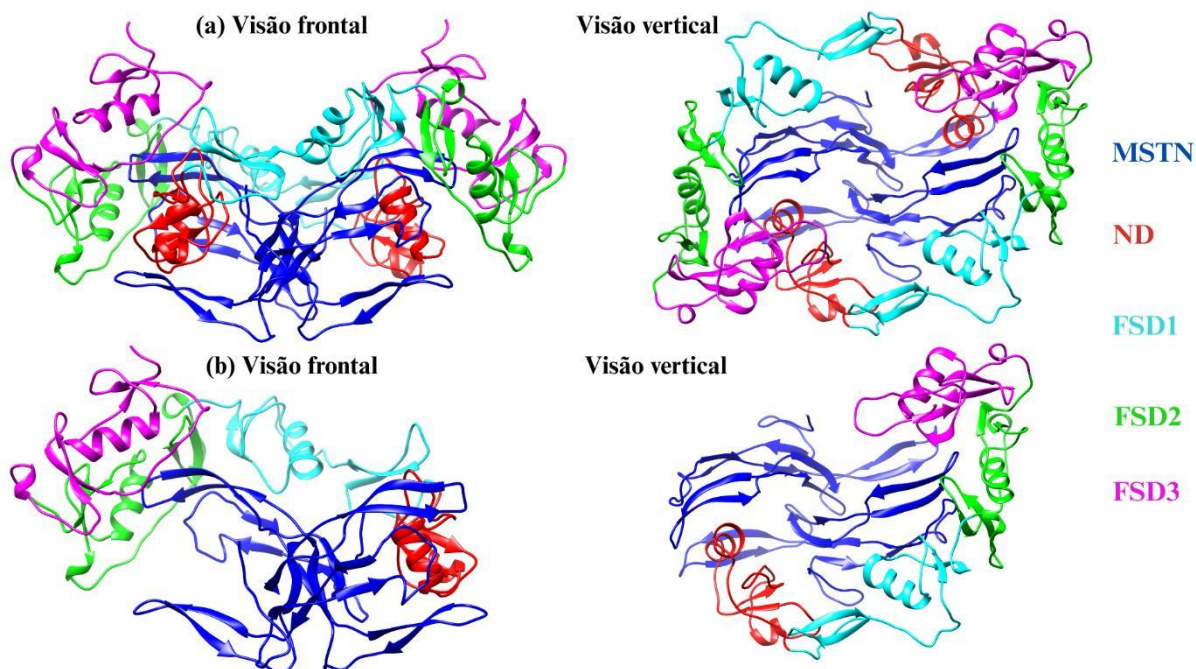
APÊNDICE I – Análise dssp da região wrist hélice da miostatina inativa (cadeia b) e ativa durante os últimos 500 ns simulação prolongada.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025)

Nota: (a) Análise DSSP da miostatina inativa durante os últimos 500 ns de produção estendida. (b) Estrutura final da MSTN inativa após 2,5 μ s de simulação. (c) Análise DSSP da miostatina ativa durante os últimos 500 ns de produção estendida. (d) Estrutura final da MSTN ativa após 2,5 μ s de simulação.

APÊNDICE J – Estruturas dos complexos formados pela miostatina inativa e a folistatina nas proporções 1:2 e 1:1.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Estrutura dos complexos da MSTN em sua forma ativa complexada na proporção 1:2 MSTN:FST (a) e complexada na proporção 1:1 MSTN:FST (b). Em azul está a estrutura da MSTN ativa e em roxo a estrutura da FST.

APÊNDICE K – Valores de RMSD para os complexos MSTN_{ativa} – FST, MSTN_{ativa} – FST₂, MSTN_{inativa} – FST e MSTN_{inativa} – FST₂.

	Replica 1	Replica 2	Média
MSTN _{ativa} – FST	3,6 ± 0,7	4,1 ± 0,2	3,8 ± 0,4
MSTN _{ativa} – FST ₂	2,5 ± 0,2	3,6 ± 0,3	3,0 ± 0,6
MSTN _{inativa} – FST	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,1
MSTN _{inativa} – FST ₂	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,0

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025)

Nota: Todos os valores estão em Å e foram calculados nos últimos 100 ns de simulação.

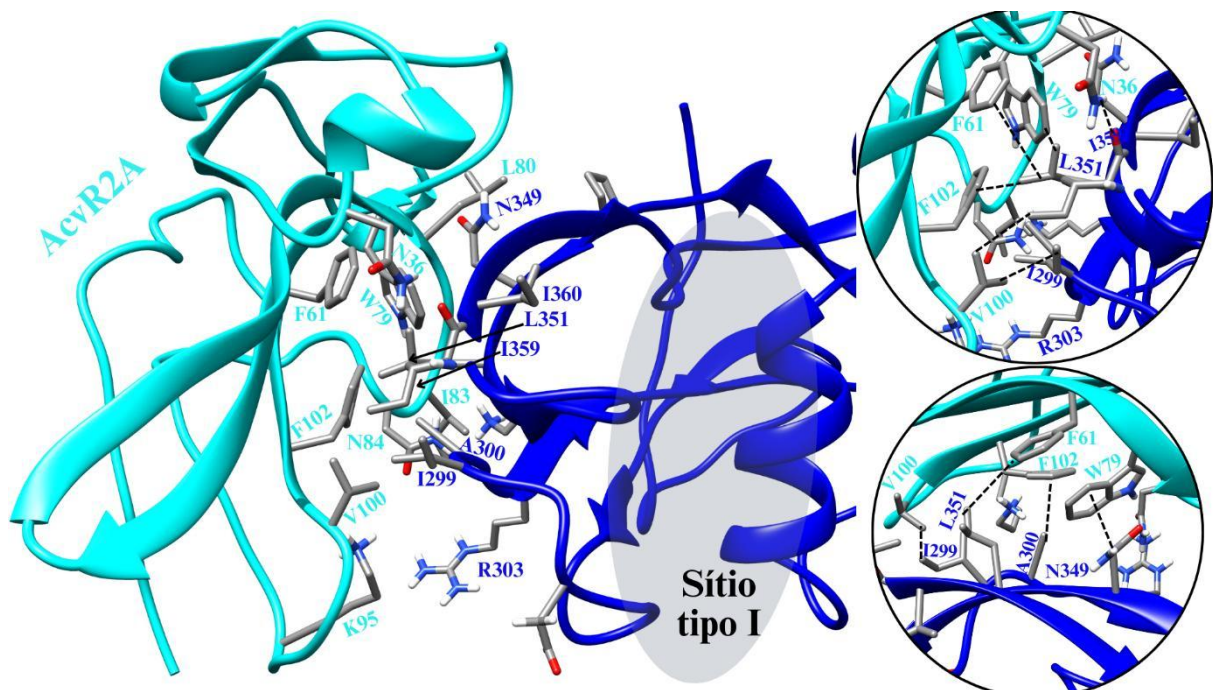
**APÊNDICE L – Hot spots para os complexos MSTN_{ativa} – FST, MSTN_{ativa} – FST₂,
MSTN_{inativa} – FST e MSTN_{inativa} – FST₂.**

Complexos	Hot spots
N-terminal (ND)	
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	L34 R35 L45 Y46 R60 N73 F76 K77
MSTN _{ativa} – FST ₂ + MSTN _{ativa} – FST	I80 F81
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	V44
MSTN _{ativa} – FST	
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	M79
MSTN _{ativa} – FST ₂	
MSTN _{ativa} – FST ₂ + MSTN _{ativa} – FST +	K47
MSTN _{inativa} – FST ₂	
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST	T48 T58 G59
MSTN _{inativa} – FST + MSTN _{ativa} – FST ₂	L61
MSTN _{inativa} – FST ₂	V70 N71 L75
MSTN _{inativa} – FST	S62
MSTN _{ativa} – FST	N82
FDS1	
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	L134 D135 P154
MSTN _{ativa} – FST ₂ + MSTN _{ativa} – FST	
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	R115 Q153
MSTN _{ativa} – FST ₂	
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	E155
MSTN _{ativa} – FST	
MSTN _{inativa} – FST	K104
FDS2	
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	Q183 Y188 V190 R194 L220 R221
MSTN _{ativa} – FST ₂ + MSTN _{ativa} – FST	S230 G232 L233
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	D182 N193
MSTN _{ativa} – FST ₂	
MSTN _{inativa} – FST + MSTN _{ativa} – FST ₂	V180 C218
MSTN _{ativa} – FST	T191 C192

MSTN _{ativa} – FST ₂	C225
FDS3	
MSTN _{inativa} – FST ₂ + MSTN _{inativa} – FST +	E309
MSTN _{ativa} – FST ₂ + MSTN _{ativa} – FST	
MSTN _{ativa} – FST	S279 D280
MSTN _{ativa} – FST ₂	C267
MSTN _{inativa} – FST	K278

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

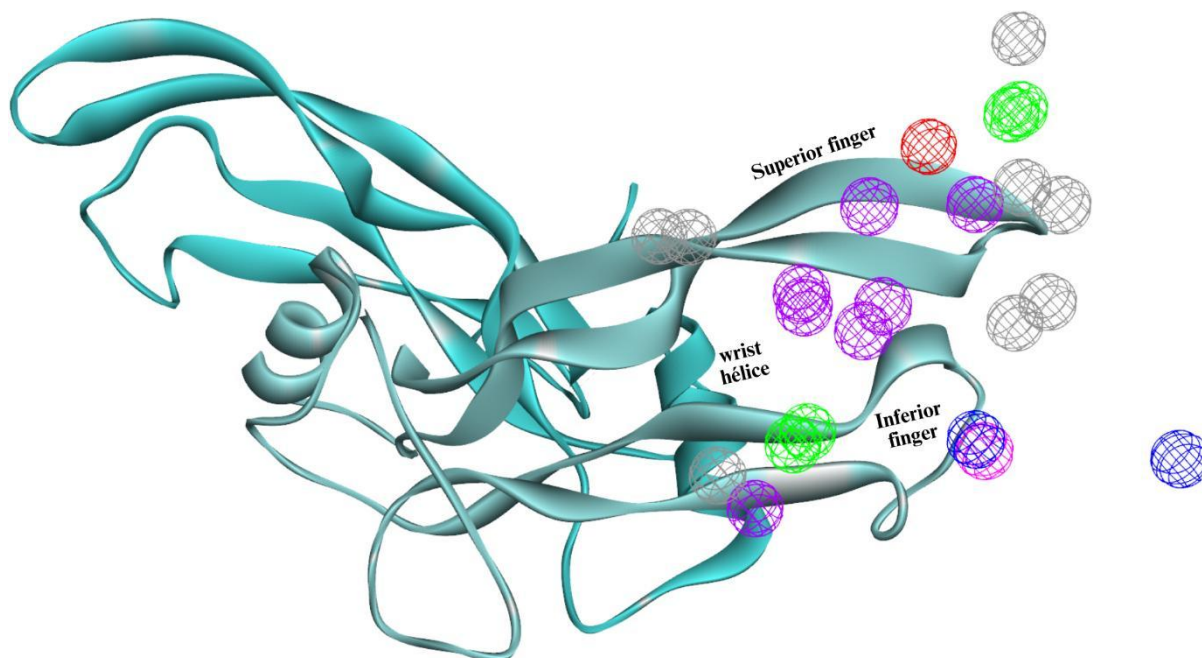
Nota: Hot spots obtidos para os complexos entre a MSTN e a FST nas proporções 1:1 (MSTN_{ativa} – FST e MSTN_{inativa} – FST) e 1:2 (MSTN_{inativa} – FST₂ e MSTN_{ativa} – FST₂). Os resíduos selecionados como hot spots apresentam contribuição para o $\Delta G_{aq} \leq -1$ kcal mol⁻¹. Todas as análises foram realizadas nos últimos 100 ns da trajetória para cada réplica, e os resíduos selecionados apareceram ao menos em uma das réplicas. O cálculo MM-GBSA foi feito usando um passo de 0.2 ns (=500 frames) e igb=2.

APÊNDICE M – Interações entre os hot spots do receptor AcvR2a com a MSTN.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Os resíduos que estão em ciano são referentes a AcvR2A e os que estão em azul são referentes ao sítio tipo II da MSTN.

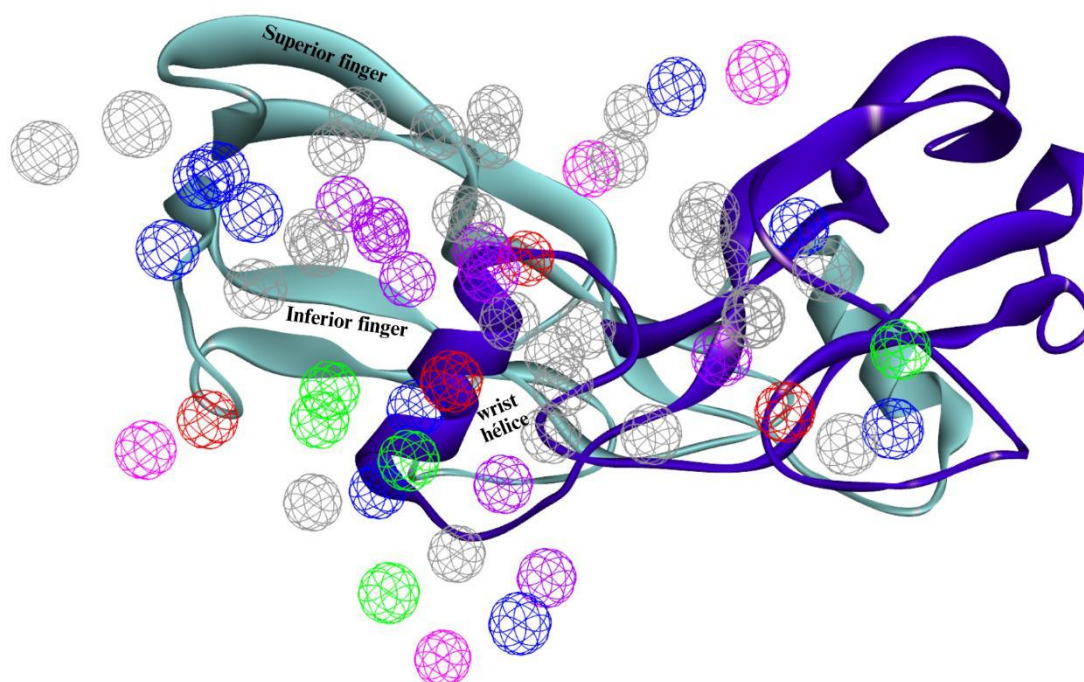
APÊNDICE N – Grupos farmacofóricos observados para interação com o sítio tipo II da MSTN.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Todos os grupos farmacofóricos observados para os complexos MSTN – FST, MSTN – FST₂, MSTN – AcvR2A, MSTN – AcvR2A₂, MSTN – AcvR2B, MSTN – AcvR2B₂, complexo latente, TLD – p1, TLD – p1 inter, TLD – p2 e TLD – p2 inter para o sítio tipo II da MSTN.

APÊNDICE O – Grupos farmacofóricos observados para interação com o sítio tipo I da MSTN.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: Todos os grupos farmacofóricos observados para os complexos MSTN – FST, MSTN – FST₂, MSTN – ALK4, MSTN – ALK4₂, MSTN – ALK4, MSTN – ALK5₂, complexo latente, TLD – p1, TLD – p1 inter, TLD – p2 e TLD – p2 inter para o sítio tipo I da MSTN.