

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Triagem virtual por docagem molecular na busca de ligantes
para receptores CB2 candidatos para o tratamento de dor
neuropática**

Artur Caminero Gomes Soares

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Prof. Dr Gustavo Henrique Goulart
Trossini

São Paulo

2021

” A ciência explica a natureza e cria novos mundos que não percebemos com nossos sentidos”

(Marcelo Gleiser)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Definição, Epidemiologia e Tratamento da Dor Neuropática	4
1.2. Fisiopatologia da Dor Neuropática.....	5
1.2.1. A Microglia e a Dor Neuropática	6
1.3. Receptores Canabinóides.....	9
1.3.1. O Receptor Canabinóide 2 e a Dor Neuropática.....	11
1.3.2. Sítio Ativo do Receptor Canabinóide 2	12
1.3.3. Seletividade entre os Receptores Canabinóides 1 e 2.....	13
1.3.4. Seletividade entre agonistas e antagonistas do Receptor Canabinóide 2.....	14
1.4. Química Computacional	14
1.4.1. Estratégias computacionais usadas no planejamento de fármacos	15
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos Específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Seleção da Estrutura 3D do Receptor	15
3.2. Preparamento do Banco de Dados.....	16
3.3. Docagem Molecular e Triagem virtual.....	16
3.4. Análise dos Resultados.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Programas e Proteína Utilizados.....	17
4.2. <i>Redocking</i>	18
4.3. Triagem Virtual	19
5. CONCLUSÃO	25
6. BIBLIOGRAFIA	27
7. ANEXO	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Fator</i>
CADD	<i>Computer-Assisted Drug Design</i>
CP	Corno Posterior
CSF1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
DAP12	<i>DNAX-Activation Protein 12</i>
DN	Dor Neuropática
ECL	<i>loops extracelulares</i>
ICL	<i>loops intracelulares</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
KCC2	cotransportador K-CL
LBDD	<i>Ligand- Based Drug Design</i>
LNP	Lesão ao Nervo Periférico
LITEC	Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais
PDB	Protein Data Bank
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
SBDD	<i>Structure-Based Drug Design</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TLR2	<i>Toll-Like Receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i>

TM alfa hélices transmembranais

TREM 2 *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*

RESUMO

SOARES, A. C. G. **Triagem virtual por docagem molecular na busca de ligantes para receptores CB2 candidatos para o tratamento de dor neuropática.** Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Palavras-chave: triagem virtual, docagem molecular, receptor canabinoide 2

INTRODUÇÃO: Dor neuropática é classificada como dor causada por lesão ou doença no sistema somatossensorial e acomete de 6,9 a 10% da população mundial e o uso de agonistas do Receptor Canabinoide 2 (CB2R) tem-se mostrado eficaz no tratamento da patologia **OBJETIVO:** Realizar uma triagem virtual por docagem moléculas a busca de ligantes agonistas do CB2R. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi realizada a triagem virtual por docagem molecular de 3968 moléculas nos programas GOLD 2020.3.0® e DockThor 2.0®. As 100 moléculas mais bem classificadas por cada programa foram selecionadas, e as estruturas em que houve consenso passaram por uma análise visual. **RESULTADOS:** Os programas apresentaram consenso em 22 moléculas, que após a análise visual, verificou-se que 11 compostos apresentaram acordo não só na classificação, mas também de pose, ou seja, na complementaridade com o alvo. **CONCLUSÃO:** As 11 moléculas selecionadas nesta triagem virtual, sugerem afinidade e, conseqüentemente, atividade com o receptor CB2, e devem ser estudadas no processo de busca de fármacos para dor neuropática.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição, Epidemiologia e Tratamento da Dor Neuropática

A dor neuropática (DN) é classificada pela *International Association for the Study of Pain* como “dor causada por lesão ou doença no sistema somatossensorial” (JENSEN et al., 2011). Tal sistema é responsável pela percepção de toque, pressão, dor, temperatura, posição, movimento e vibração (COLLOCA et al., 2017). Os principais sintomas da DN são alodínia, dor aguda, hiperalgesia de calor, hiperalgesia de frio e dor mantida simpaticamente (BARON; 2009), distribuídos principalmente entre pés, panturrilha, mãos e braços (COLLOCA et al., 2017).

Há diversos mecanismos patológicos que podem levar à DN, sendo os mais comuns: diabetes mellitus, neuralgia pós-hermética, neuralgia do trigêmeo, radiculopatia, lesão na medula espinhal ou nervo periférico, *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), quimioterapia, amputação, esclerose múltipla, derrame (COLLOCA et al., 2017) (SELVARAJAH; GANDHI; TESFAYE, 2017) e também pode ser um sintoma de infecção grave por COVID-19 (ÖZDAĞ; ACARLI et al., 2020).

Devido aos diversos modos de manifestação da DN, heterogeneidade dos estudos e diferentes definições, não há dados corretos de prevalência nem incidência da doença, mas estima-se ser entre 6,9 e 10% da população mundial (POSSO et al., 2016). Um estudo feito no Reino Unido apresentou prevalência de 8,2%(TORRANCE et al. 2006), outro na França obteve 6,9%(BOUHASSIRA et al., 2008) e um no Brasil 10%(DE MORAES VIEIRA et al., 2012). Em todos os estudos, a DN é mais comum em pessoas do sexo feminino, de idade mais avançada e baixa escolaridade.

A terapia atual da DN foca em tratar seus sintomas, sendo possível abordar a causa somente em poucos casos patológicos. O tratamento de primeira linha, proposto pelo “*Special Interest Group on Neuropathic Pain*” consiste em gabapentinóides, antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos de recaptção de serotonina e norepinefrina. Lidocaína, capsaicina e tramadol são recomendados como tratamento de segunda linha. Por último, opióides fortes

(morfina e oxicodona) e toxina botulínica são o tratamento de terceira escolha. Infelizmente, as opções atuais de tratamento têm diversos efeitos adversos indesejados, como letargia, náusea, efeitos colinérgicos e risco de suicídio (CAVALLI et al., 2019).

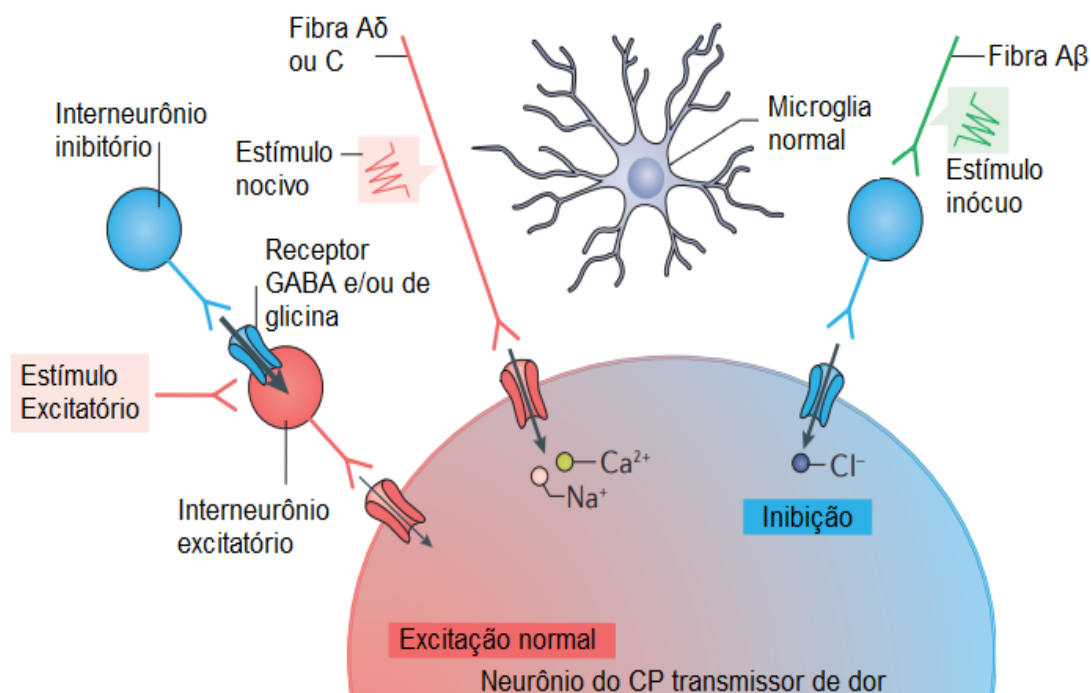
1.2. Fisiopatologia da Dor Neuropática

A vasta maioria dos estudos sobre a fisiopatologia da DN é feita em modelos em ratos com lesão ao nervo periférico (LNP), portanto esta é a patologia que será aqui discutida (INOUE; TSUDA, 2018).

Para entender a DN, é importante conhecer o funcionamento do estímulo da dor em condições fisiológicas, como é possível observar na figura 1. Tal estímulo excitará as extremidades periféricas de neurônios nociceptivos, constituídos principalmente de fibras A δ e C, e será transmitido ao corno posterior (CP), na medula espinal, onde ativará neurônios de projeção na lâmina I. Essa ativação ocorre direta e indiretamente, por meio de um complexo circuito neuronal que excita e inibe interneurônios (INOUE; TSUDA, 2018).

Também é importante conhecer o funcionamento do estímulo inócuo, transmitido através de fibras A β não nociceptivas até o CP. Lá, as fibras A β inibem os neurônios de projeção nociceptivos da lâmina I, através de interneurônios com receptores GABA e/ou glicina (figura 1) (INOUE; TSUDA, 2018).

Figura 1 - Demonstração dos mecanismos de transmissão do estímulo nocivo e inócua em situação fisiológica.



Fonte: (INOUE, TSUDA, 2018 - adaptado)

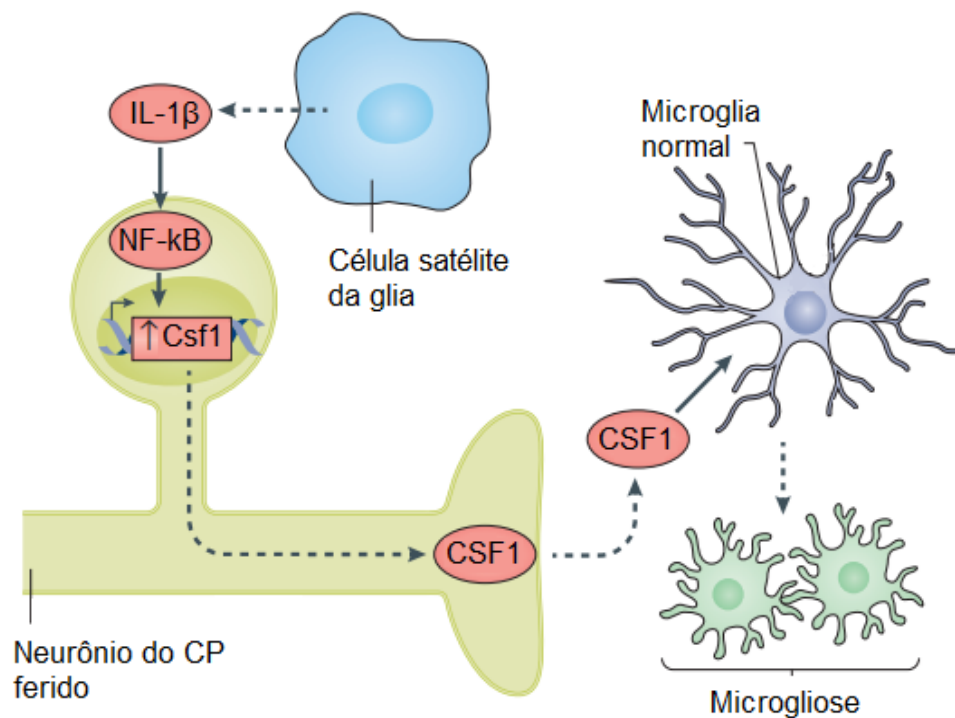
Após LNP, as propriedades elétricas dos nervos sensoriais são alteradas, o que leva a um desequilíbrio entre os interneurônios excitatórios e inibitórios do CP da medula espinal, causando um estado de hiperexcitabilidade. Diversas mudanças que ocorrem com o tempo, tanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP) e no Sistema nervoso Central (SNC), tornam a dor neuropática uma condição crônica (COLLOCA et al., 2017).

1.2.1. A Microglia e a Dor Neuropática

Microglia são as células nativas do sistema imune do SNC (HANSEN; HANSON; SHENG, 2018) e correspondem a 5-10% de todas as células deste sistema em mamíferos adultos (INOUE; TSUDA, 2018). Estudos mostram que a ativação da microglia tem importante função na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, como a DN, Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, doença de Huntington e AIDS (WU et al., 2017; NAGUIB et al., 2012; CHUNG et al., 2016; BENITO et al., 2005; BENITO et al., 2003).

Desde a década de 1970 sabe-se que, após LNP, há aumento no número de células da microglia no CP (GILMORE, 1975; GILMORE; SKINNER, 1979). Nesta situação, células satélite da glia liberam interleucina-1 β (IL-1 β), que irá estimular a expressão do fator estimulante de colônias (do inglês *Colony Stimulating Factor 1* - CSF1) pelos neurônios danificados do corno posterior. O fator atuará, então, no receptor CSF1, que é expresso na microglia e induz sua proliferação (microgliose) e ativação, conforme mostrado na figura 2 (INOUE; TSUDA, 2018). Tal ativação leva a mudanças no fenótipo da microglia, de uma célula saudável anti-inflamatória à uma célula reativa e pró-inflamatória (BIE et al., 2018).

Figura 2 - Explicação de como ocorre a microgliose após LNP.

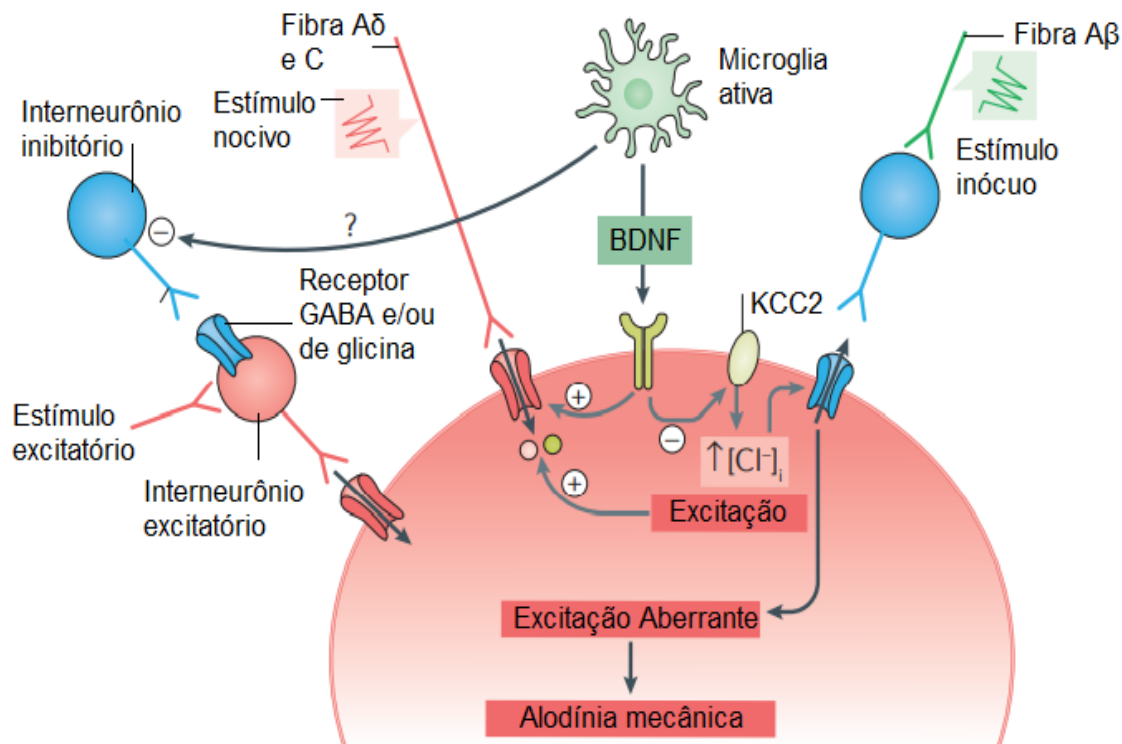


Fonte: (INOUE, TSUDA, 2018 - adaptado)

Com maior número de microglias ativas, ela começará a produzir e liberar *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), diminuindo a atividade do cotransportador K-CL (KCC2), o que aumenta a concentração intracelular de cloreto e leva a despolarização do potencial de reversão do ânion. Nestas condições, o GABA ou a glicina liberados pelo estímulo inócua irão excitar o neurônio transmissor de dor do corno posterior, enquanto a LNP diminui a ação

dos interneurônios inibitórios e aprimora a atividade dos interneurônios excitatórios.

Figura 3 - Mecanismos de excitação neuronal causada pela liberação de BDNF pelas células da microglia.



Fonte: (INOUE, TSUDA, 2018 - adaptado)

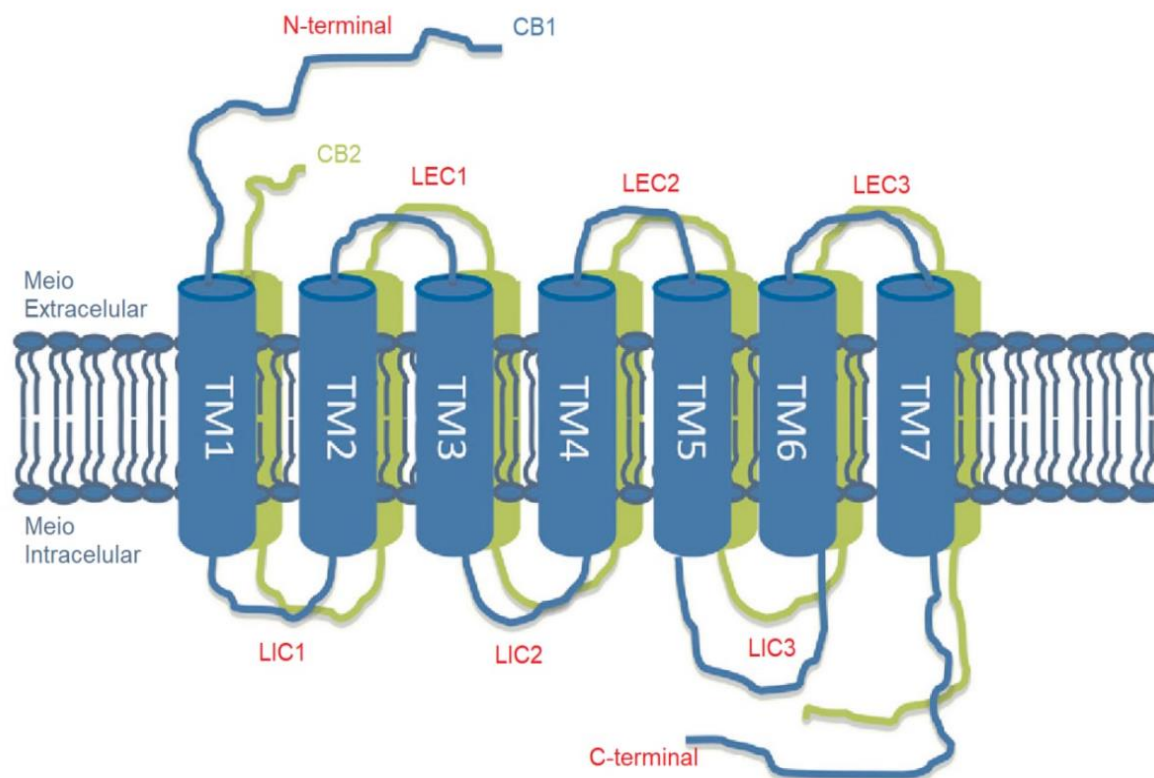
Adicionalmente, a ativação dos receptores *toll-like 2* (TLR2) e *toll-like 4* (TLR4), *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells* (TREM 2) e/ou *DNAX-activation protein 12* (DAP12) nas células da microglia, por mecanismos ainda desconhecidos, induzem-nas a produzir IL-1 β , que aumenta a transmissão sináptica excitatória de glutamato e diminui a inibitória de GABA e glicina nos neurônios do CP. Ativadas, aquelas células também liberam *tumour necrosis factor* (TNF), que eleva a liberação de glutamato nos terminais pré-sinápticos dos neurônios primários aferentes e aumenta a transmissão sináptica excitatória diretamente nos neurônios do CP e indiretamente através de astrócitos e células endoteliais. Ele também incentiva a microglia a liberar BDNF (INOUE; TSUDA, 2018).

1.3. Receptores Canabinóides

A *Cannabis sativa* é uma planta popular, usada há milênios pela humanidade. Um de seus usos medicinais mais antigos é no tratamento de dor, havendo relatos de seu uso como anestésico na China antiga e analgésico no Egito, Roma e Índia antigas (PETERS; NAHAS, 1999). Seus efeitos medicinais estimularam pesquisas por seus ingredientes ativos, o que levou à descoberta do (-)- Δ^9 -trans-(6aR,10aR)-tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC), seu principal composto ativo, em 1964 (GAONI; MECHOULAM, 1964). Acreditava-se que a planta poderia ter efeito não-específico, até que em 1990 foi provada a existência do Receptor Canabinóide 1 (CB1R)(MATSUDA et al., 1990) e do Receptor Canabinóide 2 (CB2R) em 1993 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993).

Os Receptores Canabinóides estão envolvidos na modulação de diversos sistemas fisiológicos, dentre eles: nervoso, endócrino, imune, cardiovascular, reprodutivo e trato gastrointestinal. São receptores que fazem parte da família de receptores acoplados à proteína-G, caracterizada por possuírem um nitrogênio terminal extracelular, 7 alfa hélices transmembranais (TM), 3 *loops* extracelulares (ECL), três *loops* intracelulares (ICL) e um carbono-terminal intracelular (LU; POTTER, 2017). Os receptores CB1 e CB2 têm 44% de similaridade em aminoácidos e 68% de homologia entre as TMs (SHAHBAZI et al., 2020).

Figura 4 - Comparação das estruturas sobrepostas dos Receptores Canabinóides 1 e 2, em 2D.



Fonte: (LU, POTTER, 2017 - adaptado).

Tendo a sua principal função em modular a liberação de neurotransmissores pré-sinápticos, o receptor CB1R é codificado pelo gene CNR1, presente no cromossomo humano 6 (YAO; MACKIE, 2009) e tem 472 aminoácidos. Está principalmente localizado no SNC, e, em sua maioria estão acoplados à proteína Gi/o, porém, sob certas condições, também são acoplados à proteína Gq/11 e Gs (LU; POTTER, 2017).

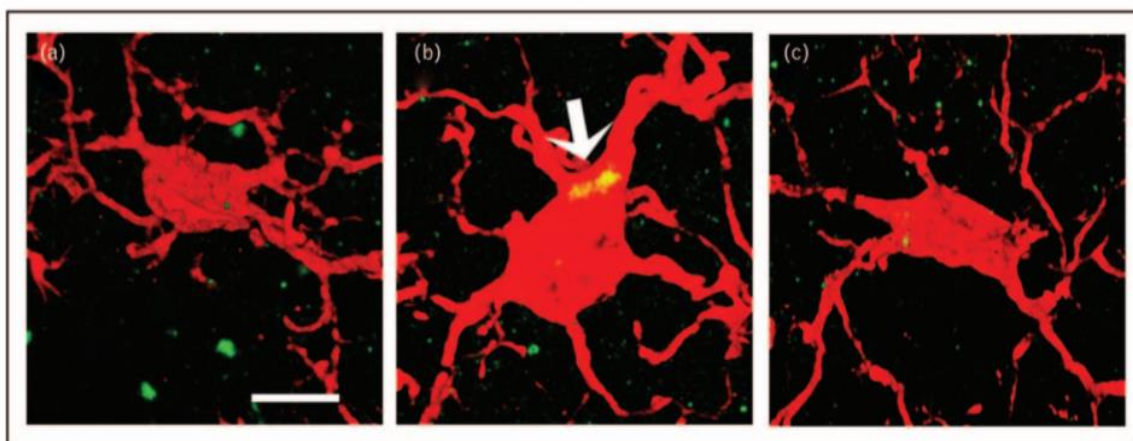
Já o receptor CB2R é codificado pelo gene CNR2, presente no cromossomo humano 1 (YAO; MACKIE, 2009) e tem 360 aminoácidos e estão sempre acoplados à proteína Gi/o (LU; POTTER, 2017). Acreditava-se que o CB2R estava presente somente na periferia do sistema nervoso, particularmente no baço e sistema imune, porém, há evidências recentes de sua presença, apesar de estar em números menores, no cérebro, neurônios, trato gastrointestinal, sistema cardiovascular, ossos e sistema reprodutivo (YE et al., 2019; JORDAN; XI, 2019; FOSTER et al., 2016; STEMPEL et al., 2016). Ao

serem estimulados, eles inibem a atividade de adenilato ciclase, diminuindo a concentração intracelular de monofosfato cíclico de adenosina.

1.3.1. O Receptor Canabinóide 2 e a Dor Neuropática

Diversos estudos demonstram que o uso de agonistas de CB2R no tratamento de DN limita o processo de hiperexcitação provocado pela microglia e, conseqüentemente, os sintomas da doença (CABAÑERO et al., 2020; IBRAHIM et al., 2003; GADO et al., 2019; YAMAMOTO; MIKAMI; IWAMURA, 2008; BIE et al., 2018; EHRHART et al., 2005; ROMERO-SANDOVAL; EISENACH, 2007; IBRAHIM et al., 2005). Como comentado acima, na DN, diversas células da microglia são convocadas e ativadas no CP, estimulando a inflamação e hiperexcitação dos neurônios responsáveis pelo estímulo da dor. Na microglia ativa há expressão do receptor CB2 (ZHANG et al., 2003), cuja ativação por agonistas leva à restauração da célula à sua função fisiológica (figura 5). Desta maneira, o agonista de CB2R atua diretamente na diminuição do processo inflamatório presente na DN. Adicionalmente, o uso de agonistas de CB2R aparenta ausência de efeitos psicotrópicos indesejados (BIE et al., 2018).

Figura 5 - CB2R é expresso em células da microglia na dor neuropática. (A) Na microglia saudável, não há CB2R. (B) A expressão de CB2R é vista na microglia ativa. (C) Tratamento com o agonista CB2 MDA7 restaurou a microglia à sua função normal.

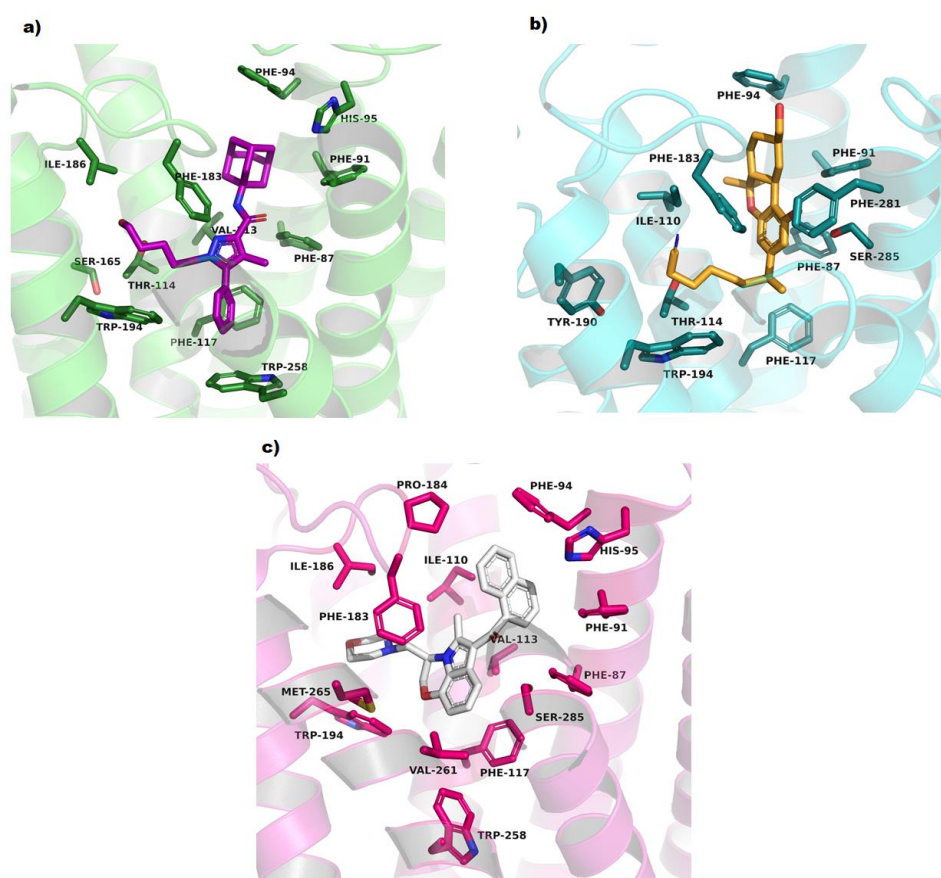


Fonte: (BIE et al., 2018).

1.3.2. Sítio Ativo do Receptor Canabinóide 2

Até o momento, foram encontradas 4 estruturas cristalografadas do CB2R no *Protein Data Bank* (PDB). A primeira publicação (PDB: 5ZTY) (LI et al., 2019) demonstra somente o receptor, acoplado ao antagonista AM10257. Em seguida, foram reveladas estruturas com o agonista AM12033 (PDB: 6KPC e PDB: 6KPF) (HUA et al., 2020) e com o agonista WIN 55,212-2 (PDB: 6PT0) (XING et al., 2020). Estes estudos elucidaram que as interações ligante-receptor no sítio ortostérico do CB2R são, principalmente, hidrofóbicas e aromáticas. Na figura 6 é possível verificar os resíduos descritos que interagem com o ligante em cada publicação.

Figura 6 - (A) Resíduos de aminoácidos que interagem com cada ligante nas cristalografias disponíveis do receptor CB2. Em verde, receptor CB2 (PDB: 5ZTY) e roxo o antagonista AM10257. (B) Em ciano, receptor CB2 (PDB: 6KPF) e laranja o agonista AM12033. (C) Em magenta, receptor CB2 (PDB: 6PT0) e branco o agonista WIN 55,212-2. A cristalografia com PDB: 6KPC não foi aqui mostrada, pois como foi publicada junto com a cristalografia PDB: 6KPF, sua descrição de sítio ativo é igual.



Fonte: Figura do autor.

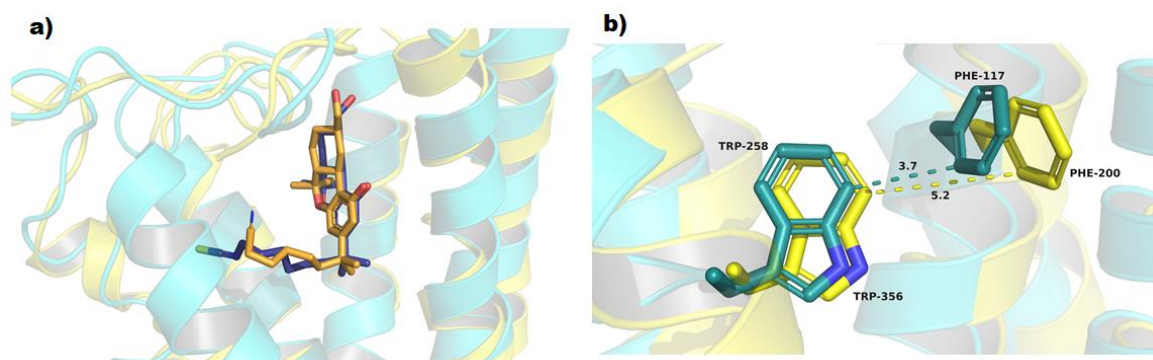
1.3.3. Seletividade entre os Receptores Canabinóides 1 e 2

Apesar de haver clara evidência da existência de agonistas altamente seletivos de CB1 e CB2 (AN et al., 2020), encontrar moléculas que tenham ação em só um dos receptores se mostra um grande desafio, posto que os sítios ortostéricos de ambos os receptores são extremamente semelhantes, podendo-se sobrepor a posição dos agonistas (AN et al., 2020; HUA et al., 2020) (figura 7). Por outro lado, o sítio dos antagonistas é bastante distinto entre os receptores, o que explica a alta seletividade dos antagonistas (HUA et al., 2020; XING et al., 2020).

Acredita-se que a chave para a seletividade de agonistas está nos *toggle switches*, que são resíduo essenciais para a ativação do receptor, e podem ser observados na figura 7. O CB1R possui *twin toggle switches*, os resíduos F200 e W356 (equivalentes a F117 e W258 em CB2, respectivamente), que passam por mudanças de conformação sinergicamente. Já o CB2R tem somente um *toggle switch*, W258, que inicia a ativação do receptor (AN et al., 2020) (HUA et al., 2020) (XING et al., 2020).

Figura 7 - Comparação dos receptores CB1 e CB2. Em amarelo, receptor CB1 (PDB: 6KPG) e azul o agonista AM841. Em ciano, receptor CB2 (PDB: 6KPF) e laranja o agonista AM12033.

(A) Pode-se observar a posição sobreposta dos agonistas de CB1 e CB2. (B) Análise da mudança conformacional dos “*twin toggle switches*,” onde, em CB1, eles estão mais distantes.

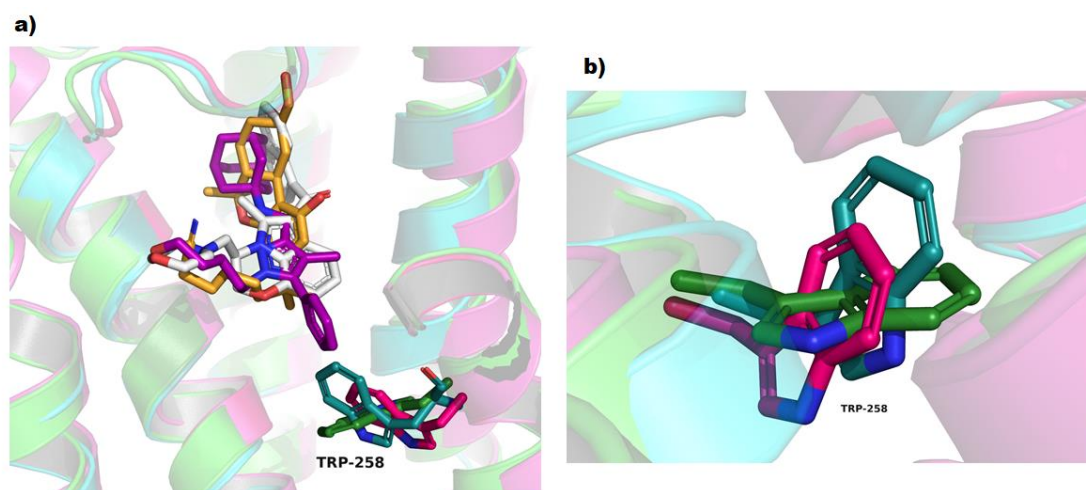


Fonte: Figura do autor.

1.3.4. Seletividade entre agonistas e antagonistas do Receptor Canabinoide 2

O sítio ortostérico ocupado por agonistas e antagonistas de CB2 são semelhantes, porém, sua seletividade é mais bem elucidada, sendo o principal fator responsável o resíduo *toggle switch* W258. Na figura 8 pode-se observar que no receptor acoplado ao antagonista AM12033, a cadeia lateral do resíduo apresenta uma grande mudança conformacional. Isto ocorre porque o antagonista se insere mais profundamente no sítio, assim, ele interage e altera a posição de W258 (LI et al., 2019) (HUA et al., 2020) (XING et al., 2020).

Figura 8 - Em verde, receptor CB2 (PDB: 5ZTY) e roxo o antagonista AM10257. Em ciano, receptor CB2 (PDB: 6KPF) e laranja o agonista AM12033. Em magenta, receptor CB2 (PDB: 6PT0) e branco o agonista WIN 55,212-2. (A) É possível observar a semelhante posição adotada por todos os ligantes co-cristalizados, além do ponto em que o antagonista se insere mais profundamente no sítio. (B) Análise da mudança conformacional apresentada pelo “*toggle switch*” W258.



Fonte: Figura do autor.

1.4. Química Computacional

A química computacional é a aplicação de métodos informáticos para resolução de problemas químicos (GASTEIGER, 2006). Ela auxilia na busca de moléculas bioativas e/ou no entendimento do seu mecanismo de ação ao simular situações, utilizando recursos matemáticos, de mecânica clássica e quântica e química teórica (GASTEIGER, 2006; OLSSON; OPREA, 2001).

1.4.1. Estratégias computacionais usadas no planejamento de fármacos

As duas principais estratégias planejamento de fármacos auxiliado por computador (do inglês *Computer-Assisted Drug Design* – CADD) são Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (SBDD – *Structure-Based Drug Design*) e Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Ligante (LBDD - *Ligand- Based Drug Design*). O LBDD não necessita de conhecimento da estrutura tridimensional da proteína alvo, posto que utiliza das propriedades e características de um conjunto de compostos bioativos. Já a estratégia de SBDD necessita do conhecimento detalhado do alvo biológico, sendo necessária sua estrutura tridimensional através da cristalografia por raio-X, ressonância magnética nuclear e/ou modelagem por homologia (ENGEL; GASTEIGER, 2018).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo realizar uma triagem virtual por técnica de docagem molecular à procura de possíveis agonistas do CB2R para tratamento da DN.

2.1. Objetivos Específicos

- Validação do método de docagem molecular;
- Aplicação da docagem molecular na triagem virtual;
- Seleção de ligantes com capacidade de atuação no receptor CB2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os estudos de CADD foram realizados em estações computacionais disponíveis no Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais no Planejamento de Fármacos (LITEC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímica – Universidade de São Paulo.

3.1. Seleção da Estrutura 3D do Receptor

Para a seleção da proteína, foi utilizado o *Protein Data Bank* (PDB) e foi escolhida a estrutura de código PDB: 6KPF para realização do estudo.

3.2. Preparamento do Banco de Dados

O banco de dados utilizado foi disponibilizado pelo Dr. Rodolpho Braga da *InSilicall*, com um total de 3968 moléculas já aprovadas por agências regulatórias ao redor do mundo, servindo como banco de reposicionamento de moléculas. Para realização dos estudos se fez necessária a conversão do formato SMILES para MOLFile e adição de átomos de hidrogênio foi utilizada a plataforma CACTUS, disponível em: <https://cactus.nci.nih.gov/translate/>. Com intuito de catalogar as moléculas, estas foram numeradas de 1 a 3698 de acordo com a ordem do banco de dados.

3.3. Docagem Molecular e Triagem virtual

A docagem e *redocking* foi realizada nos programas GOLD 2020.3.0® (JONES et al., 1997) e DockThor 2.0® (GUEDES et al., 2021) (disponível em <https://dockthor.Incc.br/v2/>). Para validação da metodologia, foi realizado o *redocking* do agonista AM12033. Todos os procedimentos utilizaram caixas de 10 Angstroms (Å), cujo centro utilizado foi o carbono C6 ligante (X = 110,465, Y = 108,877 e Z = 125,157). No programa GOLD 2020.3.0®, o receptor foi protonado e seu ligante extraído no próprio programa. Foi selecionado o algoritmo genético lento, com eficiência de 100% e a função de avaliação chemscorePLP.

O DockThor 2.0®, por ser uma plataforma online somente aceita triagem virtual de 200 moléculas para usuários independentes, então o banco de dados foi dividido em 20 partes, que foram docadas separadamente. Para as análises, foram utilizadas as configurações padrões da plataforma e, algumas modificações foram realizadas automaticamente, como por exemplo, adição das cargas e hidrogênios necessários.

Após validação da metodologia de docagem nos dois programas, a triagem virtual foi realizada em cada um deles, utilizando os compostos do banco de dados previamente preparado.

3.4. Análise dos Resultados

Para a análise dos resultados foram selecionadas as 100 melhores moléculas de cada plataforma. As moléculas presentes em ambas as seleções foram, então, separadas e passaram por uma análise visual.

A avaliação das poses e da complementaridade entre os ligantes e o receptor foi realizada no programa PYMOL® (Schrodinger, LLC. 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Programas e Proteína Utilizados

A estrutura do receptor CB2 utilizada foi a PDB: 6KPF. Essa estrutura foi escolhida por estar co-cristalizada com a um agonista (AM12033), por ter melhor resolução (2,90 Å) e não apresentar mutações. O programa PYMOL® foi escolhido devido à sua disponibilidade de licença e ser de fácil utilização. Para a conversão dos formatos, a plataforma CACTUS foi selecionada devido ao seu fácil uso online e qualidade de conversão, posto que ela usa o programa CORINA.

Para obter maior confiabilidade nos dados obtidos e seleção das moléculas como maior chance de sucesso foram utilizados dois programas de docagem, buscando, assim, um consenso nos resultados.

O DockThor 2.0® é um programa que utiliza um algoritmo baseado em grade, que permite docagem de ligantes flexíveis em receptores rígidos. Ele utiliza algoritmo genético de múltiplas soluções e sua função de avaliação, DockTScore, implementa o campo de força MMFF94S (Redocking study of HIV-1 protease in complex with amprenavir, 2020). Ele foi selecionado por ser uma plataforma de alta qualidade (SANTOS et al., 2020), fácil utilização, grátis, e cujos cálculos são realizados no super-computador Santos Dummond, localizado em **Petrópolis**, RJ.

O GOLD 2020.3.0® utiliza método estocástico com algoritmo genético para docagem de ligantes flexíveis em sítios ativos de proteínas. Também é um programa de alta qualidade e fácil utilização e sua licença é disponibilizada pela

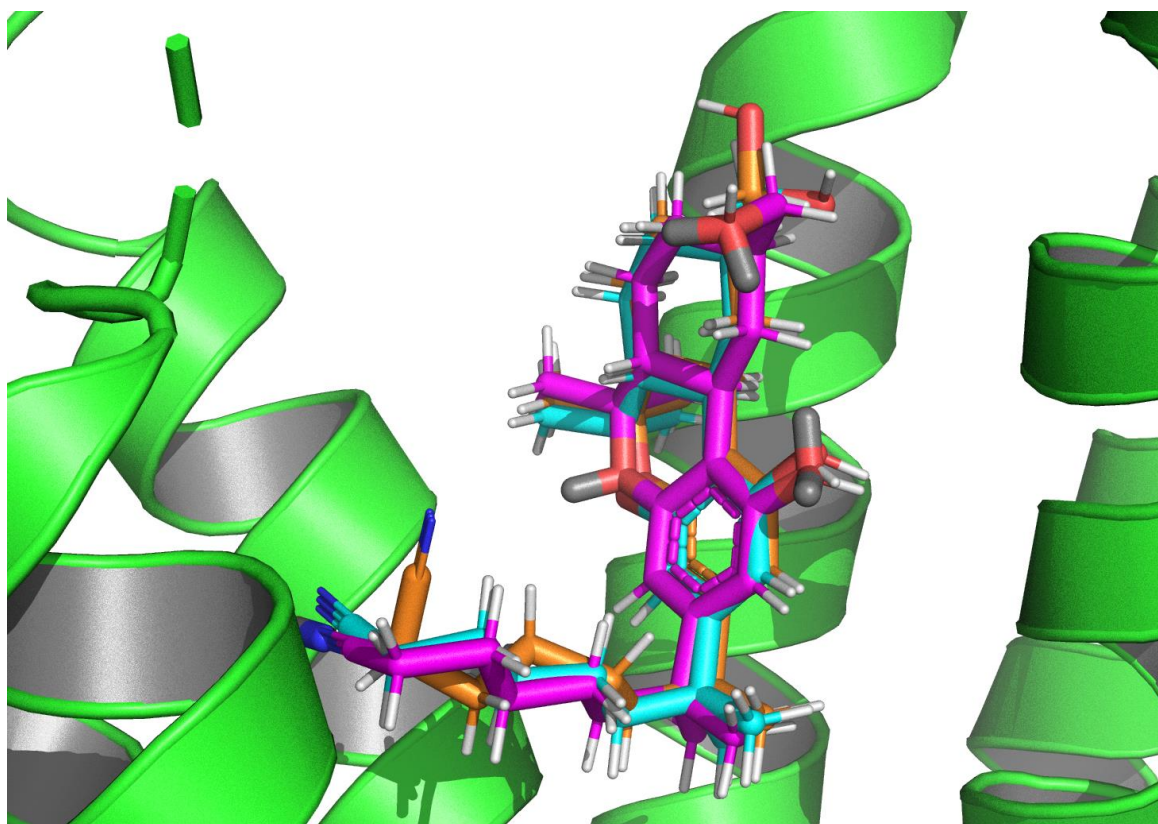
USP. A função de avaliação empírica chemPLP foi escolhida por ser a recomendada para uso geral (GOLD scoring function performance against the DUD decoy/active set, 2011).

4.2. Redocking

O experimento de redocking é essencial para avaliar a qualidade do modelo utilizado, em que o mesmo ligante que foi co-cristalizado com a proteína é docado. A pose do resultado, então, é comparada com a pose do ligante na cristalografia, por meio do cálculo do *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD), então, o modelo é validado se este valor for menor que 2.

No programa GOLD 2020.3.0®, o redocking realizado obteve um RMSD de 1,057 e score de 102,59. Já no DockThor 2.0® o RMSD obtido foi 0,897 e score de -12,617. Ambos os resultados podem ser observados na figura 9 e confirmam a qualidade do modelo utilizado.

Figura 9 - Posições do ligante cristalografado (laranja), redocagem realizada no GOLD 2020.3.0®(magenta) e redocagem executada no DockThor 2.0® (ciano).



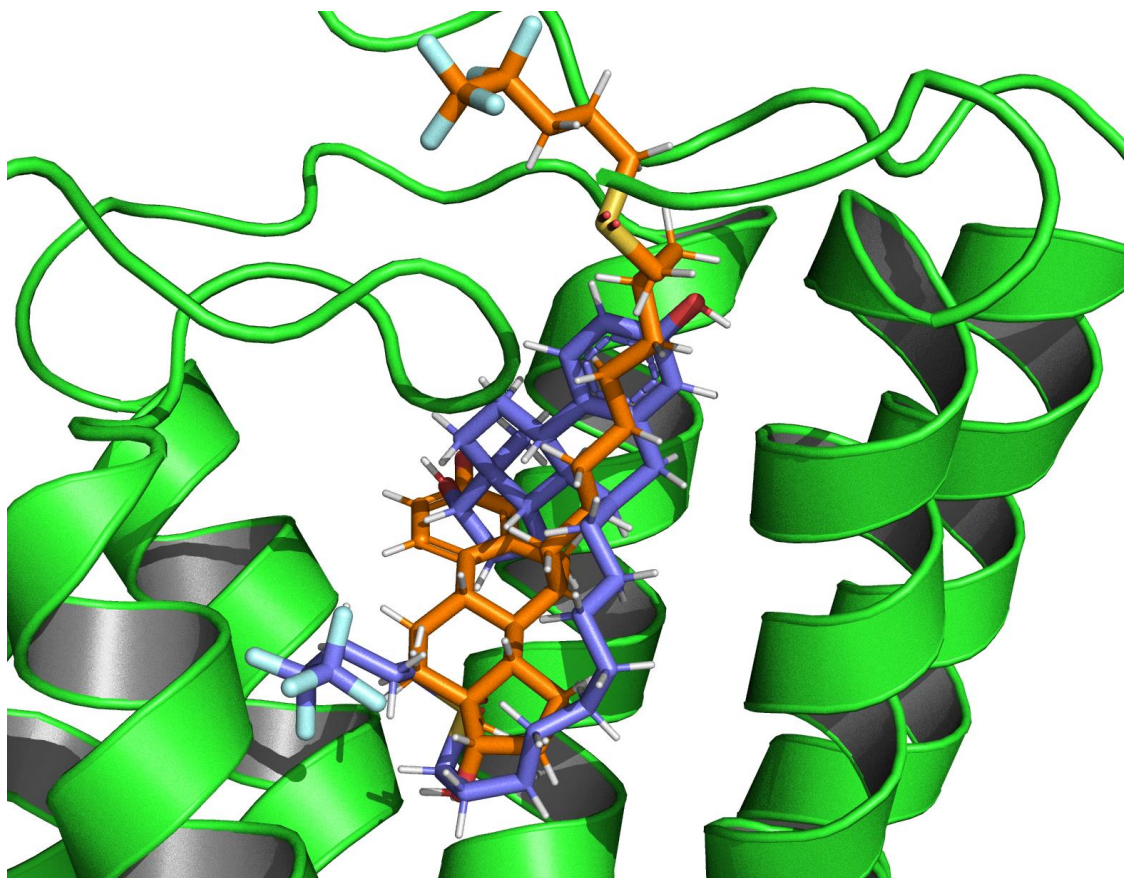
Fonte: Figura do autor.

4.3. Triagem Virtual

A utilização de dois programas para a docagem molecular foi realizada com a finalidade de empregar algoritmos diferentes e avaliar se há consenso entre eles, reduzindo a possibilidade de resultados falsos positivos. Com intuito de evitar estes resultados, foi realizado *cutoff* com as 100 moléculas melhor ranqueadas, uma vez que o banco de dados possui uma amostragem ampla de 3968 moléculas.

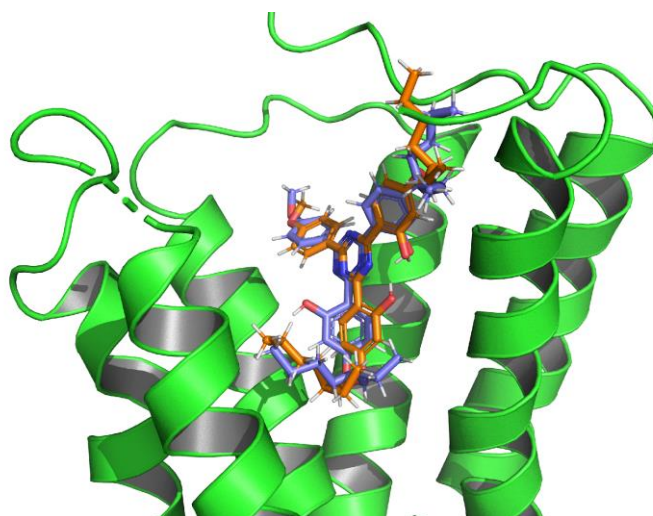
As 22 moléculas em que houve assentimento nos resultados entre o GOLD 2020.3.0® e DockThor 2.0® passaram pela análise visual, em que foi avaliado se havia consenso de pose entre os dois programas. As moléculas cujas posições mostraram-se excessivamente diferentes foram descartadas, como exemplificado na figura 10. Complementarmente, foi analisado se os compostos inseriam-se excessivamente no receptor na região próxima ao resíduo W258, o que os concederiam atividade antagonista, no entanto, nenhuma molécula foi descartada por tal motivo. Ao final desta análise, 11 moléculas foram selecionadas (figuras 11-21 e Anexo I) e a de número 2609 (figura 11) obteve o resultado mais promissor, posto que ela obteve o melhor score no GOLD 2020.3.0® e o sétimo melhor no DockThor 2.0®.

Figura 10 - Posições da molécula de número 1124 como exemplo de resultados cujas posições entre os programas utilizados ficaram excessivamente diferentes. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



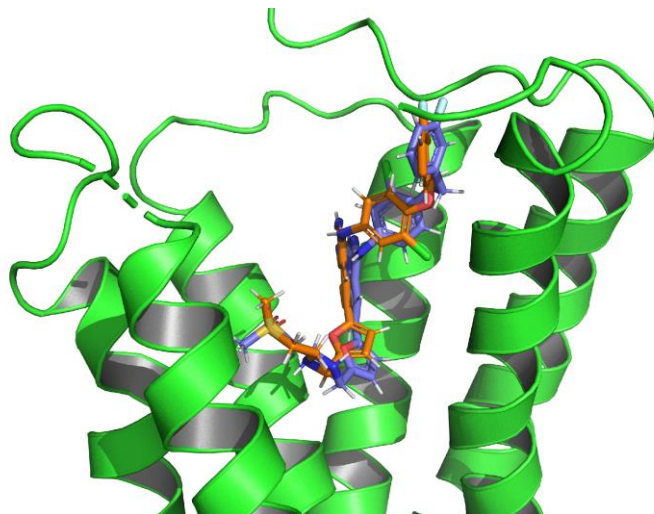
Fonte: Figura do autor.

Figura 11 - Posições do melhor resultado da molécula número 2609. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



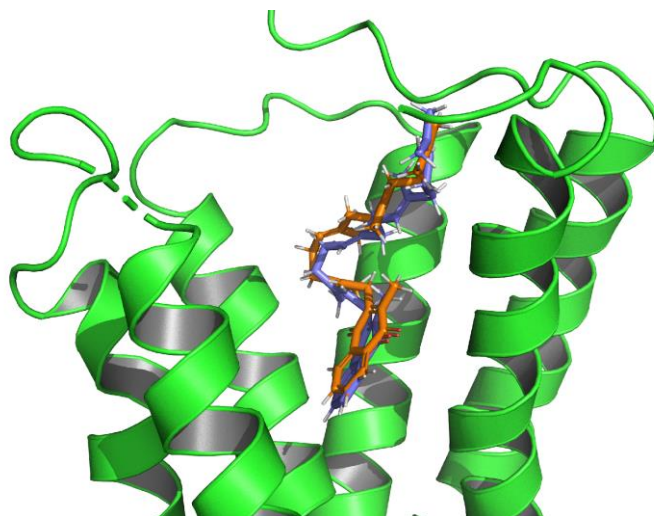
Fonte: Figura do autor.

Figura 12 - Posições do melhor resultado da molécula número 1366. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



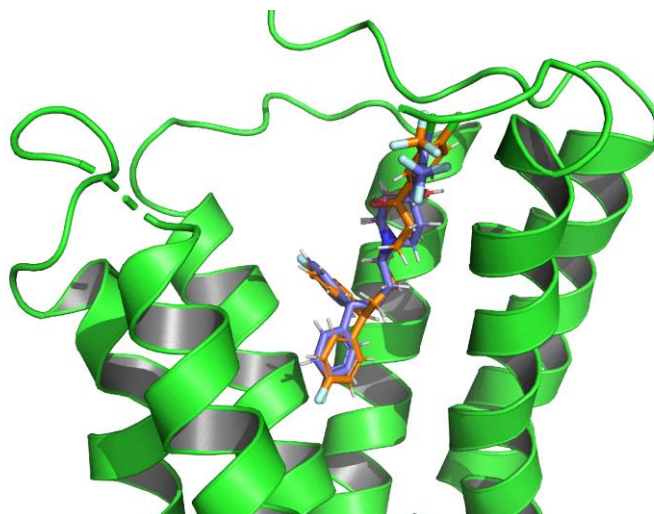
Fonte: Figura do autor.

Figura 13 - Posições do melhor resultado da molécula número 1488. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



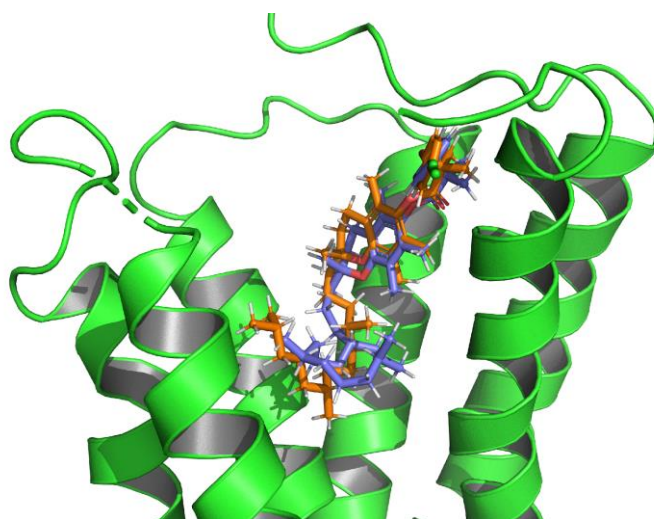
Fonte: Figura do autor.

Figura 14 - Posições do melhor resultado da molécula número 1864. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



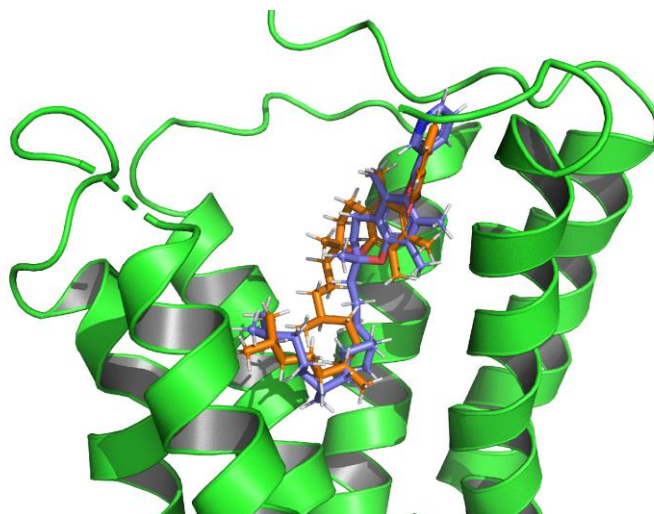
Fonte: Figura do autor.

Figura 15 - Posições do melhor resultado da molécula número 2415. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



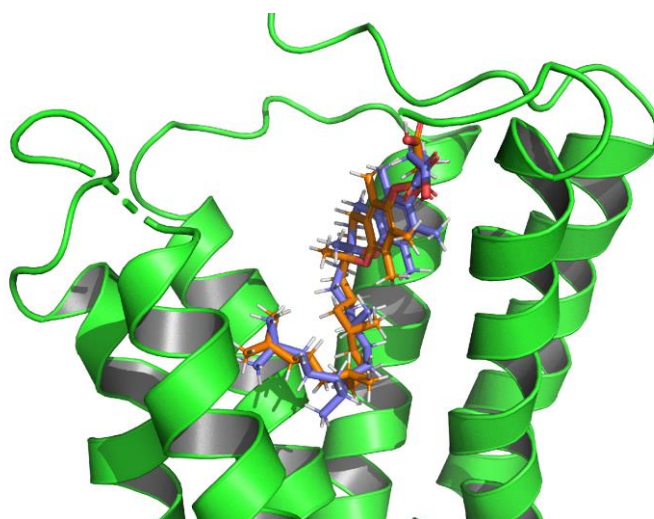
Fonte: Figura do autor.

Figura 16 - Posições do melhor resultado da molécula número 2416. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



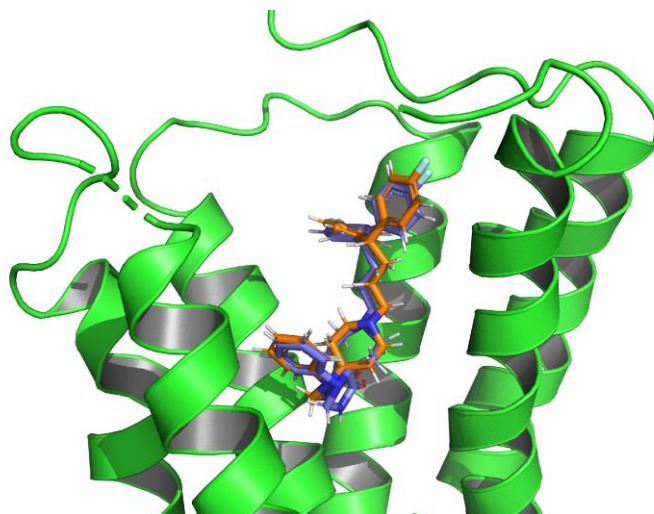
Fonte: Figura do autor.

Figura 17 - Posições do melhor resultado da molécula número 2417. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



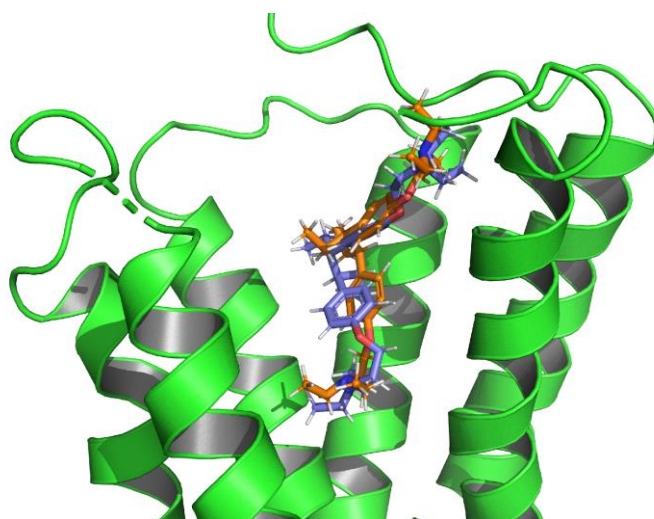
Fonte: Figura do autor.

Figura 18 - Posições do melhor resultado da molécula número 1094. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



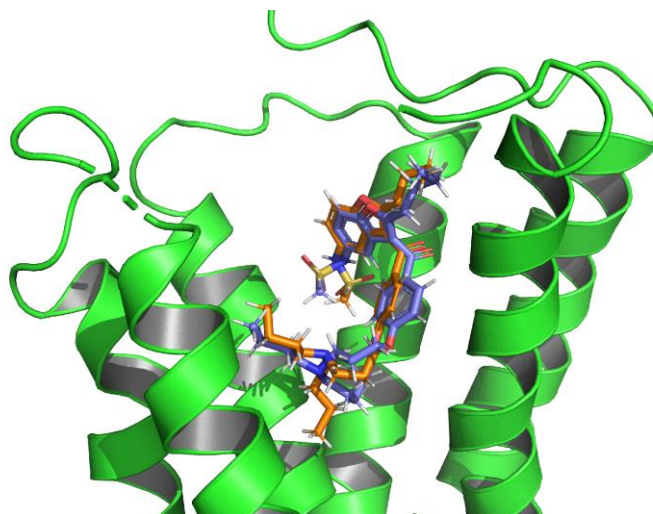
Fonte: Figura do autor.

Figura 19 - Posições do melhor resultado da molécula número 2821. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



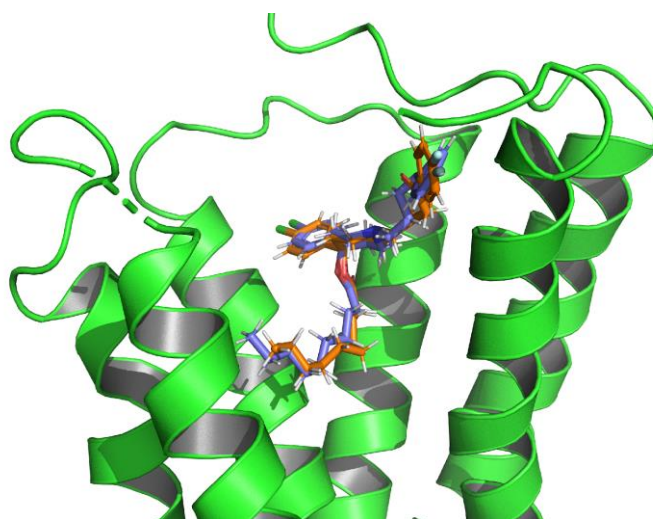
Fonte: Figura do autor.

Figura 20 - Posições do melhor resultado da molécula número 3343. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



Fonte: Figura do autor.

Figura 21 - Posições do melhor resultado da molécula número 3580. Em laranja, o resultado do GOLD 2020.3.0® e em azul, o resultado do DockThor 2.0®.



Fonte: Figura do autor.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho se fundamentou em técnicas de planejamento de fármaco baseado na estrutura do receptor. Realizou-se uma triagem virtual por docagem molecular na qual foram encontrados 11 candidatos promissores a agonistas do Receptor Canabinoide 2. O uso de dois programas diferentes para realização da triagem, DockThor 2.0® e GOLD 2020.3.0®, mostrou-se eficiente, posto que

houve consenso entre as plataformas em 11 candidatos. Portanto, estas moléculas estão aptas a seguirem na próxima etapa na busca de agonistas, o teste *in vitro*.

6. BIBLIOGRAFIA

- AN, D. et al. Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, 17 jul. 2020.
- BARON, R. Neuropathic Pain: A Clinical Perspective. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 194, p. 3–30, 2009.
- BENITO, C. et al. Cannabinoid CB2 Receptors and Fatty Acid Amide Hydrolase Are Selectively Overexpressed in Neuritic Plaque-Associated Glia in Alzheimer's Disease Brains. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 35, p. 11136–11141, 3 dez. 2003.
- BENITO, C. et al. A Glial Endogenous Cannabinoid System Is Upregulated in the Brains of Macaques with Simian Immunodeficiency Virus-Induced Encephalitis. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2530–2536, 9 mar. 2005.
- BIE, B. et al. An Overview of the Cannabinoid Type 2 Receptor System and Its Therapeutic Potential. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 31, n. 4, p. 407–414, ago. 2018.
- BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380–387, jun. 2008.
- CABAÑERO, D. et al. Protective Role of Neuronal and Lymphoid Cannabinoid CB2 Receptors in Neuropathic Pain. **eLife**, v. 9, p. e55582, 20 jul. 2020.
- CAVALLI, E. et al. The Neuropathic Pain: An Overview of the Current Treatment and Future Therapeutic Approaches. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 33, p. 2058738419838383, 2019 Jan-Dec2019 Jan-Dec.
- Ccdc.cam.ac.uk. 2011. GOLD scoring function performance against the DUD decoy/active set. [online] Disponível em: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/ccdcresources/VS_workcase.pdf> (accessed 10 June 2021).
- CHUNG, Y. C. et al. CB2 Receptor Activation Prevents Glial-Derived Neurotoxic Mediator Production, BBB Leakage and Peripheral Immune Cell Infiltration and Rescues Dopamine Neurons in the MPTP Model of Parkinson's Disease. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 1, p. e205, 22 jan. 2016.
- COLLOCA, L. et al. Neuropathic Pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 16 fev. 2017.
- DE MORAES VIEIRA, E. B. et al. Prevalence, Characteristics, and Factors Associated with Chronic Pain with and without Neuropathic Characteristics in São Luís, Brazil. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 44, n. 2, p. 239–251, ago. 2012.
- Dockthor.Incc.br. 2020. Redocking study of HIV-1 protease in complex with amprenavir. [online] Disponível em: <https://www.dockthor.Incc.br/v2/tutorials/Tutorial1_1HPV.pdf> (acessado em 10 June 2021).
- EHRHART, J. et al. Stimulation of Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Suppresses Microglial Activation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 2, p. 29, 12 dez. 2005.

ENGEL, T.; GASTEIGER, J. **Applied Chemoinformatics: Achievements and Future Opportunities**. Weinheim: Wiley-VCH, 2018.

FOSTER, D. J. et al. Antipsychotic-like Effects of M4 Positive Allosteric Modulators Are Mediated by CB2 Receptor-Dependent Inhibition of Dopamine Release. **Neuron**, v. 91, n. 6, p. 1244–1252, 21 set. 2016.

GADO, F. et al. Identification of the First Synthetic Allosteric Modulator of the CB2 Receptors and Evidence of Its Efficacy for Neuropathic Pain Relief. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 276–287, 10 jan. 2019.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1 abr. 1964.

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: A New Field with a Long Tradition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 1, p. 57–64, jan. 2006.

GILMORE, S. A. Proliferation of Non-Neuronal Cells in Spinal Cords of Irradiated, Immature Rats Following Transection of the Sciatic Nerve. **The Anatomical Record**, v. 181, n. 4, p. 799–811, abr. 1975.

GILMORE, S. A.; SKINNER, R. D. Intraspinal Non-Neuronal Cellular Responses to Peripheral Nerve Injury. **The Anatomical Record**, v. 194, n. 3, p. 369–387, jul. 1979.

GUEDES, I. A. et al. New Machine Learning and Physics-Based Scoring Functions for Drug Discovery. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3198, 4 fev. 2021.

HANSEN, D. V.; HANSON, J. E.; SHENG, M. Microglia in Alzheimer's Disease. **The Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 2, p. 459–472, 5 fev. 2018.

HUA, T. et al. Activation and Signaling Mechanism Revealed by Cannabinoid Receptor-Gi Complex Structures. **Cell**, v. 180, n. 4, p. 655–665.e18, 20 fev. 2020.

IBRAHIM, M. M. et al. Activation of CB2 Cannabinoid Receptors by AM1241 Inhibits Experimental Neuropathic Pain: Pain Inhibition by Receptors Not Present in the CNS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10529–10533, 2 set. 2003.

IBRAHIM, M. M. et al. CB2 Cannabinoid Receptor Activation Produces Antinociception by Stimulating Peripheral Release of Endogenous Opioids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 8, p. 3093–3098, 22 fev. 2005.

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia in Neuropathic Pain: Cellular and Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 138–152, mar. 2018.

JENSEN, T. S. et al. A New Definition of Neuropathic Pain. **PAIN**, v. 152, n. 10, p. 2204–2205, out. 2011.

JONES, G. et al. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible docking¹¹ Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 4 abr. 1997.

JORDAN, C. J.; XI, Z.-X. Progress in Brain Cannabinoid CB2 Receptor Research: From Genes to Behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 98, p. 208–220, 1 mar. 2019.

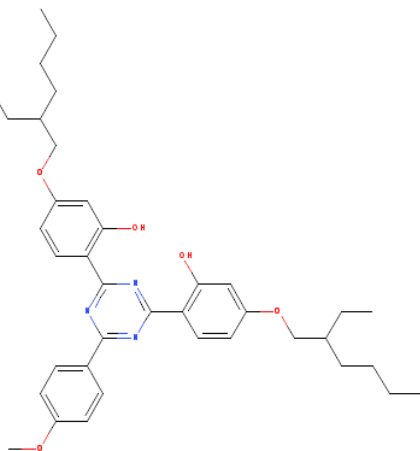
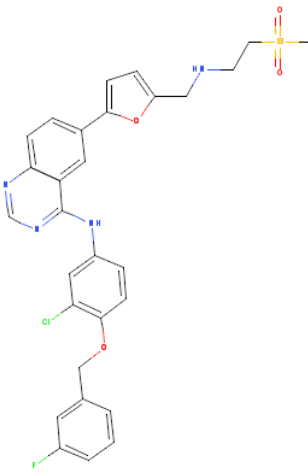
LI, X. et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2. **Cell**, v. 176, n. 3, p. 459–467.e13, 24 jan. 2019.

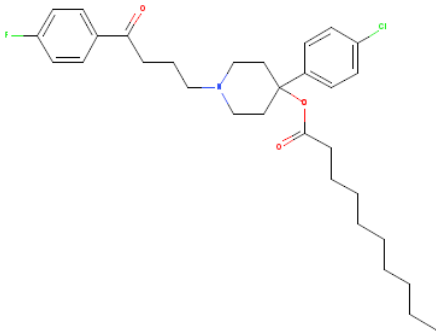
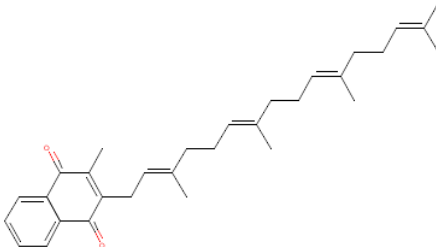
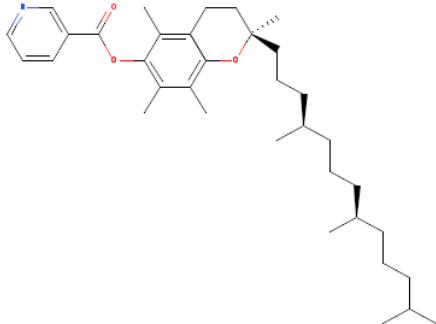
- LU, D.; POTTER, D. E. Chapter 58 - Cannabinoids and the Cannabinoid Receptors: An Overview. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**. San Diego: Academic Press, 2017. p. 553–563.
- MATSUDA, L. A. et al. Structure of a Cannabinoid Receptor and Functional Expression of the Cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 9 ago. 1990.
- MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, 6441, p. 61–65, set. 1993.
- NAGUIB, M. et al. Prevention of Paclitaxel-Induced Neuropathy through Activation of the Central Cannabinoid Type 2 Receptor System. **Anesthesia and Analgesia**, v. 114, n. 5, p. 1104–1120, maio 2012.
- OLSSON, T.; OPREA, T. I. Cheminformatics: A Tool for Decision-Makers in Drug Discovery. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 4, n. 3, p. 308–313, maio 2001.
- ÖZDAĞ ACARLI, A. N. et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From the Point of View of Neurologists: Observation of Neurological Findings and Symptoms During the Combat Against a Pandemic. **Archives of Neuropsychiatry**, v. 57, n. 2, p. 154–159, 1 maio 2020.
- PETERS, H.; NAHAS, G. G. A Brief History of Four Millennia (B.C. 2000—A.D. 1974). In: NAHAS, G. G. et al. (Eds.). **Marihuana and Medicine**. Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 3–7.
- POSSO, I. DE P. et al. Epidemiology of Neuropathic Pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 11–14, 2016.
- ROMERO-SANDOVAL, A.; EISENACH, J. C. Spinal Cannabinoid Receptor Type 2 Activation Reduces Hypersensitivity and Spinal Cord Glial Activation after Paw Incision. **Anesthesiology**, v. 106, n. 4, p. 787–794, 1 abr. 2007.
- SELVARAJAH, D.; GANDHI, R.; TESFAYE, S. Chapter 94 - Cannabinoids and Their Effects on Painful Neuropathy. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**. San Diego: Academic Press, 2017. p. 905–916.
- SHAHBAZI, F. et al. Cannabinoids and Cannabinoid Receptors: The Story so Far. **iScience**, v. 23, n. 7, p. 101301, 24 jul. 2020.
- STEMPEL, A. V. et al. Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 795–809, 18 maio 2016.
- TORRANCE, N. et al. The Epidemiology of Chronic Pain of Predominantly Neuropathic Origin. Results from a General Population Survey. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 4, p. 281–289, abr. 2006.
- WU, J. et al. Activation of CB2 Receptor System Restores Cognitive Capacity and Hippocampal Sox2 Expression in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 811, p. 12–20, 15 set. 2017.
- XING, C. et al. Cryo-EM Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2-Gi Signaling Complex. **Cell**, v. 180, n. 4, p. 645–654.e13, fev. 2020.
- YAMAMOTO, W.; MIKAMI, T.; IWAMURA, H. Involvement of Central Cannabinoid CB2 Receptor in Reducing Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 1, p. 56–61, 31 mar. 2008.

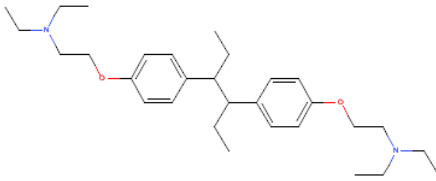
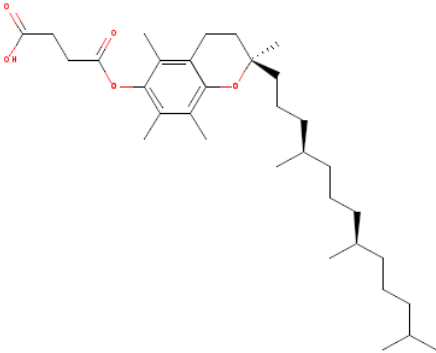
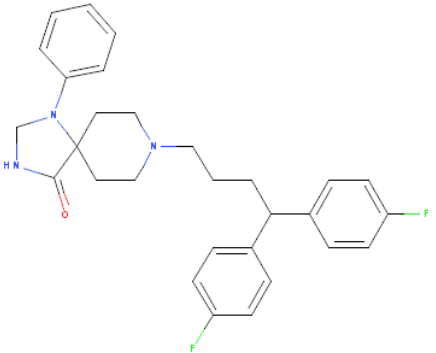
- YAO, B.; MACKIE, K. Endocannabinoid Receptor Pharmacology. In: KENDALL, D.; ALEXANDER, S. (Eds.). **Behavioral Neurobiology of the Endocannabinoid System**. Current Topics em Behavioral Neurosciences. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. p. 37–63.
- YE, L. et al. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. **Current Molecular Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 239–248, ago. 2019.
- ZHANG, J. et al. Induction of CB2 Receptor Expression in the Rat Spinal Cord of Neuropathic but Not Inflammatory Chronic Pain Models. **The European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 2750–2754, jun. 2003.

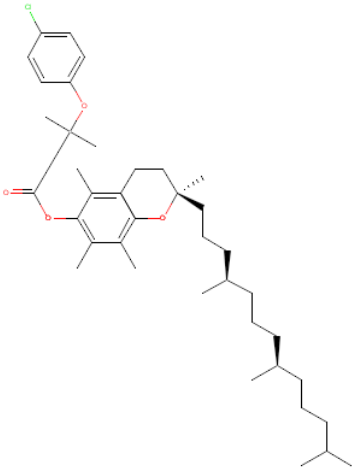
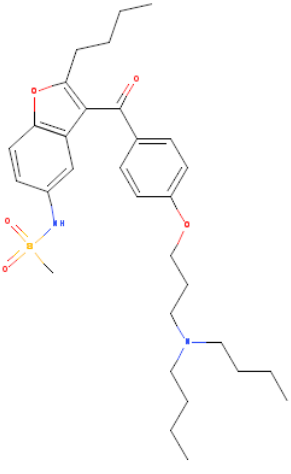
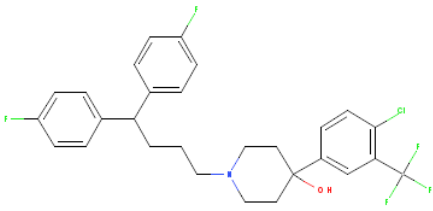
7. ANEXO

Anexo I – Tabela I com resultados com consenso entre os programas.

Molécula	Nº da Molécula	Score GOLD	Score DockThor	Posição GOLD	Posição DockThor
	2609	133,02	-13,967	1º	7º
	1366	112,60	-12,851	9º	71º

	3580	109,40	-13,076	15 °	50 °
	1488	108,49	-12,820	16 °	76 °
	2416	106,97	-13,553	21 °	23 °

 <chem>CCN(CC)CCOC1=CC=C(C(C)C)C=C1C(C)C2=CC=C(OC3CCN(CC)CC3)C=C2</chem>	2821	106,15	-12,847	24 °	73 °
 <chem>CC(C)CC[C@H](C)CC[C@H](C)C[C@@H]1CCOC1C2=C(C)C(OC(=O)CC(=O)O)C=C2C</chem>	2417	106,15	-13,285	29 °	34 °
 <chem>FC1=CC=C(C=C1)C(C)C2=CC=C(F)C=C2N3CCN(C3)C(=O)N4C(=O)N(C5=CC=CC=C5)C4</chem>	1094	102,89	-12,689	36 °	88 °

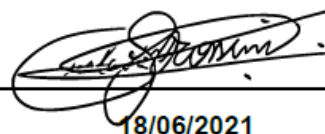
	2415	100,15	-13,764	57 °	13 °
	3343	99,98	-13,197	59 °	40 °
	1864	97,37	-12,827	96 °	74 °

Fonte: (SOARES, 2021).

Artur C.

18/06/2021

Data e assinatura do aluno(a)



18/06/2021

Data e assinatura do orientador(a)