

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

**BUSCA DE NOVOS AGONISTAS CB2 POR MEIO DA**  
**APLICAÇÃO DE FILTRO FARMACOFÓRICO**

Gianfrancesco Geraldini Antonangeli

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart  
Trossini

São Paulo

2021



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Dor neuropática</b>	<b>5</b>
1.1.1 Sistema somatossensorial e definição de dor neuropática	5
1.1.2 Epidemiologia	6
<b>1.2 Receptores Canabinoides</b>	<b>6</b>
1.2.1 Estrutura, distribuição e mecanismo dos Receptores CB1 e CB2	7
<b>1.3 Receptor CB2 e a dor neuropática</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Planejamento de fármacos</b>	<b>8</b>
1.4.1 Farmacóforo	9
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Objetivos específicos</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Ferramentas computacionais</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Seleção da estrutura 3D</b>	<b>10</b>
<b>3.3 Banco de dados</b>	<b>10</b>
<b>3.4 Campos de Interação Molecular (MIFs)</b>	<b>11</b>
<b>3.5 Modelagem do Farmacóforo</b>	<b>11</b>
<b>3.6 Triagem Virtual (VS)</b>	<b>11</b>
<b>3.7 Dockagem dos resultados</b>	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Cavidade</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Farmacóforo</b>	<b>12</b>
<b>4.3 Triagem Virtual (VS)</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Docking</b>	<b>15</b>
4.4.1 Redockagem	15
4.4.2 Dockagem	16
<b>4.5 Análise dos resultados</b>	<b>18</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>18</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>19</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>22</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<i>CADD</i>	<i>Computer-Assisted Drug Design</i>
CB1	Receptor Canabinoide 1
CB2	Receptor Canabinoide 2
<i>IUPAC</i>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LEC	Loop Extracelular
LIC	Loop Intracelular
LITEC	Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais
<i>MIF(s)</i>	<i>Molecular Interaction Fields</i>
<i>RMSD</i>	<i>Root mean-square deviation</i>
<i>SBDD</i>	<i>Structure Based Drug Design</i>
SNC	Sistema nervoso central
TM	Transmembrânicas
VS	<i>Virtual Screening</i>

## RESUMO

ANTONANGELI, G. A. **Busca de novos agonistas CB2 por meio da aplicação de filtro farmacofórico.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Palavras-chave: Farmacóforo, Triagem Virtual (VS), Campos de Interação Molecular (MIFs), Receptor Canabinoide 2 (CB2), Dor Neuropática.

**INTRODUÇÃO:** A dor neuropática é uma patologia de difícil diagnóstico e tratamento, podendo muitas vezes ser decorrente de outras doenças como HIV, diabetes, herpes-zóster, lepra, derrame, injúria em nervos periféricos, entre outras. Atualmente, maioritariamente, é tratada com medicamentos utilizados para epilepsia e anestésicos, e sua farmacoterapia possui diversos limitantes. Os receptores canabinoides 2 (CB2) são amplamente expressos no sistema nervoso central (SNC) nas células da glia reativas em situações inflamatórias e diversos estudos indicam que a ativação desses receptores tendem a limitar e, possivelmente, reverter o processo inflamatório dessas regiões e, portanto, tratar a dor neuropática.

**OBJETIVOS:** Este trabalho tem como objetivo realizar uma triagem virtual (VS) de um banco de dados composto na busca de um agonista para o receptor CB2, pela aplicação de filtro farmacofórico e ancoragem molecular.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** No estudo e modelagem do farmacóforo foi utilizado a plataforma CavityPlus<sup>®</sup> e, dentro desta, o programa CavityPharm, para determinação dos Campos de interação molecular (MIFs). Em seguida, foi empregado o programa UNITY<sup>®</sup>, implementado no pacote computacional SYBYL 2.1<sup>®</sup> para a realização da VS em um banco de dados com 3968 moléculas já aprovadas por agências de regulatórias internacionais. Os resultados, então, foram submetidos à ancoragem molecular (docking) para a obtenção de dados, tanto de sua pose da molécula em relação ao receptor CB2, quanto de sua pontuação (score) de ligação.

**RESULTADOS:** Foram obtidas 8 moléculas oriundas da VS, porém após análise de volume e massa molecular, apenas 3 se mostraram potenciais moléculas bioativas.

**CONCLUSÃO:** A triagem virtual realizada com o filtro farmacofórico se mostrou um método adequado na busca novas moléculas com sugerida atividade em CB2. Assim, a partir dos resultados deste trabalho é possível dar continuidade a pesquisa realizando testes biológicos das moléculas obtidas, a fim de se avaliar eficácia real das mesmas e assim, seguir o estudo para o desenvolvimento de um medicamento mais eficiente e específico para o tratamento da dor neuropática.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Dor neuropática

#### 1.1.1 Sistema somatossensorial e definição de dor neuropática

A percepção de informações somatossensoriais são essenciais para a vida humana e, apesar de a impressão de toque seja considerada apenas um dos cinco sentidos tradicionais, ela é criada pela interpretação de diversas outras modalidades somatossensoriais, como toque, pressão, vibração, temperatura, dor e estiramento da pele (KLINGNER, 2018). Os nervos responsáveis por esse sistema somatossensorial são percebidos na pele, músculos e juntas e incluem termorreceptores, mecanorreceptores, quimiorreceptores, receptores de prurido e nociceptores, que enviam sinais para a medula espinal (COLLOCA *et al.*, 2017).

A dor neuropática já teve algumas diferentes definições ao longo do tempo, porém a mais recente e mais aceita atualmente é a dor causada por uma lesão ou doença que acomete o sistema somatossensorial (COLLOCA *et al.*, 2017). Algumas das condições mais comumente associadas a dor neuropática incluem a neuralgia pós-herpética, neuralgia do trigêmio, radiculopatia dolorosa, neuropatia diabética, infecção por HIV, lepra, amputação, injúria do nervo periférico e derrame (COLLOCA *et al.*, 2017).

Os sintomas descritos para essa patologia são diversos, dentre eles as sensações de calor, queimação, choques elétricos, picadas de alfinetes ou agulhas, dor evocada por toque leve ou por frio, além de sensações não dolorosas como dormência e formigamento. Mesmo sendo sugestivos esses sintomas, não são sinais determinantes e outros descritores podem ser aplicados no diagnóstico (FINNERUP *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a caracterização clínica da dor neuropática se dá pela presença de sintomas dolorosos, parestesia e sensações não dolorosas, mas geralmente sem déficits sensoriais neurológicos ou motores na área dolorida (BOUHASSIRA, 2018).

### 1.1.2 Epidemiologia

O estudo epidemiológico da dor neuropática é um dos fatores mais negligenciados em relação à pesquisa clínica, sendo muito difícil encontrar informações confiáveis sobre a prevalência e incidência na população em geral (BOUHASSIRA, 2018). Existem, no entanto, bons estudos que podem fornecer estimativas epidemiológicas associadas à algumas condições, como neuralgia pós herpética (prevalência estimada: 8-10%), neuropatia diabética (prevalência estimada: 14-26%), dor neuropática associada à cirurgia (prevalência estimada: 10-50% a depender da cirurgia), esclerose múltipla (prevalência estimada: 20-30%), lesão da medula espinhal (prevalência estimada: 30-40%), acidente vascular cerebral (prevalência estimada: 5-11%) e câncer (prevalência estimada: 17-19%) (BOUHASSIRA, 2018).

Além dessas condições citadas, é sabido que a dor neuropática é mais frequente em pacientes com mais de 60 anos e em pessoas do sexo feminino, sendo indicada como mais intensa que dores não neuropáticas (BOUHASSIRA, 2018).

### 1.2 Receptores Canabinoides

A planta *Cannabis sativa* já é conhecida há muito tempo pelo ser humano, com histórico de substância medicinal e de uso recreativo.

Estudos realizados a partir dessa planta foi possível isolar os compostos ativos e o resultado foi a descoberta de dois receptores acoplados à proteína-G, denominados receptor canabinoide 1 (CB1) e receptor canabinoide 2 (CB2). Além disso, também foram descobertos ligantes endógenos que interagem com esses receptores e que foram denominados endocanabinoides (LU, POTTER, 2017).

Tanto os receptores, CB1 e CB2, quanto os endocanabinoides têm uma participação importante em regulações e modulações em diversas funções fisiológicas, como no sistema endócrino, sistema nervoso, sistema imune, trato gastrointestinal, sistema cardiovascular e sistema reprodutor (LU, POTTER, 2017; HUA, *et al.* 2020).

### 1.2.1 Estrutura, distribuição e mecanismo dos Receptores CB1 e CB2

Os receptores CB1 e CB2 fazem parte da família dos receptores acoplados à proteína-G, caracterizada por possuírem um N-terminal extracelular, 7 alfa hélices transmembrânicas (TM), três loops extracelulares (LEC), três loops intracelulares (LIC) e um C-terminal intracelular, sendo CB1 o maior dentre os dois e possui 72 resíduos de aminoácidos a mais no segmento N-terminal, 13 resíduos adicionais no terceiro LIC e 14 resíduos na porção C-terminal (LU, POTTER, 2017).

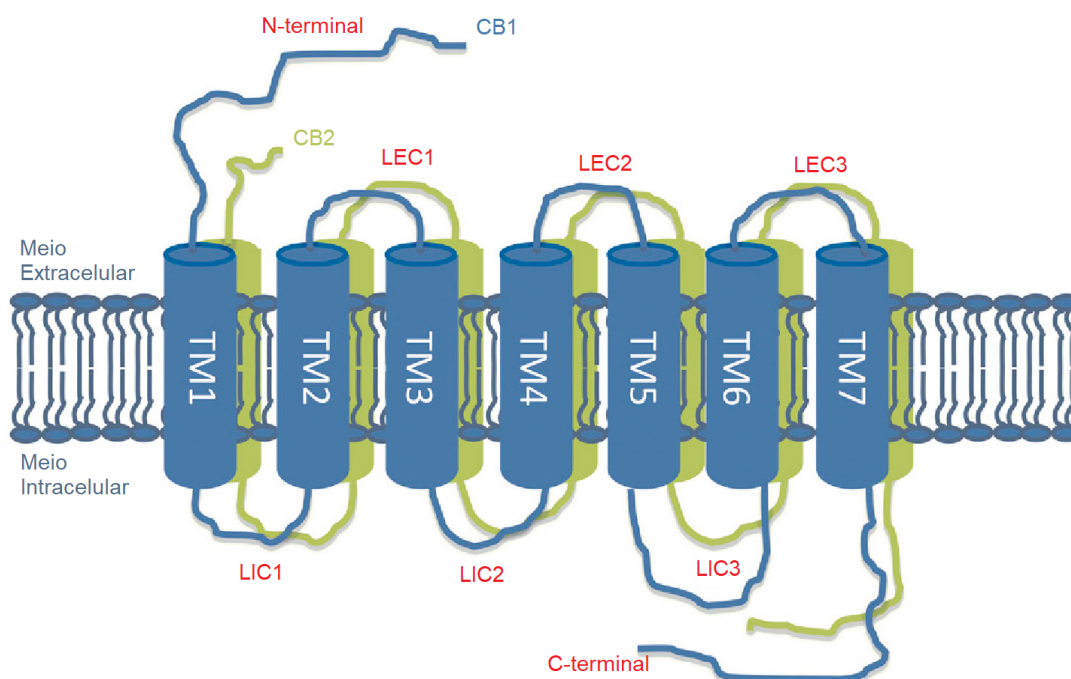


Fig. 1: Representação esquemática das estruturas dos receptores CB1 e CB2, indicados pelas cores azul e verde respectivamente (LU and POTTER, 2017 - Adaptado).

Ambos possuem 44% de suas estruturas primárias homólogas (LU, POTTER, 2017) e 68% de similaridade na sequência das regiões transmembrânicas, porém a sua distribuição pelos tecidos e suas funções exercidas são diferentes entre si (HUA, *et al.* 2020), sabendo que o CB1 é abundantemente expresso no sistema nervoso central (SNC), sendo o principal responsável pelos efeitos psicotrópicos e o CB2 é predominantemente expresso no sistema imune, mas pode ser regulado positivamente no SNC em células da glia em condições patológicas (TABRIZI, 2017; BIE *et al.* 2018).

Devido à sua ligação com a proteína G inibitória, seu mecanismo de transdução de sinal resulta na inibição da atividade da proteína adenilato ciclase e, por conseguinte, uma diminuição da adenosina monofosfato cíclica (cAMP).

### 1.3 Receptor CB2 e a dor neuropática

Atualmente, o principal tratamento para a dor neuropática é a farmacoterapia baseada em medicamentos com dois focos principais: agentes estabilizantes de membrana, por exemplo, antiepilépticos e anestésicos; e medicamentos que aumentam os mecanismos inibitórios do corno dorsal da medula espinal. Sendo esses os medicamentos, pilares do tratamento de dor neuropática, eles também são bastante limitados no caso dessa patologia (SELVARAJAH, D. *et al.*, 2017).

Sabendo disso, já é de conhecimento que as substâncias canabinoides têm sido avaliadas e testadas em diversos tipos diferentes de estudos relacionados à dor, incluindo a dor neuropática, aguda e crônica (SELVARAJAH, D. *et al.*, 2017; HOSSAIN, 2020). Assim, tendo diversas demonstrações de ação antinociceptiva notável em diferentes modelos de dores inflamatórias e neuropáticas (TABRIZI, 2017; HOSSAIN, 2020).

As células da glia são a primeira linha de defesa do SNC contra inflamações e outras injúrias, sendo que a microglia tem um papel de manter e induzir a plasticidade sináptica dos neurônios, porém em casos de adversidade, essas células podem ser ativadas, em que a sua função transita de homeostática saudável para reativa pró-inflamatória e, se não controlada, pode desencadear mecanismos neurodegenerativos como dor neuropática, doença de Parkinson, Alzheimer, entre outras (BIE *et al.* 2018). Essa microglia reativa expressa maior número de receptores CB2, principalmente na região do corno dorsal da medula espinal em diversos modelos de estudo para dor neuropática (TABRIZI, 2017; BIE *et al.* 2018).

Nesse processo, portanto, temos que o aumento da expressão do receptor CB2 nas condições inflamatórias pode ser parte de um mecanismo para diminuição do processo inflamatório, sendo assim diversas investigações já demonstraram que a ativação do receptor CB2 pode limitar, com possibilidade de reverter o processo inflamatório e, com isso, a dor neuropática (BIE *et al.* 2018; CRISTINO, 2020).

### 1.4 Planejamento de fármacos

O planejamento de fármacos baseado em estrutura (SBDD - *Structure Based Drug Design*, em inglês) é atualmente um dos métodos mais importantes para o planejamento racional de fármacos. Esta abordagem permite estudar as

características estruturais e físico-químicas de um potencial alvo com o objetivo de validá-lo como alvo terapêutico e definir quais as características necessárias para o planejamento de um ligante eficaz (BATOOL, 2019, LIMA et al. 2021).

Diante de uma abordagem como essa, é necessário avaliar e elucidar a interações entre ligante e receptor, sendo essencial o entendimento de propriedades eletrostáticas, topológicas, volumes moleculares, forças de ligação entre outras (CHEESERIGHT, 2008). Várias ferramentas computacionais foram desenvolvidas para gerar e analisar as interações do complexo fármaco-receptor, dentre elas o cálculo dos campos de interação molecular (MIF - *Molecular Interaction Fields*, em inglês) (ROCHA, 2010; CHEESERIGHT, 2011; HAYAKAWA, 2019).

#### 1.4.1 Farmacóforo

Uma estratégia bastante utilizada no planejamento de fármacos, associada com SBDD, é a geração de modelos farmacofóricos a partir de informações obtidas dos MIFs, ou seja, as características dos pontos de interação são exploradas na construção de modelos que permitem a seleção de compostos promissores por buscas virtuais (CHEESERIGHT, 2011; SANDERS *et al.* 2012; FERREIRA, 2015).

A definição oficial da União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*, em inglês) em 1998, diz que: 'Um farmacóforo é o conjunto de recursos estéricos e eletrônicos necessários para garantir as interações supramoleculares ideais com uma estrutura alvo biológica específica e para acionar (ou bloquear) sua resposta biológica'. Sendo assim, um farmacóforo indica regiões com propriedades físico-químicas e moleculares, tais como hidrofóbicas ou aromáticas, potenciais ligações de hidrogênio e regiões ionizáveis positiva ou negativamente, complementares possíveis propriedades farmacológicas desejadas (PIRHADI, 2013; GOTINA, 2021; FERNANDES, 2021). Esses pontos podem estar localizados no próprio ligante ou no receptor alvo e podem ser combinados com grupos químicos com propriedades similares (SHIN, 2013, ).

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo realizar uma triagem virtual (VS - *Virtual Screening*, em inglês) de um banco de dados com moléculas previamente

selecionadas em busca de agonistas para CB2 por meio de aplicação de um filtro farmacofórico e ancoragem (*Docking*, em inglês) molecular dos dados obtidos com VS.

## 2.1 Objetivos específicos

Construção de um modelo farmacofórico do receptor Canabinoide 2 baseado na estrutura do receptor (SBDD);

Realização de uma triagem virtual (VS) se utilizando do modelo construído;

Aplicar o método de Dockagem molecular nos resultados obtidos.

Seleção de compostos com sugerida atividade em receptores CB2

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Ferramentas computacionais

O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD - *Computer-Assisted Drug Design*, em inglês) foram realizados em estações computacionais disponíveis no Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais (LITEC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas - USP.

Foram utilizados os programas: PYMOL<sup>®</sup>, CavityPlus<sup>®</sup>, SYBYL-X-2.1<sup>®</sup>, DockThor 2.0<sup>®</sup>, além do banco de dados fornecido para a triagem virtual.

### 3.2 Seleção da estrutura 3D

Para esse estudo, foi selecionada a porção R da proteína de código PDB: 6KPF, referente ao receptor CB2 já acoplado com o ligante agonista denominado AM12033 (HUA *et al.* 2020).

### 3.3 Banco de dados

O banco de dados utilizado foi disponibilizado pelo Dr. Rodolpho Braga da empresa InSilicall, com um total de 3968 moléculas já aprovadas por agências regulatórias internacionais. Foi realizada a conversão do formato "SMILES" para "MOLFile" e adição de átomos de hidrogênio através da plataforma CACTUS<sup>®</sup>,

disponível em: <https://cactus.nci.nih.gov/translate/>. As moléculas foram numeradas de 1 a 3968, de acordo com a ordem fornecida pelo banco de dados.

### 3.4 Campos de Interação Molecular (MIFs)

Uma análise dos Campos de Interação Molecular foi realizada no programa CavityPlus® (disponível em: <http://www.pkumdl.cn:8000/cavityplus/index.php>), para determinar as cavidades considerados *drugale* na proteína, e no programa CavityPharm®, determinou-se as características físico-químicas dos pontos de interesse da cavidade selecionada.

### 3.5 Modelagem do Farmacóforo

A partir dos dados fornecidos pelas plataformas CavityPlus® e CavityPharm® e das informações presentes referentes à cristalização do receptor relacionadas às interações realizadas pelo ligante co-cristalizado, foi utilizado o programa PYMOL® para visualização e modelagem do filtro farmacofórico de 5 pontos. Foram definidas coordenadas nos eixos x, y e z, bem como o tamanho de cada campo com valor em angstrom (Å).

### 3.6 Triagem Virtual (VS)

Foi empregado o programa UNITY®, implementado no pacote computacional SYBYL 2.1® para a triagem virtual do banco de dados fornecido utilizando o modelo farmacóforo construído como filtro.

### 3.7 Dockagem dos resultados

Os resultados obtidos pela triagem inicial, foram submetidos à técnica de dockagem molecular, realizada no programa DockThor 2.0® (disponível em <https://dockthor.lncc.br/v2/>). A validação da metodologia foi previamente realizada por redocking do agonista AM12033 co-cristalizado. Todos os procedimentos utilizaram caixas de 10 Å. Para o centro da caixa, foi utilizado o carbono C6 ligante (x= 110,465, y= 108,877 e z= 125,157).

Para os procedimentos realizados, foram utilizadas todas as configurações padrão da plataforma DockThor 2.0® e o próprio programa adicionou os hidrogênios e as cargas necessárias.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cavidade

A plataforma CavityPlus<sup>®</sup> indicou 12 cavidades dentro da porção R da proteína 6KPF (tabela anexo 1). Utilizando do dado de “Drug Score” e conhecimento prévio da posição do ligante fornecido por HUA *et al.* 2020, foi escolhida a cavidade 3 para a modelagem do farmacóforo.

### 4.2 Farmacóforo

Após a determinação da cavidade a ser trabalhada, a plataforma CavityPharm<sup>®</sup> forneceu dados e posições de todos os potenciais MIFs encontrados (tabela anexo 2). Em seguida os dados foram transportados para o programa PYMOL<sup>®</sup>, no qual foi possível realizar comparação visual entre os pontos obtidos pelo CavityPharm<sup>®</sup> (figura 2) com os resíduos de aminoácidos descritos como pontos de interação (figura 3).

Observando as posições dos aminoácidos PHE-94, PHE-183 e PHE-281, que interagem com o ligante AM12033 formando interações  $\pi$ - $\pi$ , foi possível identificar proximidade e complementaridade com três pontos indicados pela plataforma CavityPharm<sup>®</sup>, apresentados como centros hidrofóbicos. Em sequência, a posição do aminoácido SER-285 foi determinada e, novamente complementada por um ponto dado pelo programa, assim encontrando um quarto ponto, porém relacionado à ligação de hidrogênio. Por fim, observando os aminoácidos presentes na superfície da cavidade e os pontos dados pelo programa foi determinado um quinto ponto como correspondência parcial, também relacionado à ligação de hidrogênio.

Todos os pontos descritos foram selecionados e comparados com a cavidade descrita pelo programa CavityPlus<sup>®</sup>, possibilitando avaliar se a posição e o raio de cada MIF é compatível com tamanho da cavidade.

Dessa forma foram obtidos 5 MIFs (tabela 1) com tamanhos e posições compatíveis com o receptor e o ligante, caracterizando o farmacóforo que será utilizado na triagem virtual (figura 4).

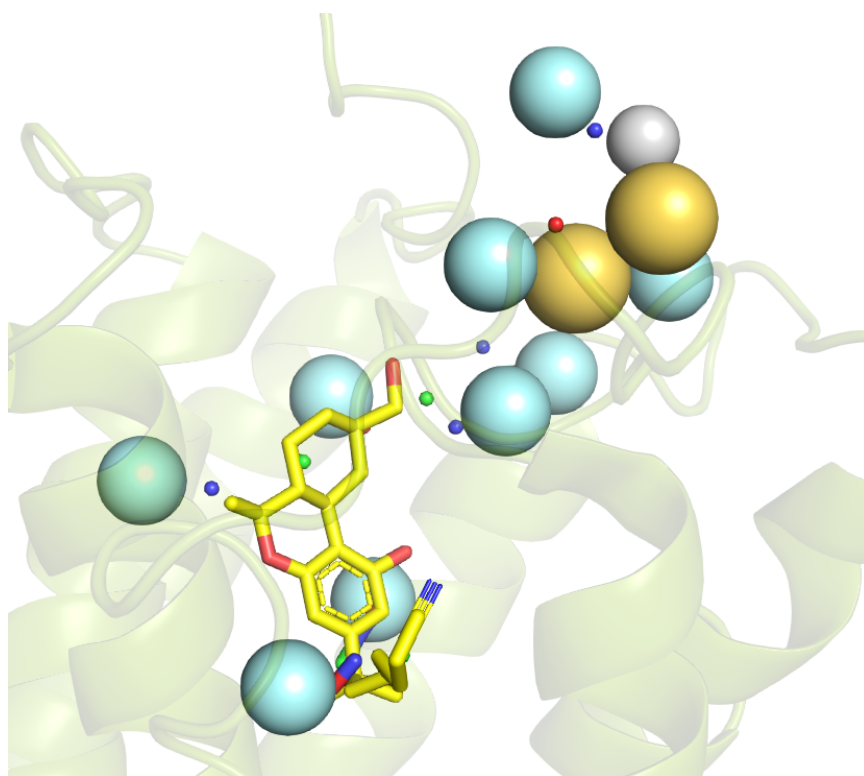


Figura 2: Todos os potenciais MIFs indicados pela plataforma CavityPharm<sup>®</sup> representados pelas esferas, sendo: dourado: centro eletrostático negativo; branco: centro eletrostático positivo; verde: centro hidrofóbico; azul: centro doador para ligação de hidrogênio; ciano: raiz para ligação de hidrogênio; e vermelho: centro aceitador para ligação de hidrogênio. (Realizada através do programa PyMol<sup>®</sup>)

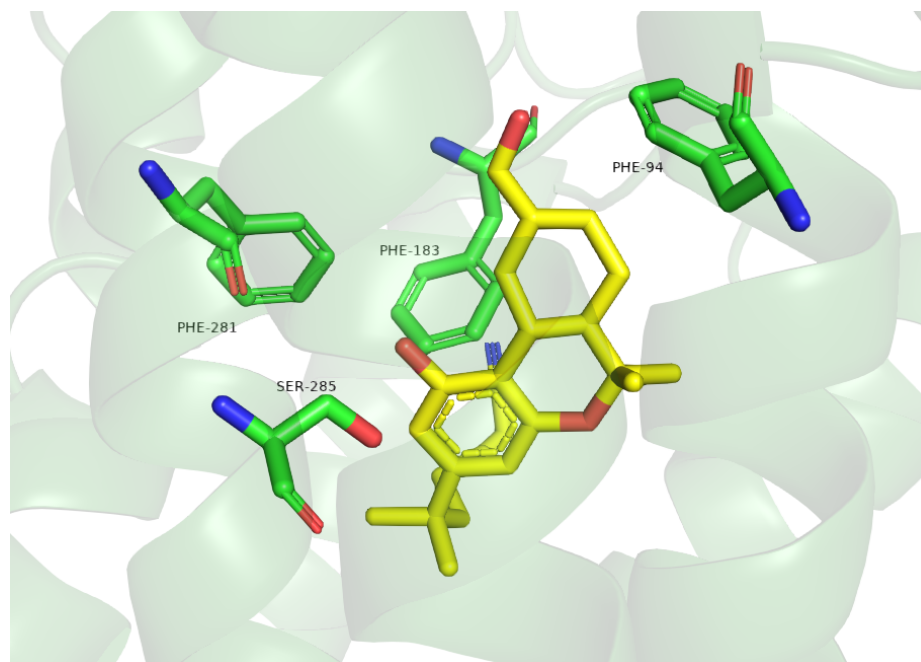


Figura 3: Discriminação dos resíduos de aminoácidos (verde) favoráveis à interações com o ligante (amarelo) (HUA *et al.* 2020) (Realizada através do programa PyMol<sup>®</sup>).






Campos de interação molecular (MIFs)	x	y	z	Raio (Å)
 Centro Hidrofóbico	110.00	106.00	126.50	1.50
 Centro Hidrofóbico	106.50	105.00	123.00	1.50
 Centro Hidrofóbico	107.50	113.50	130.00	1.50
 Ligação-H centro doador	112.50	106.00	128.50	1.00
 Ligação-H raiz	111.38	110.41	121.62	1.50

Tabela 1: Dados dos MIFs que caracterizam o farmacóforo modelado.

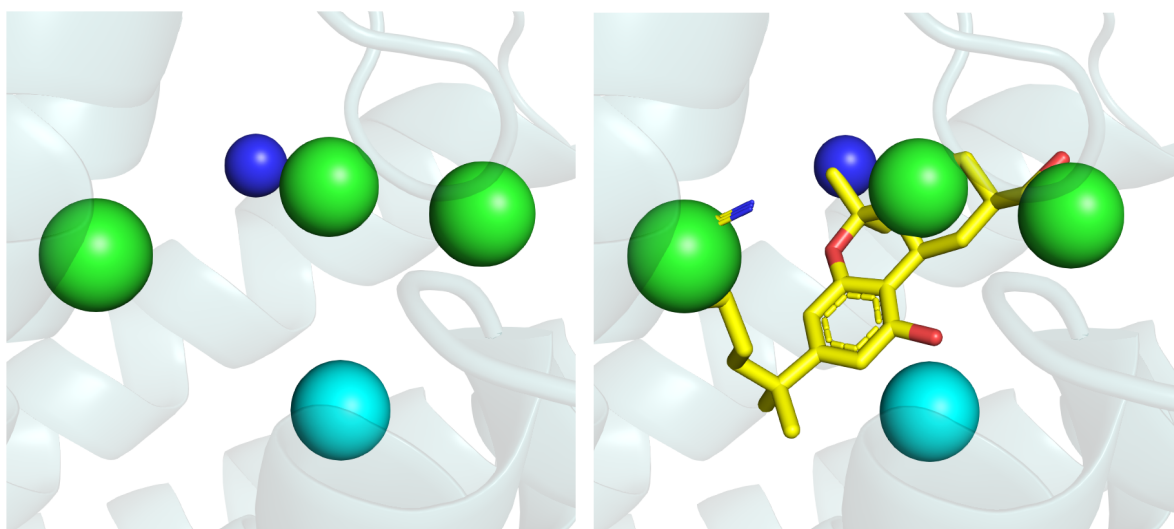


Figura 4: Modelo visual do farmacóforo sem e com o ligante AM12033, respectivamente. As cores se preservam e seguem o padrão indicado pela tabela 1 e as esferas aparecem já na sua escala correta em angstrom (Å) (Realizada através do programa PyMol®).

### 4.3 Triagem Virtual (VS)

Foram realizadas 4 tentativas de VS utilizando o modelo farmacóforo como filtro. A primeira utilizando-se também como filtro a regra dos 5 de Lipinski e considerando os três MIFs em verde como interações  $\pi$ - $\pi$ , como determinado pelo artigo (HUA *et al.* 2020). A triagem não obteve resultados compatíveis, portanto foi realizada uma nova VS desconsiderando o filtro de Lipinski, obtendo apenas uma molécula de massa molecular incompatível com a cavidade estudada e, portanto, considerada um falso positivo.

Como não houveram resultados positivos em ambas as análises, foram alterados no programa UNITY os três MIFs de interação  $\pi$ - $\pi$  para centros hidrofóbicos, como determinado pela plataforma CavityPharm®. Novamente, utilizando o filtro de Lipinski, não foram obtidos resultados, porém sem a aplicação

do mesmo foram obtidas 8 moléculas. Foram desconsideradas as moléculas com massa e volume molecular incompatíveis com a cavidade determinada, restando 3 resultados (tabela 2).

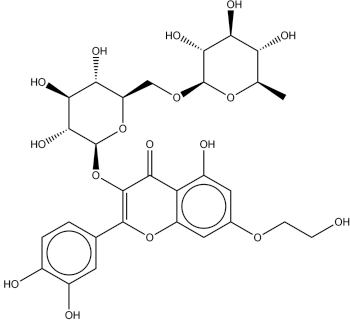
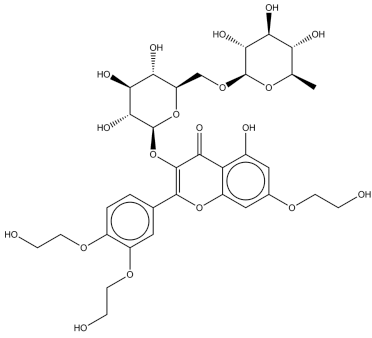
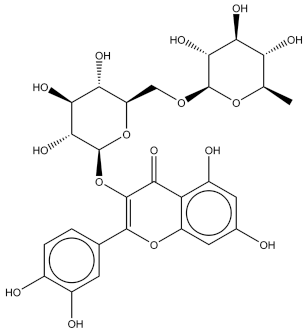
	Molécula 1
	Molécula 3
	Molécula 7

Tabela 2: Representações em 2D das moléculas obtidas pela triagem virtual sem a aplicação do filtro de Lipinski, já desconsiderando os falsos positivos incompatíveis.

## 4.4 Docking

### 4.4.1 Redockagem

A redockagem realizada no programa DockThor 2.0<sup>®</sup> obteve um desvio da raiz quadrada média (RMSD - *Root mean-square deviation*, em inglês) de 0,897 e score de -12,617. O resultado pode ser observado na figura 5 e confirma a qualidade do modelo utilizado.

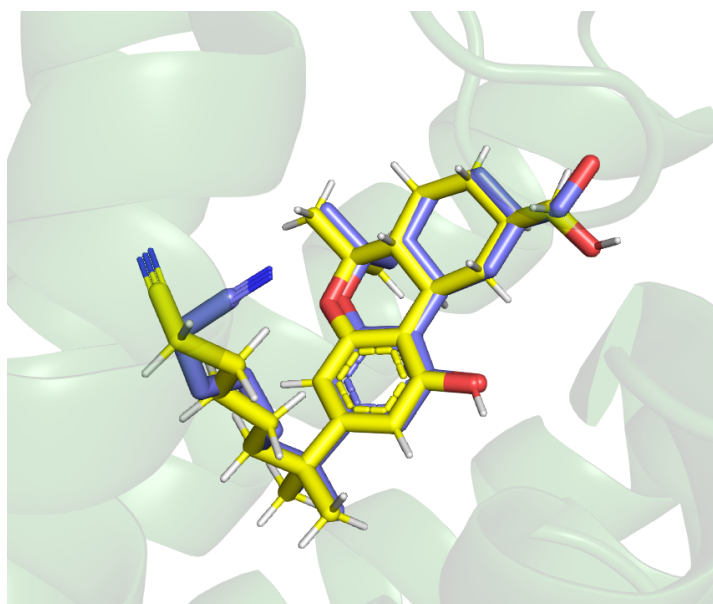


Figura 5: Esquema visual comparando a pose do ligante cristalografado (amarelo), da redockagem realizada no DockThor 2.0<sup>®</sup> (roxo) (Realizada através do programa PyMol<sup>®</sup>).

#### 4.4.2 Dockagem

As moléculas obtidas por meio da triagem virtual foram submetidas ao docking molecular, buscando avaliar a complementaridade molecular entre ligante e receptor, considerando para isso as melhores poses e scores de pontuação. Primeiramente realizado no programa DockThor 2.0<sup>®</sup>, as moléculas obtidas foram classificadas de acordo com seu score, como representado na tabela 3, e em seguida foram colocadas no PyMol para visualização das poses, como as figuras abaixo podem indicar.

Molécula	Score
1	-12,438
3	-13,066
7	-11,804

Tabela 3: Pontuações (scores) resultantes da realização do Docking molecular das três moléculas obtidas pela triagem virtual. (Realizado através do programa DockThor 2.0<sup>®</sup>).

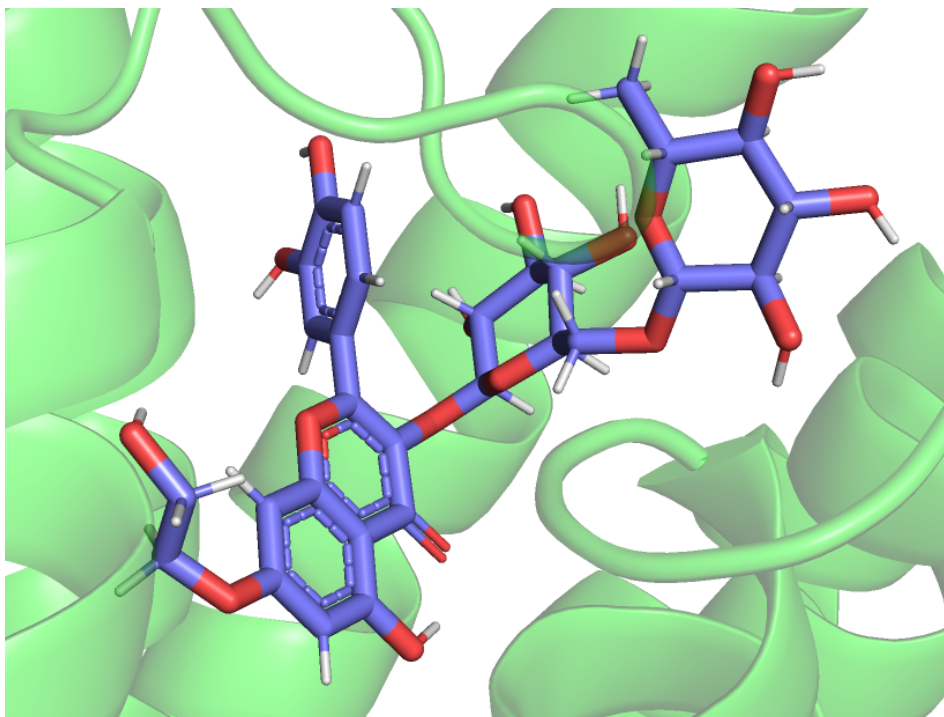


Figura 6: Docking da Molécula 1 (roxo) realizado no DockThor 2.0<sup>®</sup>. Representação visual da melhor pose encontrada (Realizada através do programa PyMol<sup>®</sup>).

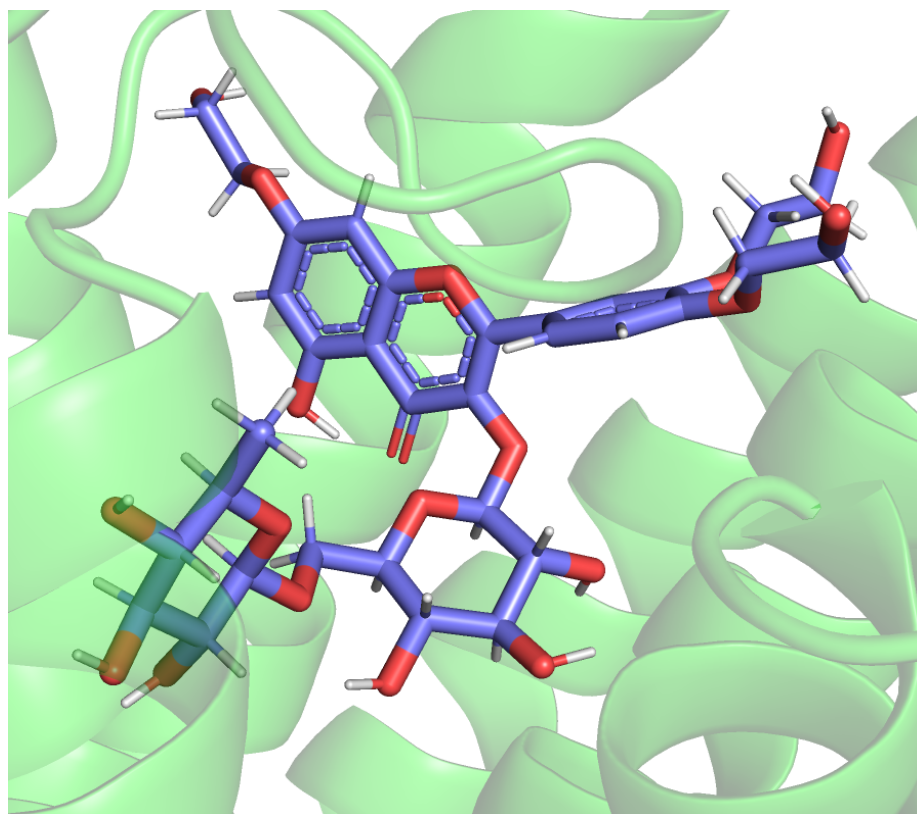


Figura 7: Docking da Molécula 3 (roxo) realizado no DockThor 2.0<sup>®</sup>. Representação da melhor posição encontrada (Realizada através do programa PyMol<sup>®</sup>).

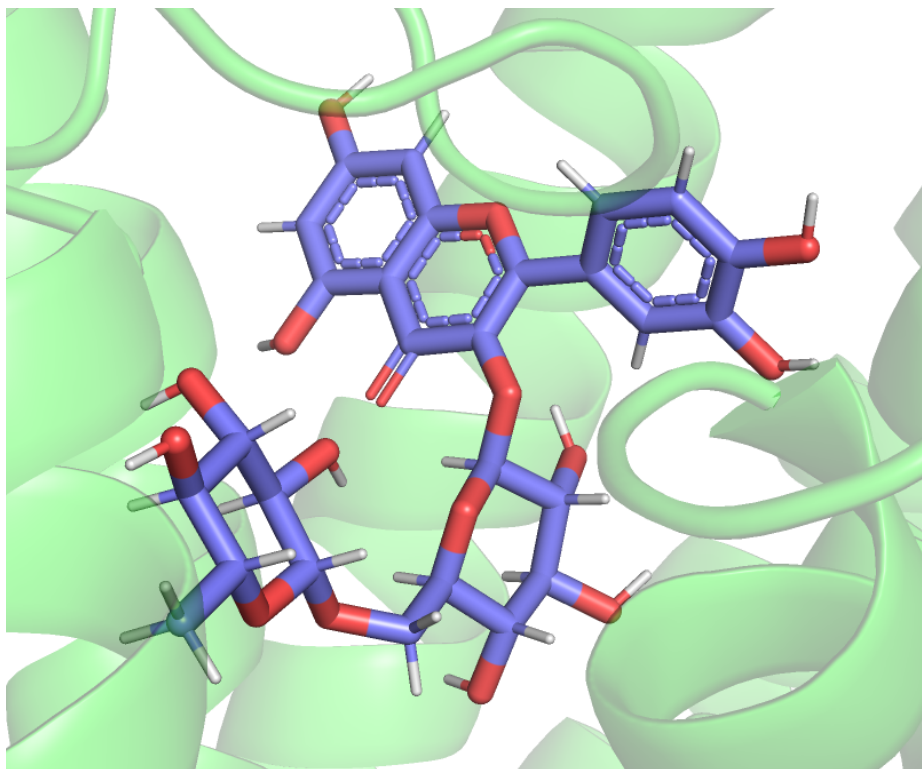


Figura 8: Docking da Molécula 7 (roxo) realizado no DockThor 2.0<sup>®</sup>. Representação da melhor pose encontrada (Realizada através do programa PyMol<sup>®</sup>).

#### 4.5 Análise dos resultados

Após a realização do docking, as moléculas foram comparadas com o sítio ativo previamente descrito, sendo compatíveis com o volume da cavidade e com o farmacóforo, além de possuírem grande potencial de interagir com os resíduos de aminoácidos discriminados na figura 3, portanto, de acordo com as interações sugeridas acredita-se que esses compostos devam ser agonistas para o receptor Canabinoide 2.

#### 5. CONCLUSÃO

A partir das análises conduzidas, e dos resultados obtidos, é possível dizer que a triagem virtual teve sucesso na obtenção de novas moléculas com sugerida ação bioativa nos receptores CB2. Essa estratégia pode acelerar o processo de desenvolvimento de novos fármacos.

As moléculas selecionadas neste presente trabalho, devem ser testadas em uma abordagem experimental *in vitro*, a fim de avaliar sua eficácia na ativação do receptor CB2 e assim, seguir o estudo para o desenvolvimento de um medicamento mais eficiente e específico para o tratamento da dor neuropática.

## 6. REFERÊNCIAS

BATOOL, M., AHMAD, B., CHOI, S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 20, p. 2783, Jun, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20112783>.

BIE, B. *et al.* An overview of the cannabinoid type 2 receptor system and its therapeutic potential. **Current opinion in Anesthesiology**, Vol. 31, p. 407 - 414, Ago, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/aco.0000000000000616>.

BOUHASSIRA D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. **Revue Neurologique**, Paris, Vol. 175, p. 16 - 25, Jan - Feb, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016>.

CHEESERIGHT, T. *et al.* Rapid discovery of new leads for difficult targets: application to CCK2 and I I beta-HSD I. **Chemistry Central Journal**, Vol. 2, p. 32, Mar, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-2-S1-P32>.

CHEESERIGHT, T. *et al.* High Content Pharmacophores from Molecular Fields: A Biologically Relevant Method for Comparing and Understanding Ligands. **Current Computer-Aided Drug Design**, Vol. 7, p. 190 - 205, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157340911796504314>.

COLLOCA, Luana. *et al.* Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, 17002, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>.

CRISTINO, L. *et al.* Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, Vol. 16, p. 9 - 29, Jan, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>.

DOCKTHOR 2.0<sup>®</sup>. Disponível em: <https://www.dockthor.Incc.br/v2/>. Acesso em: Março/2021 até Junho/2021.

FERNANDES, M. *et al.* Insights on 3D Structures of Potential Drug-targeting Proteins of SARS-CoV-2: Application of Cavity Search and Molecular Docking. **Molecular Informatics**, Vol. 40, Fev, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/minf.202000096>.

FERREIRA, L. *et al.* Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, Vol. 20, p. 13384 - 13421, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157340911796504314>.

FINNERUP, Nanna B. *et al.* Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**, Vol. 157, p. 1599 - 1606, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1097%2Fj.pain.0000000000000492>.

GOTINA, L. *et al.* Pharmacophore-Based Virtual Screening of Novel Competitive Inhibitors of the Neurodegenerative Disease Target Kynurenine-3-Monooxygenase. **Molecules**, Vol. 31, Mai, 2021. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/molecules26113314>.

GUIDON, J. and HOHMANN A. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. **British Journal of Pharmacology**, Vol. 153, p. 319 - 334, Jan, 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707531>.

HAYAKAWA, D. *et al.* A Molecular interaction field describing nonconventional intramolecular interactions and its application to protein-ligand interaction prediction. **Journal of Molecular Graphs and Modeling**, Vol. 96, Mai, 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.107515>.

HOSSAIN, M. *et al.* Targeting Peripherally Restricted Cannabinoid Receptor 1, Cannabinoid Receptor 2, and Endocannabinoid-Degrading Enzymes for the Treatment of Neuropathic Pain Including Neuropathic Orofacial Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 20, p. 1423, Fev, 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/ijms21041423>.

HUA, T. *et al.* Activation and Signaling Mechanism Revealed by Cannabinoid Receptor-Gi Complex Structures. **Cell**, Vol. 180, p. 655 - 665, Fev, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.008>.

KLINGNER, Carsten and WITTE, Otto. Somatosensory deficits. **Handbook of Clinical Neurology**. Vol.151, p. 185 - 206, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63622-5.00009-7>.

LIMA, E. *et al.* Insights into newly approved drugs from a medicinal chemistry perspective. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557521666210226145328>.

LU, D. and POTTER, D. Cannabinoids and the Cannabinoid Receptors: An Overview. **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**, p. 553 - 563, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00068-5>.

PIRHADI, S. *et al.* Methods and applications of structure based pharmacophores in drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Vol. 13, p. 1036 - 1047, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1568026611313090006>.

PROTEIN DATA BANK. Disponível em: <https://www.rcsb.org/pdb/>. Acesso em: Março/2021 até Junho/2021.

ROCHA, J., FREITAS, R. and MONTANARI, C. The GRID/CPCA approach in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, Vol. 5, p. 333 - 346, Abr, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17460441003652959>.

SANDERS, M. *et al.* Comparative analysis of pharmacophore screening tools. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Vol. 52, p. 1607 - 1620, Jun, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci2005274>.

SELVARAJAH, D. *et al.* Cannabinoids and Their Effects on Painful Neuropathy. **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**, p. 905 - 916, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00109-5>.

SHIN, W. and SEONG, B. Recent advances in pharmacophore modeling and its application to anti-influenza drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, Vol 8, p. 411 - 426, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.767795>.

TABRIZI, M. Aghazadeh and Baraldi, P. G. Chemistry of Cannabinoid Receptor Agonists. **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**, p. 592 - 605, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00072-7>.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

XU, Y. *et al.* CavityPlus: a web server for protein cavity detection with pharmacophore modelling, allosteric site identification and covalent ligand binding ability prediction. **Nucleic Acids Research**, 46, W374-W379.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1: Dados das cavidades

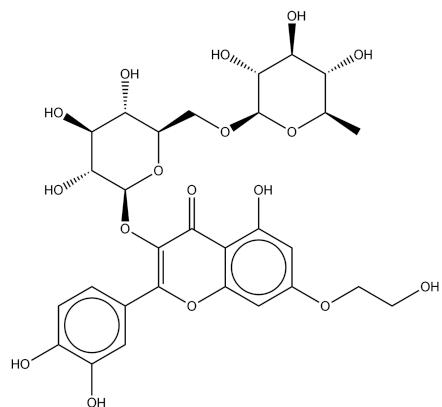
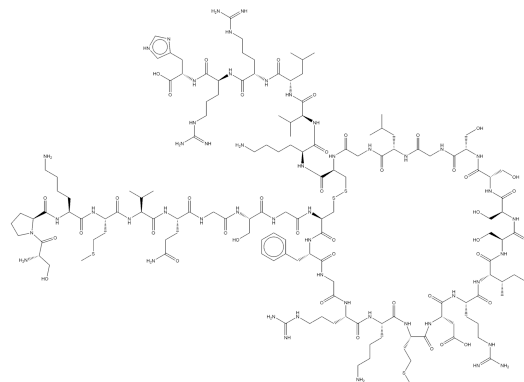
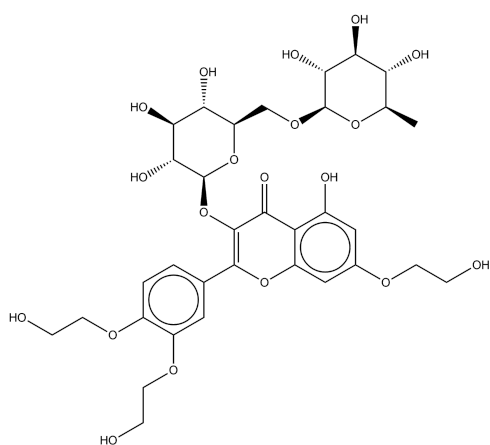
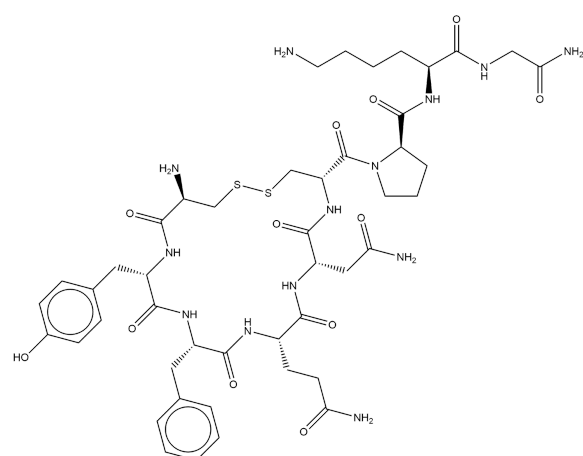
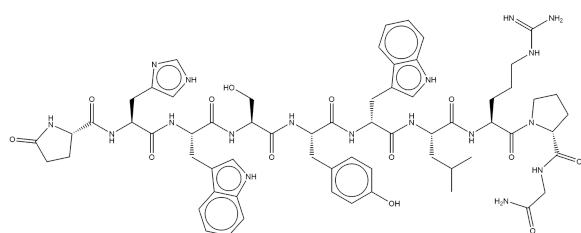
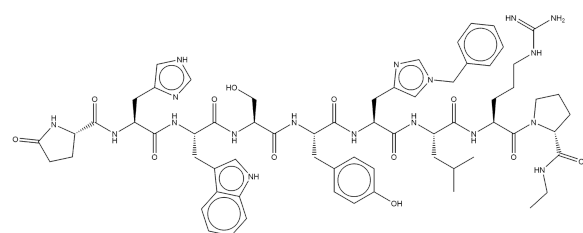
Nº	Drug Score	Drogabilidade
1	1703.00	Forte
2	647.00	Forte
3	2464.00	Forte
4	16.00	Média
5	-437.00	Fraca
6	-1016.00	Fraca
7	-1265.00	Fraca
8	-1160.00	Fraca
9	-1495.00	Fraca
10	-1132.00	Fraca
11	-1305.00	Fraca
12	-876.00	Fraca

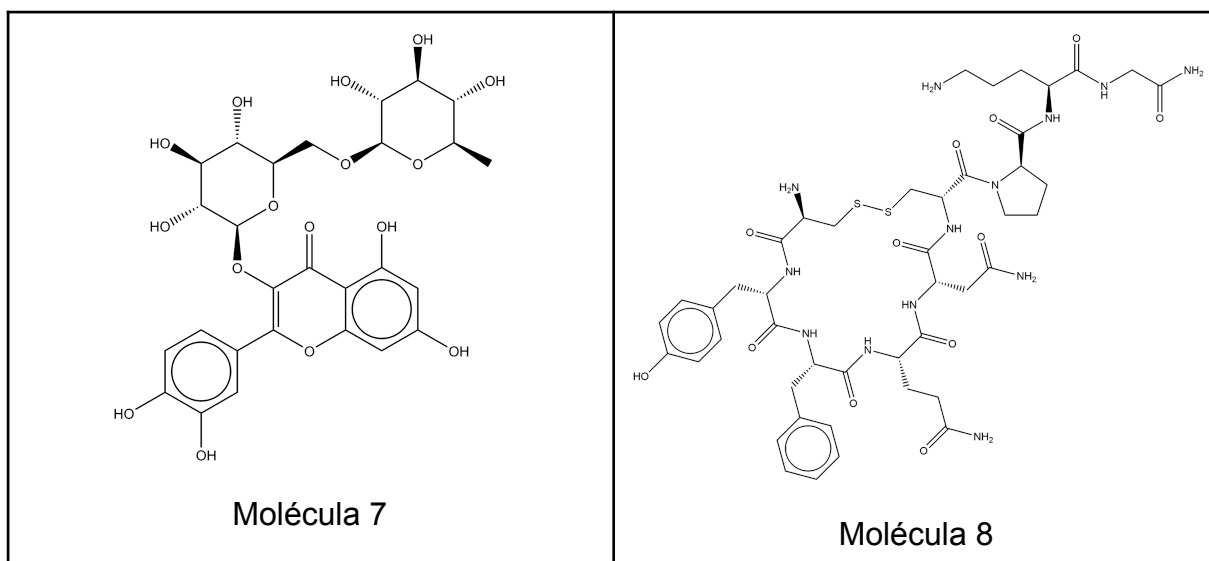
Dados das cavidades presentes na porção R do receptor CB2. Foi escolhida a cavidade 3 para sequência da pesquisa.

## Anexo 2: Campos de interação molecular (MIFs)

Classe Farmacofórica da Caverna3	x	y	z	Raio (Å)
Centro Eletrostático positivo (POK 4.H)	96.50	100.00	122.50	2.00
Ligação-H centro doador (POK 2.N)	97.00	100.00	123.50	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	97.94	98.07	125.30	1.50
Ligação-H centro doador (POK 2.N)	97.00	100.00	126.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	97.94	98.07	125.30	1.50
Ligação-H centro aceptor (POK 2.O)	109.00	105.00	123.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	110.31	103.25	121.67	1.50
Ligação-H centro aceptor (POK 2.O)	97.00	102.00	122.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	97.71	104.17	120.93	1.50
Centro Hidrofóbico (POK 2.C)	110.00	106.00	126.50	1.50
Centro Hidrofóbico (POK 2.C)	106.50	105.00	123.00	1.50
Centro Hidrofóbico (POK 2.C)	107.50	113.50	130.00	1.50
Centro Hidrofóbico (POK 2.C)	111.50	112.50	125.50	1.50
Ligação-H centro doador (POK 2.N)	109.50	113.00	129.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	110.93	113.23	131.13	1.50
Ligação-H centro doador (POK 2.N)	112.50	106.00	128.50	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	114.84	104.78	128.44	1.50
Ligação-H centro aceptor (POK 2.O)	110.50	113.50	129.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	110.93	113.23	131.13	1.50
Ligação-H centro aceptor (POK 2.O)	110.50	111.00	123.50	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	111.38	110.41	121.62	1.50
Ligação-H centro aceptor (POK 2.O)	99.00	102.50	127.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	101.14	103.04	127.97	1.50
Ligação-H centro doador (POK 2.N)	105.00	103.50	120.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	103.45	104.99	118.04	1.50
Ligação-H centro doador (POK 2.N)	111.00	111.50	124.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	111.38	110.41	121.62	1.50
Ligação-H centro doador (POK 2.N)	105.50	106.50	124.00	1.00
Ligação-H raiz (POK 3.F)	103.39	106.85	124.84	1.50
Centro eletrostático negativo (POK 4.S)	100.00	103.50	123.50	2.00
Centro eletrostático negativo (POK 4.S)	96.50	103.00	124.00	2.00

Potenciais campos de interação molecular (MIFs) obtidos através da plataforma CavityPharm®

**Anexo 3: Moléculas obtidas na triagem virtual****Molécula 1****Molécula 2****Molécula 3****Molécula 4****Molécula 5****Molécula 6**



Todas as moléculas obtidas na triagem virtual sem a utilização do filtro de Lipinski. Devido ao grande volume molecular das demais, neste estudo só foram utilizadas as moléculas 1, 3 e 7.

*Gianfrancesco G. Antonangeli*

\_\_\_\_\_  
Data e assinatura do aluno(a)

*[Handwritten Signature]*

\_\_\_\_\_  
Data e assinatura do orientador(a)