

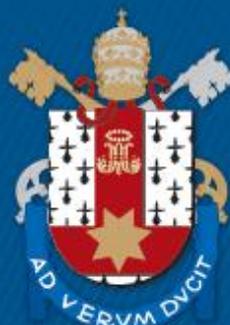
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

SILVANA DA CUNHA RUSSO

**O Receptor Canabinoide 1- Desafios no Desenho de Fármacos com Enfoque nas Ferramentas da Bioinformática.**

Porto Alegre  
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR  
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**SILVANA RUSSO**

**O Receptor Canabinoide 1. Desafios no Desenho de Fármacos com  
Enfoque nas Ferramentas da Bioinformática.**

**Porto Alegre, 2020**

**SILVANA RUSSO**

**O Receptor Canabinoide 1. Desafios no Desenho de Fármacos com  
Enfoque nas Ferramentas da Bioinformática.**

Tese de Doutorado apresentada como requisito  
para a obtenção do grau de Doutor pelo  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.**

**Porto Alegre**

**2020**

## Ficha Catalográfica

R969r Russo, Silvana da Cunha

O Receptor Canabinóide 1 : Desafios no desenho de fármacos com enfoque nas ferramentas da bioinformática / Silvana da Cunha Russo . – 2020.

107.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Junior.

1. Receptor canabinoide. 2. desenho de fármacos. 3. acoplamento. 4. GPCR. 5. agonista inverso. I. Azevedo Junior, Walter Filgueira de. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

“A satisfação da própria curiosidade é uma das  
maiores fontes de felicidade na vida.”

Linus Carl Pauling

**SILVANA RUSSO**

**O Receptor Canabinoide 1. Desafios no Desenho de Fármacos com  
Enfoque nas Ferramentas da Bioinformática.**

Tese de Doutorado apresentada como requisito  
para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da  
Escola de Ciências da Saúde e da Vida da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Área de concentração:  
Biologia Molecular da Interação Droga/Alvo

**Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Dr. Maurício Reis Bogo**

---

**Profa. Dra. Fernanda Canduri**

---

**Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira**

**Porto Alegre, 2020**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese à minha família, que desde sempre se encantou com a curiosidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Dr. Walter Filgueira de Azevedo Junior, por ter acreditado no projeto, por ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica Estrutural, pelo apoio, pela facilidade na transmissão do conhecimento, pela disponibilidade mesmo em tempos de pandemia. O professor Walter consegue sempre mostrar o seu amor pela ciência e pelo ensino, e só fica satisfeito quando todos os conceitos foram bem entendidos.

Agradeço também à minha família, pelo entusiasmo e pelo apoio.

À Capes, pelo financiamento à pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>7</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>8</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. A Filogenia do Receptor Canabinoide 1.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2. GPCRs.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3. Estrutura do Receptor Canabinoide 1.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4. Distribuição do Receptor Canabinoide 1.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.1. Localização de CB1 nos Neurônios.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.2. Localização de CB1 em Células Não Neuronais ou Organelas Intracelulares.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.3. Localização de CB1 no Corpo.....</b>	<b>25</b>
<b>1.5. Ligantes Canabinoides.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.1. Fitocannabinoides.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.2. Ligantes Canabinoides Endógenos.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.3. Canabinoides Sintéticos.....</b>	<b>27</b>
<b>1.6. Sistema Endocanabinoide.....</b>	<b>30</b>
<b>1.6.1. Receptores Órfãos.....</b>	<b>31</b>

<b>1.7. O Processo de Ativação dos GPCR.....</b>	<b>31</b>
<b>1.8. Atividade Constitutiva.....</b>	<b>38</b>
<b>1.9. Sinalização do Receptor Canabinoide 1.....</b>	<b>39</b>
<b>1.10. Proteínas G e Arrestinas.....</b>	<b>40</b>
<b>1.11. Sinalização Tendenciosa.....</b>	<b>41</b>
<b>1.12. Transmissão Sináptica Retrógrada.....</b>	<b>44</b>
<b>1.13. Plasticidade Sináptica.....</b>	<b>45</b>
<b>1.14. Métodos Computacionais.....</b>	<b>47</b>
1.14.1. O modelo Chave e Fechadura.....	47
1.14.2. Princípios do Reconhecimento Molecular.....	48
1.14.3. Docking Molecular.....	50
1.14.4. Estrutura Cristalográfica do CB1.....	51
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>53</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	54
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
4.1. Docking Molecular de Complexos Proteína-Ligante.....	55
4.2. Algoritmo de Busca.....	59
4.3. Função Escore.....	61
4.4. Avaliação dos Resultados de Docking Molecular.....	65
4.5. Avaliação da Interação Proteína-Ligante.....	65
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
5.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO ARTIGO 1.....	67

<b>5.1.1. Análise da Estrutura do Receptor Canabinoide 1.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1.2. Simulações de Docking Molecular.....</b>	<b>70</b>
<b>5.1.3. Interações Intermoleculares.....</b>	<b>72</b>
<b>5.1.4. Conclusão Artigo 1.....</b>	<b>79</b>
<b>5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO ARTIGO 2.....</b>	<b>80</b>
<b>5.2.1. Simulações de Docking Molecular.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.2. Interações Intermoleculares.....</b>	<b>83</b>
<b>5.2.3. Conclusão Artigo 2.....</b>	<b>87</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7. TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>90</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>
<b>9. ARTIGOS PUBLICADOS.....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Estrutura esquemática de GPCR na membrana celular.</b>	<b>21</b>
<b>Figura 2. Estrutura do CB1.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 3. Distribuição de CB1 no Corpo Humano.</b>	<b>25</b>
<b>Figura 4. Seletividade dos agonistas canabinoides.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 5. Seletividade dos antagonistas canabinoides.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6. Síntese, Hidrólise e Transformação dos Endocanabinoides.</b>	<b>30</b>
<b>Figura 7. CB1.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 8. O padrão de resíduos conservados do CB1.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 9. A via de ativação dos GPCR.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 10. Mudanças conformacionais dos GPCR após ativação.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 11. Interruptor do CB1.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 12. Torções na hélice.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 13. Sinalização do CB1.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 14. GPCR interagindo com Proteína G e com arrestina.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 15. Analogia do docking molecular.</b>	<b>56</b>
<b>Figura 16. Estrutura do agonista inverso AM6538.</b>	<b>57</b>
<b>Figura 17. Estrutura de um sistema de quatro átomos.</b>	<b>57</b>
<b>Figura 18. Molécula AM6538 e aminoácidos do bolsão de CB1.</b>	<b>58</b>
<b>Figura 19. Sequência de etapas do algoritmo ACO.</b>	<b>60</b>
<b>Figura 20. Identificação dos campos de informação do arquivo PDB.</b>	<b>62</b>
<b>Figura 21. Equivalência entre as coordenadas atômicas e a representação gráfica de moléculas.</b>	<b>63</b>

<b>Figura 22. Fluxograma para a análise computacional das interações intermoleculares entre o CB1 e ligantes.</b>	<b>66</b>
<b>Figura 23. Alinhamento sequencial das proteínas rho, CB1 e A2A.</b>	<b>68</b>
<b>Figura 24. Estrutura cristalográfica do CB1 e AM6538.</b>	<b>69</b>
<b>Figura 25. Rede de ligações de hidrogênio na estrutura do CB1.</b>	<b>70</b>
<b>Figura 26. Resultados do re-docking com a estrutura do CB1.</b>	<b>71</b>
<b>Figura 27. Docking molecular dos agonistas inversos.</b>	<b>72</b>
<b>Figura 28. Análise das interações intermoleculares entre agonistas inversos e CB1.</b>	<b>73</b>
<b>Figura 29. Estruturas moleculares de dipirona e 4-aminoantipirina.</b>	<b>80</b>
<b>Figura 30. Redocking do CB1.</b>	<b>81</b>
<b>Figura 31. Superposição entre 4-AA e o ligante AM11542.</b>	<b>82</b>
<b>Figura 32. As regiões hidrofóbicas do CB1-4-AA e AM11542.</b>	<b>83</b>
<b>Figura 33. Interações intermoleculares entre 4-AA e o CB1.</b>	<b>84</b>
<b>Figura 34. Interações intermoleculares entre AM11542 e o CB1.</b>	<b>85</b>
<b>Figura 35. Interações intermoleculares da superposição do CB1 com 4-AA e AM11542.</b>	<b>86</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA Ácido Araquidônico

A2A Receptor de Adenosina 2A

ABHD6  $\alpha\beta$  Hidrolase 6

ABHD12  $\alpha\beta$  Hidrolase 12

ACO Otimização da Colônia de Formigas (Ant Colony Optimization)

AEA Anandamida, N-araquidonoiletanolamina

CB1 Receptor Canabinoide 1

CB2 Receptor Canabinoide 2

CBD Canabidiol

DAGL Diacilglicerol Lipase

DSE Supressão da Excitação Induzida por Despolarização

DSI Supressão da Inibição Induzida por Despolarização

ECs Endocanabinoides

ECL1-ECL3 Alças Extracelulares 1-3

FAAH Amida Hidrolase de Ácidos Graxos

GPCRs Receptores Acoplados a Proteína G

GPCRK Quinases de GPCR

GRK Proteínas Quinases A, G e C

ICL1–ICL3 Alças Intracelulares 1-3

ICD Insensibilidade Congênita à Dor

LTD Depressão de longa Duração

LTP Facilitação de Longa Duração

MAGL Monoacilglicerol Lipase

MAPK MAP Kinase

MVD Molegro Virtual Docker

NADA Dopamina N-araquidonoil

NAPE N-Acil-Fosfatidiletanolamina

NAPE-PLD N-Acil-Fosfatidiletanolamina Específica para a Fosfolipase D

PDB Protein Data Bank

PKA Proteína Kinase A

RC Receptor Canabinoide

Rho Receptor da Rodopsina

RmGlu Receptor Metabotrópico de Glutamato

RMSD Root Mean Square Deviation

SEC Sistema Endocanabinoide

SNC Sistema Nervoso Central

SNP Sistema Nervoso Periférico

THC Tetrahydrocannabinol

2-AG 2-Araquidonoilglicerol

4-AA 4-Aminoantipirina

## RESUMO

O Receptor Canabinoide 1 (CB1) é uma proteína de membrana prevalente no Sistema Nervoso Central (SNC), e teve sua estrutura cristalográfica foi recentemente resolvida e disponibilizada. Mais estudos são necessários na investigação da estrutura tridimensional dos complexos de CB1 com seus ligantes, para auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos. Nosso objetivo aqui foi realizar simulações computacionais do CB1, focando nas suas interações com ligantes potenciais. Nós começamos com uma revisão de literatura e então descrevemos os estudos recentes sobre a estrutura cristalográfica do CB1. Nós reportamos o desenvolvimento de um novo protocolo de docking molecular para investigar ligantes em potencial contra o CB1. Nós usamos a informação estrutural para descrever as interações intermoleculares de complexos CB1-ligantes. Nós também descrevemos a metodologia de docking molecular para simular as interações do CB1 com agonistas inversos, e também com agonistas. A análise da estrutura cristalográfica e os resultados de docking molecular revelaram os resíduos responsáveis pela especificidade dos agonistas inversos e dos agonistas pelo CB1. A maioria das interações intermoleculares envolve resíduos hidrofóbicos, e algumas ligações de hidrogênio intermoleculares destacando a importância da exploração das interações intermoleculares no desenvolvimento de novos agonistas inversos.

**Palavras Chave:** Receptor canabinoide, desenho de fármacos, docking, agonista inverso, proteína de membrana, GPCR.

## ABSTRACT

Cannabinoid Receptor 1 (CB1) is a membrane protein prevalent in the Central Nervous System (SNC), whose crystallographic structure has recently been solved. Studies will be needed to investigate CB1 complexes with its ligands and its role in the development of new drugs. Our goal here was to carry out computational simulations of CB1, with focus on its interactions with potential ligands. We start with a literature review, and then we describe recent studies on CB1 crystallographic structure. We report the development of a docking protocol to investigate potential ligands against CB1. We use this structural information to depict CB1-ligand interactions. We also describe the molecular docking method to obtain complex structures of CB1 with inverse agonists, and also with agonists. Analysis of the crystallographic structure and docking results revealed the residues responsible for the specificity of the inverse agonists and agonists for CB1. Most of the intermolecular interactions involve hydrophobic residues, and some intermolecular hydrogen bonds highlighting the importance of the exploration of intermolecular interactions in the development of novel inverse agonists.

**Keywords:** Cannabinoid receptor, drug design, docking, inverse agonist, membrane protein, GPCR.

# 1. INTRODUÇÃO

O Sistema Endocanabinoide (SEC) é estudado há relativamente pouco tempo. Compreende os Receptores Canabinoides (RCs), que são o Receptor Canabinoide 1 (CB1), prevalente no Sistema Nervoso Central (SNC), e o Receptor Canabinoide 2 (CB2), presente nas células imunes, os seus agonistas endógenos, ou endocanabinoides (ECs), suas enzimas sintetizadoras, e suas enzimas degradantes (ZOU; KUMAR, 2018). Estando representado majoritariamente no SNC, a importância do CB1, nos processos fisiológicos e patologias neurológicas, é evidente.

Recentemente, apareceu com destaque na imprensa, um caso de Insensibilidade Congênita à Dor (ICD) que vem a ser o primeiro relacionado ao SEC. Nos casos de ICD, o genoma costuma ser estudado, na esperança de se encontrar novos alvos terapêuticos para o tratamento da dor crônica. Os casos mais comuns desta patologia envolvem mutação gênica em SCN9A, causando alteração nos canais neuronais de sódio nos nociceptores (GOLDBERG, et al., 2007; LAMPERT, et al., 2010; NAHORSKI; CHEN; WOODS, 2015; ZHANG, et al., 2016). Já se sabia que polimorfismos comuns em uma enzima metabolizadora dos ECs, a Amida Hidrolase de Ácidos Graxos (FAAH), causavam diminuição na necessidade de analgésicos após cirurgias (CAJANUS, et al., 2016). Porém, esse novo caso de ICD (HABIB, et al., 2019), se tornou o primeiro a apresentar mutações envolvendo somente o SEC. A paciente descrita relatava ter apresentado, durante a vida, vários cortes e lesões que não causavam dor e que cicatrizavam muito rápido. Além disso, ela não necessitava de analgesia pós-operatória. Também nunca apresentou episódios de ansiedade ou pânico, mesmo em situações estressantes, nem episódios de depressão, mas apresentava alguma dificuldade de memória. A análise do seu genoma mostrou uma alteração relacionada à expressão diminuída da enzima que degrada o EC anandamida (N-araquidonoiletanolamina, AEA), tendo como consequência que os níveis séricos de AEA estavam muito elevados em relação aos níveis dos pacientes controles. Os pesquisadores concluíram que a ativação aumentada do CB1 por maiores quantidades de AEA seria a responsável pelo fenótipo de ausência de dor e ansiedade e diminuição da memória, efeitos também relatados na pesquisa e no uso recreacional de derivados canabinoides. Há um interesse no desenvolvimento de inibidores de FAAH, porém, ao serem levados a ensaios clínicos, tiveram a pesquisa suspensa devido ao aparecimento, nos voluntários, de sintomas neurológicos de moderados a graves, inclusive levando um deles à morte (KERBRAT, et al., 2016).

Por outro lado, aumentaram os relatos de primeiro episódio de psicose em jovens, relacionado ao uso da planta *Cannabis sativa*. Recentemente, um estudo

associou o maior aparecimento de crises de psicose à utilização de plantas *Cannabis sativa* com maior concentração de Tetrahydrocannabinol (THC). Uma concentração mais baixa de análogos de THC é usada clinicamente para tratamento de anorexia no câncer (BADOWSKI; YANFUL, 2018). Nesta nova pesquisa (DI FORTI, et al., 2019), que associou o primeiro episódio de psicose com a concentração de THC presente na planta e frequência de uso, observou-se que o primeiro episódio de psicose estava associado com uso diário e concentrações de THC maiores que 10%. Estes pacientes tinham até cinco vezes maior probabilidade de apresentar psicose do que não usuários. Os pesquisadores concluíram que o uso de *Cannabis sativa* com concentrações maiores de THC é mais prejudicial à saúde mental do que o uso das variedades com concentração de THC menor.

Seja pela antiguidade do uso medicinal da planta *Cannabis sativa*, sejam pelos seus efeitos recreacionais, o interesse pelos efeitos terapêuticos é uma preocupação comum. Nos casos descritos anteriormente, tanto se vê no SEC um alvo potencial para a produção de analgesia, bem como o potencial de abuso da planta causando doenças neurológicas graves em pessoas jovens. Sabe-se que existem polimorfismos que tornam os pacientes mais resistentes ao tratamento da dor com opioide, tendo analgesia inadequada, (LOKE, et al., 2019), e necessitando maiores doses desses fármacos, correndo o risco de óbitos por depressão respiratória. Os fármacos relacionados ao SEC não causam depressão respiratória porque atuam por mecanismos diferentes dos opioides. Além do potencial de dano, os opioides são os responsáveis por epidemia de abuso nos Estados Unidos e por um grande número de óbitos (SHIPTON, E. A.; SHIPTON, E. E.; SHIPTON, A. J., 2018). Esse é um dos motivos que incentiva a busca por novas modalidades de analgésicos.

Também o entendimento da importância do SEC como modulador da transmissão sináptica neuronal aponta um papel no tratamento de doenças neurodegenerativas, existindo pesquisa em relação ao papel do SEC na Doença de Alzheimer e na Doença de Parkinson (BASAVARAJAPPA, et al., 2017). Muitos mecanismos estão associados com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, entre eles, a excitotoxicidade e a neuroinflamação, que são comuns no SNC do idoso. As propriedades neuroprotetoras dos ECs em relação a esses mecanismos fazem deles substâncias ideais na pesquisa para tratamento de doenças neurodegenerativas (AYMERICH, 2018).

### **1.1. A Filogenia do Receptor Canabinoide 1**

O CB1 é filogeneticamente antigo, sendo que genes homólogos de CB1 são encontrados em outros animais (ELPHICK, 2012). O SEC é conservado entre os animais, tanto nos vertebrados quanto nos invertebrados, porém, não foi encontrado nos protozoários e insetos (MCPARTLAND, et al., 2001), e também não foi encontrado em plantas, fungos, protozoários, arqueas e bactérias. Ortólogos de CB1 são expressos em mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (MCPARTLAND, 2004), e foram aparecendo conforme a complexidade dos animais multicelulares aumentava, coincidindo com o desenvolvimento do sistema nervoso (SILVER, 2019), tendo sido encontrados na Hidra, um dos primeiros animais a apresentar um sistema nervoso. Neste animal, o SEC está relacionado com o controle da alimentação (DE PETROCELLIS, 1999). A evolução do SEC está relacionada a comunicação entre células (MCPARTLAND, et al., 2006).

O CB1 pode ter sofrido duplicação, dando origem a CB1 e CB2. O evento de duplicação deve ter acontecido antes da divergência entre vertebrados e invertebrados, porque o gene do CB1 têm ortólogos em ambos. Como o CB1 está presente em vertebrados e em metazoários muito primitivos, seu gene CB1 deve ter evoluído antes da divergência dos ancestrais desses organismos, o que aconteceu no mínimo há 600 milhões de anos (MCPARTLAND, 2004).

Os ligantes da *Cannabis sativa* causam interações moleculares em CB1 similares às causadas pelos ECs endógenos (DI MARZO; PISCITELLI, 2015).

## 1.2. GPCRs

O CB1 faz parte do grupo de proteínas chamado Receptores Acoplados a Proteína G (GPCR), sendo composto por 472 aminoácidos. Os GPCR foram identificados em 1986. Há mais de 800 membros desta família de proteínas no genoma humano, o que a torna a maior superfamília de receptores de membrana celular e também a maior família de proteínas em vertebrados (KOBILKA, 2007, DIXON, 1986), muito conservada e filogeneticamente antiga, estando presente em várias classes de organismos. O CB1 está expresso em vários tecidos, principalmente no SNC, tendo relevância em vários aspectos do seu funcionamento, e a alteração da sua função pode fazer parte da patogênese de várias doenças neurodegenerativas (HUANG; TODD; THATHIAH, 2017). Atualmente, se desenvolvem fármacos que visam os GPCR no SNC (WACKER; STEVENS; ROTH, 2017).

Os GPCRs são moléculas transmembranares (Figura 1) que respondem a várias categorias diferentes de ligantes, tais como peptídeos, íons, hormônios, fazendo transdução do sinal para o interior da célula (ZHANG; ZHAO; WU, 2015). Na parte intracelular acontece a continuação da mensagem através da

interação com Proteínas G e arrestinas (HAUSER, et al., 2018). Após o ligante interagir com o GPCR, ocorre o início de processo de ativação que depende de mudanças da sua estrutura tridimensional (EICHEL; VON ZASTROW, 2018).

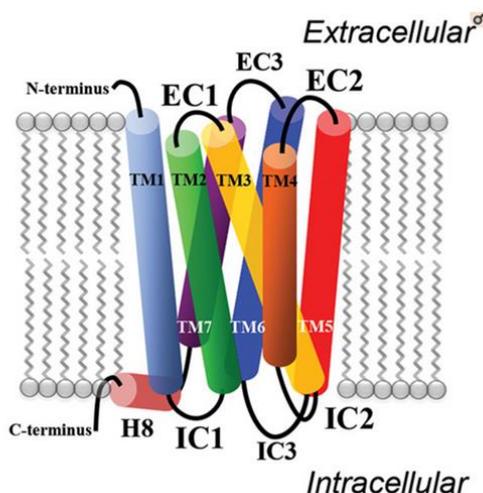


Figura 1. Estrutura esquemática de GPCR na membrana celular.

Fonte - MOBAREC, J.; FILIZOLA, M. Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n. 3, p. 343-355, 2008.

Há várias classificações dos GPCRs. Uma delas, bastante utilizada, é a de Fredriksson (FREDRIKSSON, et al., 2003), que classificou os GPCR de acordo com o sistema GRAFS, Glutamato, Rodopsina, Adesão, Frisado e Secretina. De um total de aproximadamente 800 GPCRs no genoma humano, cerca de 700 são classificadas como pertencentes ao grupo Rodopsina. Este grupo é subdividido em alfa, beta, gama e delta. Os RCs pertencem ao grupo alfa. Este grupo é subdividido em cinco outros grupos: os Receptores de Prostaglandina, os Receptores Aminérgicos, os Receptores de Opsina, os Receptores de Melatonina, e o grupo de Receptores MECA, que compreendem os Receptores de Melacortina, os GPCR de Diferenciação Endotelial, os Receptores Canabinoides, e os Receptores ligados a Adenosina. Também são incluídos neste grupo os receptores órfãos GPR3, GPR6 e GPR12.

### 1.3. Estrutura do Receptor Canabinoide 1

Os GPCRs apresentam sete hélices alfa hidrofóbicas, as quais se localizam empacotadas atravessando a membrana celular, formando um círculo (Figuras 1 e 2). Há uma oitava hélice alfa, que se encontra intracelularmente, perpendicular às outras sete. Unindo essas hélices, existem três alças

extracelulares e três alças intracelulares. No meio extracelular se encontra o terminal amina, que é o início da proteína, e no lado intracelular, há o terminal carboxila (OLIVELLA; CALTABIANO; CORDOMI, 2013). Na estrutura do CB1, as hélices transmembranares variam em comprimento de 25 a 35 resíduos e não se alinham perfeitamente perpendiculares à membrana.

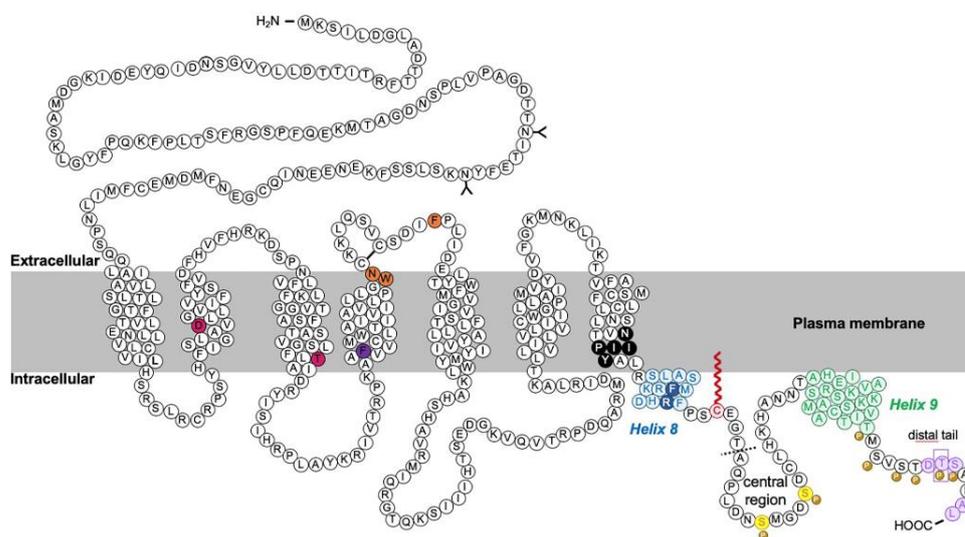


Figura 2. Estrutura do CB1.

Fonte - Fletcher-Jones, A. et al. Protein Interactors and Trafficking Pathways That Regulate the Cannabinoid Type 1 Receptor (CB1R). **Frontiers in Molecular Neuroscience**, 13, 2020. doi:10.3389/fnmol.2020.00108.

O bolsão de ligação se localiza em ambiente hidrofóbico entre estas hélices. A análise da estrutura do CB1 indica que o feixe de hélices transmembranares envolve as seguintes regiões- a hélice I vai da Pro 112 até a His 143, a hélice II, da Ser 152 até a Val 179, a hélice III, da Arg 186 até a Arg 220, a hélice IV, da Arg 230 até a Gly 254, a hélice V, da Lys 273 até a His 304, a hélice VI, do Asp 333 até a Ile 362, e a hélice VII, da Lys 373 até a Arg 400. Há uma hélice anfipática adicional localizada no terminal carboxílico, envolvendo os resíduos de Lys 402 até a Met 411, nomeada de hélice VIII. Essas hélices apresentam uma montagem na qual existem variações em seus ângulos e torções. A estrutura do CB1 mostra dobraduras na hélice IV (em Pro 231 e Pro 251) e na hélice VII (em Pro 358), que são devidas a presença de resíduos de prolina (HUA, et al., 2016). Além disso, a hélice III se dobra num par de resíduos de glicina, que são Gly 194 e Gly 195, permitindo que o oxigênio da cadeia principal de Thr 197 faça uma ligação de hidrogênio importante com a cadeia lateral do resíduo de Thr 201.

Em resumo, as dobraduras observadas no feixe de hélices transmembranares ajudam no empacotamento das hélices para mais perto uma da outra, fazendo, com isso, um bolsão de ligação que apresenta um volume de 424,3 Å<sup>3</sup>. Uma rede complexa de ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água liga as hélices na estrutura básica da Rodopsina (rho). A análise das ligações de hidrogênio mediadas por água entre as hélices revela uma ligação de hidrogênio entre Arg 214 e Gly 334, e uma ligação de hidrogênio envolvendo Tyr 224 e Asp 213 (HUA, et al., 2016).

O encaixe de um ligante no bolsão de ligação do receptor dá início a mudanças conformacionais que podem iniciar as vias de sinalização. Apesar da grande diversidade de estruturas químicas dos ligantes que ativam os GPCR, os mecanismos de ativação molecular dos GPCR são muito semelhantes, devido ao fato que vários aminoácidos são conservados nessa classe de receptores (KATRITCH, 2014). Esses resíduos conservados atuam como comutadores que, quando ativados pelo ligante, levam a mudanças na conformação tridimensional do receptor. São os seguintes:

Hélice 1 - NxLV

Hélice 2 - LxAD

Hélice 3 - D/ERY

Hélice 6 - FxxCWxP

Hélice 7 - NSxxNPxxY

Os estudos que evidenciaram a importância deste conjunto de resíduos na ativação dos GPCR usaram mutações dos aminoácidos em questão (AL-ZOUBI; MORALES; REGGIO, 2019).

#### **1.4. Distribuição do Receptor Canabinoide 1**

O CB1 se localiza primariamente no SNC, aonde é o GPCR mais prevalente. No cérebro, se encontra em maior quantidade no hipocampo, no bulbo olfatório, no cerebelo, e nos gânglios basais. Também é encontrado no tronco cerebral, hipotálamo, córtex cerebral e amígdala. Na medula espinhal se encontra no corno posterior. No Sistema Nervoso Periférico (SNP) está expresso em áreas relacionadas à dor, como terminais sensitivos e gânglio da raiz dorsal. No hipotálamo, está envolvido com o controle da temperatura e no balanço de energia. No cerebelo e gânglios basais, está associado ao controle do movimento. A pequena expressão do CB1 no tronco espinhal explica o porquê

do CB1 não estar associado a depressão respiratória, como ocorre no caso dos opioides (MACKIE, 2005).

#### **1.4.1. Localização do CB1 nos Neurônios**

O CB1 se localiza na sinapse, no neurônio pré-sináptico, de onde faz o controle da liberação de neurotransmissores retrogradamente. Quanto aos tipos diferentes de neurônios, o CB1 é encontrado, principalmente, nos neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos, e também nos neurônios colinérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos (BUSQUETS-GARCIA, et al., 2016).

Os neurônios GABAérgicos são os interneurônios responsáveis pelos estímulos inibitórios do cérebro, podendo chegar até 20% da população de neurônios. São de diversos subtipos, que vão prover inibição para estímulos e comportamentos dos mais variados tipos, regulando o excesso de atividade excitatória no cérebro, desta forma, diminuindo lesões por excitotoxicidade. Os ECs modulam os sinais inibitórios (SWANSON; MAFFEI, 2019).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro. Os ECs, nos neurônios glutamatérgicos, provêm neuroproteção, pois regulam a liberação da quantidade de glutamato que vai estar disponível para a ativação do Receptor Metabotrópico de Glutamato (RmGlu) e a ativação deste pode regular a síntese de ECs (OLMO; FERREIRA-VIEIRA; RIBEIRO, 2016).

Os neurônios dopaminérgicos se localizam em uma pequena área do tronco cerebral, de onde mandam conexões amplas para várias áreas do cérebro, e controlam comportamento complexos, tais como motivação e controle motor, estando envolvidos em patologias como Doença de Parkinson e adição à drogas. Os ECs modulam a sua influência (COVEY, et al., 2017).

Os neurônios colinérgicos estão envolvidos no controle do aprendizado associativo e do comportamento social. Também recebem modulação dos ECs (NYÍRI, et al., 2005; AHMED; KNOWLES; DEHORTER, 2019).

Os neurônios noradrenérgicos estão localizados no *locus ceruleus* e mandam projeções para o córtex, para o cerebelo e para a amígdala, aonde estão associados com respostas de stress tipo "luta e fuga" e memórias de medo (RHO; KIM; LEE, 2018). Os ECs modulam o eixo do stress (WYROFSKY, et al., 2019).

Apesar de estarem presentes no cérebro em menores quantidades, os neurônios serotoninérgicos são os que se encontram mais amplamente distribuídos, e envolvidos em várias funções, como ansiedade, aprendizado,

agressão e recompensa (REN, et al., 2019). Os ECs regulam funções também moduladas pelo sistema serotoninérgico, tais como temperatura, processos emocionais, stress e sono (HAJ-DAHMANE; SHEN, 2011).

#### 1.4.2. Localização do CB1 em Células Não Neuronais ou Organelas Intracelulares

No cérebro, CB1 foi encontrado em micróglia e astrócitos. Além de sua localização mais conhecida na membrana plasmática, CB1 também se localiza na membrana da mitocôndria e dos lisossomas. A internalização de CB1 em endossomas é uma forma de término da sinalização mediada por arrestinas (BRAILOIU, et al., 2011). Nas mitocôndrias, o CB1 está relacionado com a respiração celular e, nos lisossomas, participa do aumento de cálcio intracelular após a ativação (BENARD, et al., 2012).

#### 1.4.3. Localização do CB1 no Corpo

Encontramos o CB1 também no tecido adiposo, no trato gastrointestinal, fígado, testículos, osso, pele, músculo e vasos sanguíneos (BUSQUETS-GARCIA, et al., 2016) (Figura 3).

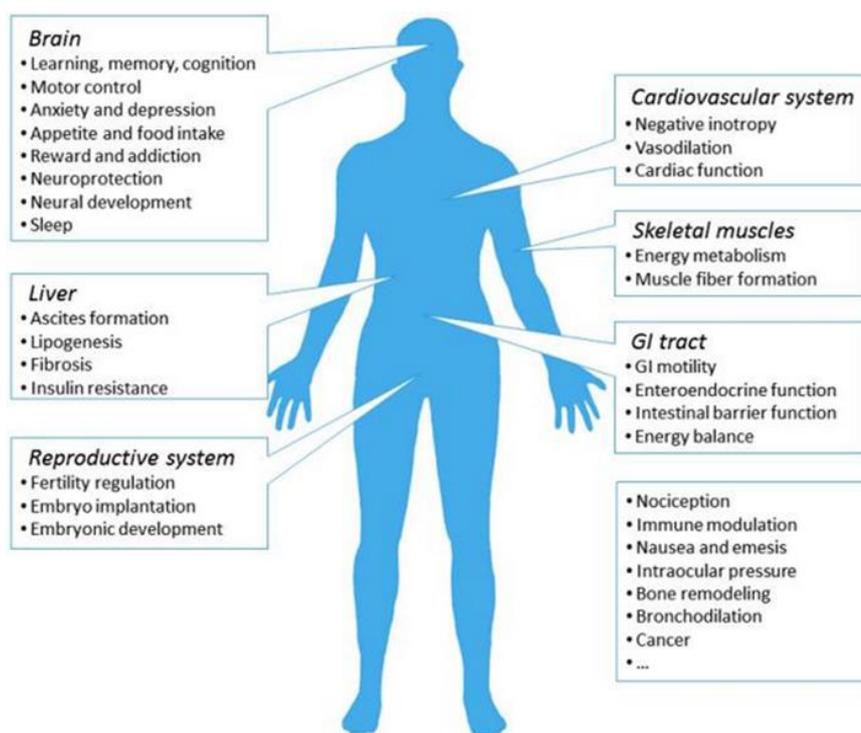


Figura 3. Distribuição do CB1 no Corpo Humano.

Fonte - ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n. 3, p. 833, 2018.

## **1.5. Ligantes Canabinoides**

### **1.5.1. Fitocannabinoides**

Existem textos de 5000 anos relatando o uso da planta *Cannabis sativa* como medicamento ou droga de abuso. Desde então, cerca de 500 compostos foram identificados na planta, sendo que 105 classificados como fitocannabinoides, incluindo compostos como canabidiol, canabigerol, canabinol e canabidivarin, ácido  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinólico e ácido cannabidiólico. Os efeitos psicotrópicos são causados pela molécula do THC. A avaliação farmacológica destas substâncias ainda está no início (PERTWEE, 2006).

O primeiro fitocannabinóide a ser isolado foi canabinol, no final do século 19, e o segundo foi o canabidiol (CBD), nos anos 40, no laboratório de Adams, enquanto THC foi extraído pela primeira vez em 1942, por Wollner, Matchett, Levine e Loewe. Tanto THC como CBD estão presentes na *Cannabis sativa*, principalmente como ácidos que são descarboxilados com o aquecimento. As estruturas estereoquímicas do CBD e THC foram elucidadas no laboratório de Raphael Mechoulam em 1963, no caso do CBD e em 1964, para THC. Foi neste mesmo laboratório, em 1965, que THC e CBD foram sintetizados pela primeira vez (PERTWEE, 2006).

Experimentos farmacológicos com fitocannabinoides foram inicialmente realizados em 1940 e 1950s, quando se percebeu que THC, mas não CBD, induzia catalepsia, excitação central e arreflexia corneal (LOEWE, 1946). Estas foram as primeiras indicações de que THC tem atividade psicotrópica, e que CBD não apresenta esta atividade. Nos anos de 1960 e 1970, a pesquisa se multiplicou, em resposta ao aumento do uso da *Cannabis sativa* como droga recreacional nos países ocidentais. Os experimentos se concentravam na hipótese de que os efeitos psicotrópicos da *Cannabis sativa* eram atribuíveis ao THC e à sua habilidade de melhorar o humor ou causar disforia, além de precipitar sintomas como ansiedade, pânico ou paranoia (PERTWEE, 2006).

### **1.5.2. Ligantes Canabinoides Endógenos**

Os ECs são classificados em ésteres e amidas. O primeiro EC a ser identificado foi AEA em 1992, e é um agonista parcial tanto do receptor CB1 quanto do CB2. Um segundo EC, 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que é um agonista parcial do CB1, foi identificado logo após, e os dois têm afinidade menor ao CB1 do que aos ligantes sintéticos (HOURANI; ALEXANDER, 2018). Foram

descobertos outros compostos presentes em tecidos de mamíferos e que apresentam atividade junto ao CB1, mas há pouca pesquisa em relação a estas moléculas. Os mais conhecidos são o éter glicerol 2-araquidonoil, ou noladina, a dopamina N-araquidonoil (NADA), e a etanolamina o-araquidonoil, também denominada virodamina. (PERTWEE, 2015; DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2009).

O grupo que descobriu AEA e 2-AG, no ano 2000, isolou uma nova molécula EC no cérebro de alguns mamíferos, a qual recebeu o nome de noladina, que mostrou ser agonista do CB1 e provocar efeitos comportamentais no teste tétrade, causando hipotermia, imobilidade, catalepsia e analgesia em ratos, e tendo pequeno efeito em CB2 (HANUS, et al., 2001). Mais tarde se evidenciou seu efeito na promoção de hiperfagia em ratos, à semelhança de outros agonistas CB1 (JONES; KIRKHAM, 2012).

A Dopamina N-araquidonoil (NADA) é uma substância endógena semelhante a capsaïcina e foi encontrada em SNC de mamíferos, principalmente no estriado, cerebelo e hipocampo; é um agonista CB1, inibe a enzima FAAH, e também tem efeito semelhante ao da capsaïcina nos receptores vaniloides (BISOGLNO, et al., 2000; HUANG, et al., 2002).

A Virodamina foi encontrada no cérebro de ratos e humanos em quantidade semelhante à AEA. Tem atividade antagonista em CB1 e agonista em CB2 (PORTER, et al., 2002), recruta beta-arrestina 2, e age como agonista parcial em GPR55 (SHARIR, et al., 2012). Também inibe a enzima Monoamina Oxidase B, podendo ter papel no tratamento de doenças neurológicas (PANDEY, et al., 2018).

### **1.5.3. Canabinoides Sintéticos**

Os fármacos sintéticos canabinoides se originam de grupos químicos muito diferentes. Eles são os aminoalquilindóis, ou compostos JWH, sintetizados pelo grupo de pesquisa de John W. Huffman. Este grupo sintetizou mais de 450 canabinoides, dos quais o mais conhecido e estudado é JWH-018, a partir do WIN-55212-2, na Universidade Clemson, nos anos 1980. Este projeto foi abandonado por Sterling-Winthrop, ao se descobrir os efeitos canabinoides; os compostos CP, que são uma série de ciclohexifenóis sintetizados pela Pfizer nos anos 1970s, sendo o composto mais conhecido CP-47497 e sua versão CP-47497-C8; os compostos HU, como o HU-210, sintetizados nos anos 1960s na Hebrew University, por Raphael Mechoulam, que possuem estrutura semelhante ao THC e, por isso, são também chamados de “clássicos” ou dibenzopiranos; e os compostos benzoilindoles, tais como AM-694, sintetizados pelo laboratório de Alexandros Makriyannis na Northeastern University. Todos estes compostos têm

afinidade com os receptores CB1 e CB2, são solúveis em lipídios e não-polares, e têm de 22 a 26 átomos de carbono (FATTORE; FRATTA, 2011). A maioria é usada em pesquisa.

O entusiasmo com a descoberta e a subsequente publicação dos passos de síntese química dos novos canabinoides levou à fabricação e venda para uso ilegal dessas substâncias, uns 30 anos depois. Apesar da escolha do mercado clandestino ser por substâncias intoxicantes, mas com pouco potencial danoso, estima-se que apenas 10% dos compostos sintetizados tenham sido estudados, em experimentos farmacológicos. A família mais numerosa e pouco estudada é a dos compostos JWH, com 450 representantes. Apesar de sua estrutura química ser totalmente diferente da estrutura do THC, eles apresentam uma afinidade maior em relação aos receptores CB1 e CB2 (FATTORE; FRATTA, 2011). Por exemplo, o composto mais usado ilegalmente é o JWH-018, que foi sintetizado na intenção de que apresentasse efeitos semelhantes ao THC. Estudos *in vivo* mostraram que JWH-018 produz analgesia, catalepsia, hipomobilidade, e hipotermia, a tríade de comportamentos que ocorre com a administração de agonistas canabinoides. Comparado a THC, JWH-018 tem quatro vezes maior afinidade a CB1 e 10 vezes maior afinidade a CB2 (WILEY; MARUSICH; HUFFMAN, 2014).

Os primeiros agonistas exibiam pouca seletividade em relação aos receptores CB1 e CB2. Recentemente, já existem agonistas com boa seletividade, por exemplo, a metanandamida em relação ao CB1 e o JWH133 em relação ao CB2 (Figura 4). O papel dos CB1 ou dos CB2 pode ser evidenciado pelo uso dos agonistas mais específicos. A metanandamida tem ocupação maior que 80% no CB1 a 100 nM, e menos de 10% ocupação nos CB2, mostrando a utilidade de alguns ligantes para ativação seletiva dos CB1. Do mesmo modo, em relação aos CB2, concentrações de 100 nM do JWH133, do JWH015 ou do HU308 trazem ocupação substancial, maior que 80%, dos CB2 (HOURANI; ALEXANDER, 2018).

Nos anos 1990, antagonistas seletivos tanto para os CB1 quanto para os CB2, foram desenvolvidos por Sanofi na França. O rimonabanto (SR141716A) e o SR144528 são antagonistas seletivos do CB1 e do CB2, respectivamente, e também são chamados de agonistas inversos, por ter efeito contrário aos agonistas (JANERO, et al., 2011) (Figura 5). Também são usados, em pesquisa, os antagonistas/agonistas inversos AM251 e AM630, para definir a seletividade ao CB1 ou ao CB2, respectivamente. Os antagonistas clássicos são inertes, e agem bloqueando os efeitos dos agonistas, então, qualquer efeito dos antagonistas é dependente dos efeitos dos agonistas. Em comparação, os agonistas inversos são efetivos na ausência de agonistas, e agem estabilizando

uma forma mais inerte do receptor do que a forma ativa que se observa presente constitucionalmente (HOURANI; ALEXANDER, 2018).

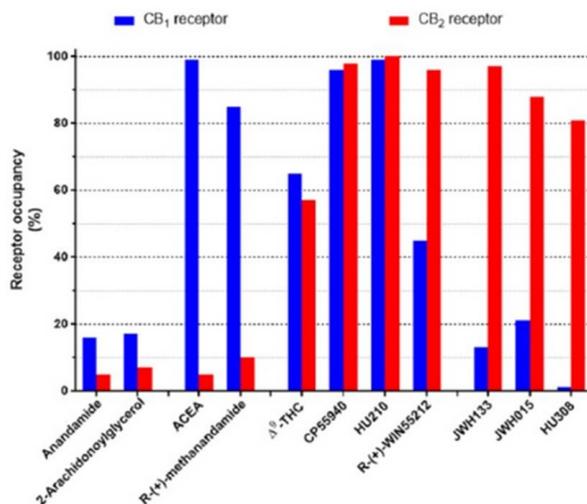


Figura 4. Seletividade dos agonistas canabinoides.

Fonte - HOURANI, W.; ALEXANDER, S. Cannabinoid ligands, receptors and enzymes: Pharmacological tools and therapeutic potential. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, 2398212818783908, 2018.

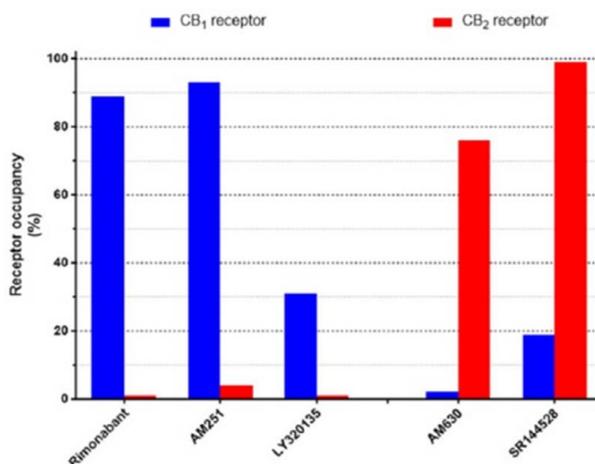


Figura 5. Seletividade dos antagonistas canabinoides.

Fonte - HOURANI, W.; ALEXANDER, S. Cannabinoid ligands, receptors and enzymes: Pharmacological tools and therapeutic potential. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, 2398212818783908, 2018.

## 1.6. Sistema Endocanabinoide

O SEC é composto pelos ligantes ECs, pelas enzimas que os sintetizam e que os degradam, pelos RCS, e pelos receptores órfãos com ação canabinoide. Uma visão geral do sistema está na Figura 6. Os ECs são sintetizados por mais de uma via bioquímica, a partir de fosfolipídeos abundantes na membrana celular (SIMON; COTA, 2017). A partir da descoberta dos RCs, postulou-se a existência de moléculas endógenas que agissem sobre esses receptores. As mais conhecidas são AEA, e 2AG.

A via mais estudada de 2-AG é aquela em que é sintetizado a partir de 2-araquidonoilfosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, que é hidrolisado pela enzima Fosfolipase C e é, então, deacilado pela enzima Diacilglicerol Lipase (DAGL) até o composto 2-AG. A via degradativa mais comum de 2-AG é sua hidrólise até ácido araquidônico (AA) e glicerol, por 4 enzimas, sendo a enzima Monoacilglicerol Lipase (MAGL) a responsável pela maior parte da degradação (85%), e, em menor proporção, as enzimas  $\alpha\beta$  hidrolase 6 (ABHD6) (4%),  $\alpha\beta$  hidrolase 12 (ABHD12) (9%) e FAAH (2%) até glicerol e AA (TSUBOI, et al., 2018). A via sintetizadora mais comum do AEA se dá pela acilação de fosfatidiletanolamina, pela enzima N-aciltransferase, em N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE), que é hidrolisado pela enzima NAPE-fosfolipase D (NAPE-PLD), até AEA. Na sua via degradativa, AEA é hidrolisado pela enzima FAAH até AA e etanolamina (TSUBOI, et al., 2018).

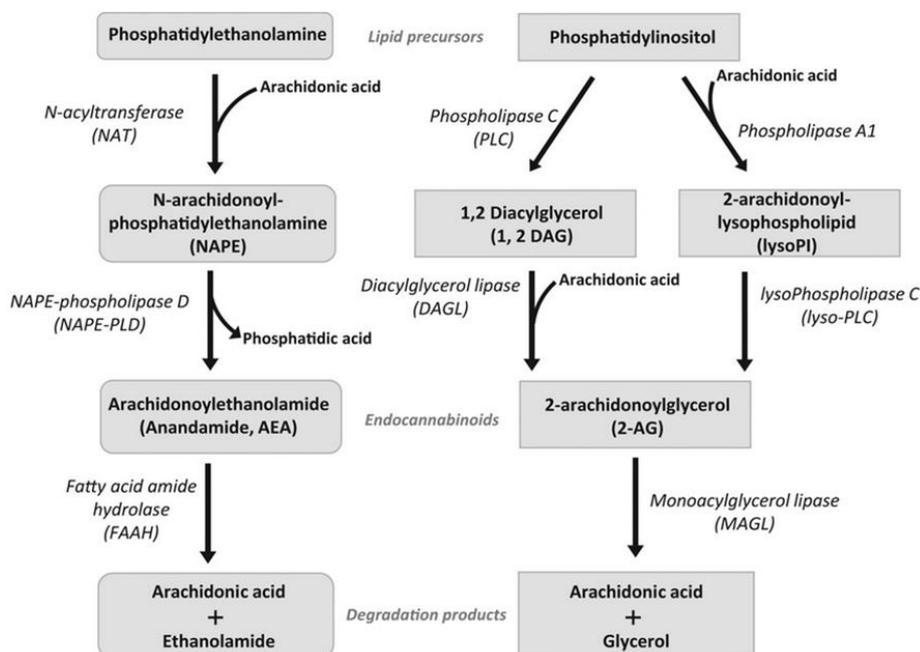


Figura 6. Síntese, Hidrólise e Transformação dos Endocanabinoides.

Fonte - SIMON, V.; COTA, D. Mechanisms in endocrinology: Endocannabinoids and metabolism: past, present and future. **European Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 6, R309–R324, 2017.

### **1.6.1. Receptores Órfãos**

O GPR18 e o GPR55 respondem a substâncias canabinoides. O GPR18 é associado ao SEC, apesar de sua pequena identidade com os RCs (MCHUGH, 2012), tendo como agonistas THC, AEA e araquidonoilciclopropilamida, e sendo expresso, preferencialmente, no hipotálamo, cerebelo, tronco cerebral, tireoide e testículos. Também está presente na micróglia. O GPR55 é altamente expresso no cérebro, tendo ação na coordenação do movimento, dor e gasto de energia. O lisofosfatidilinositol é o provável agonista endógeno do GPR55. Tem pouca identidade com CB1 (13%) (MORALES; REGGIO, 2017).

Os receptores órfãos GPR3, GPR6 e GPR12 também pertencem à classe A da família dos GPCR, e são filogeneticamente próximos aos RCs, apresentando com estes resíduos e motivos conservados (FREDRIKSSON, 2005). Eles são expressos no cérebro e estão envolvidos em vários processos neurológicos, como formação de contatos sinápticos. São estudados nas doenças degenerativas cerebrais. Não foram encontrados os ligantes endógenos para estes receptores, mas sabe-se que o CBD é agonista inverso de GPR3 e GPR6 (LAUN, et al., 2019). Outros receptores órfãos ou receptores cujos ligantes foram recentemente descobertos, e os quais possuem ligantes que são lipídicos, tais como GPR23, GPR35, GPR40, GPR41, GPR 43, GPR84, GPR92, GPR119, GPR120, e devido a sua proximidade aos RCs em relação a filogenia, tiveram, em algum momento, aberta a possibilidade de serem possíveis RCs, mas, até hoje, tal associação não pode ser confirmada (MORALES; REGGIO, 2017).

### **1.7. O Processo de Ativação dos GPCR**

O processo de ativação começa com a entrada do ligante no bolsão de ligação. Geralmente o ligante entra na proteína através da abertura do bolsão de ligação localizada no meio extracelular. Nos GPCRs com ligantes lipídicos hidrofóbicos, como o CB1 (Figura 7), o terminal amina se enovela e obstrui a entrada do ligante através do meio extracelular, e os ligantes lipídicos vão entrar no bolsão de ligação através de uma abertura entre as alças transmembranares 1 e 7, através da membrana celular (JAKOWIECKI, et al., 2020). Alguns ligantes endógenos lipídicos, como a AEA, são produzidos pela membrana e metabolizados, quando não são mais necessários, também por enzimas

presentes na membrana. Por esse motivo esses ligantes sinalizam rapidamente (JAKOWIECKI; FILIPEK, 2016). Essa via de entrada é mais improvável para ligantes maiores e mais hidrofílicos, como alguns agonistas inversos, para os quais ainda é possível a entrada através da porção extracelular entre as alças transmembranares 1 e 7.

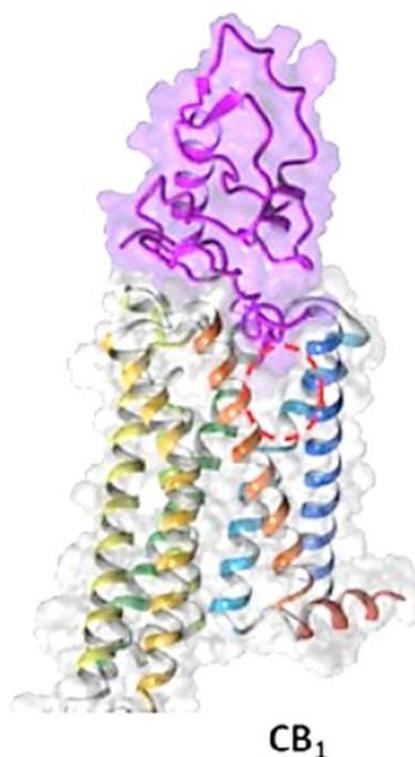


Figura 7. CB<sub>1</sub>, em roxo o terminal amina obstruindo a entrada do CB<sub>1</sub>, em oval pontilhado vermelho a entrada dos ligantes lipídicos entre as hélices transmembranares 1 e 7.

Fonte - JAKOWIECKI, J. et al. The Hydrophobic Ligands Entry and Exit from the GPCR Binding Site-SMD and SuMD Simulations. **Molecules** (Basel, Switzerland), 25(8), 1930, 2020.

O processo de ativação é uma passagem do estado inativo para o ativo, iniciado pela interação do ligante com o bolsão de ligação da proteína, aonde acontecem mudanças nas interações entre as hélices transmembranares, que se iniciam com a eliminação entre os contatos entre as alças 3 e 6, formação de contatos entre as alças 3 e 7 e um empacotamento das hélices 5 e 6, que vão iniciar um movimento de abertura da parte citoplasmática da hélice 6, e um movimento da hélice 7 em direção à hélice 3 (VENKATAKRISHNAN, et al.,

2016), criando um espaço aonde a Proteína G vai se acomodar (Figura 8) (ZHOU et al., 2019).

Os estudos com mutação de aminoácidos mostram quais os segmentos do GPCR são importantes no processo de ativação. As hélices transmembranares hidrofóbicas dos GPCRs são mantidas nas suas posições através de ligações não covalentes. Um ligante que cause um distúrbio nessas ligações estáveis poderá causar uma alteração conformacional, podendo levar à ativação do GPCR. Essas ligações estáveis que necessitam serem desfeitas para levar à ativação do GPCR são chamadas de interruptores moleculares. Cada GPCR possui um número variado destes, que são trechos conservados de resíduos de aminoácidos nessa classe de proteínas (DEUPI; KOBILKA, 2007). Analisando 234 estruturas de GPCR, Zhou identificou uma via comum de ativação dos GPCRs com vários resíduos importantes, compreendendo os resíduos-chave CWxP, DRY, e NPxxY (Figura 8). Os resíduos que conectam o bolsão de ligação com a região de interação com a Proteína G são altamente conservados (ZHOU et al., 2019). A análise da ativação dos GPCRs revelou que a via de ativação se inicia no fundo do bolsão de ligação e converge nas proximidades do local de interação com a Proteína G (VENKATAKRISHNAN, et al., 2016).

O mais conhecido passo da via de ativação é o movimento para fora, na porção citoplasmática, da hélice transmembranar 6. A ativação necessita de reorganização dos contatos entre os resíduos. A via de ativação compreende vários pares de resíduos, com reconfiguração dos contatos entre eles após a ativação, conectando resíduos conservados, porém espacialmente distantes, desde a parte extracelular, aonde o ligante se localiza, até a parte intracelular aonde a Proteína G se liga (Figura 9). Há uma contração entre as hélices 3-5-6, que se reorganizam e iniciam a rotação da porção citoplasmática da hélice 6 e iniciam o movimento da hélice 7 em direção à 3. A trava hidrofóbica se abre. Essa trava contém os resíduos aromáticos Leu 207, Ile 348 e Leu 349, que vão trocar suas interações por outras na hélice 5. Em seguida, o resíduo Tyr 397 perde suas interações prévias nas hélices 1 e 8 e vai formar novas interações na hélice 3, afrouxando os contatos da hélice 3 com a 6, e aumentando os contatos das hélices 3 e 7. No final da ativação, o resíduo Arg 214, do motivo DRY, é liberado de suas interações prévias e colabora na movimentação externa da alça na porção citoplasmática, tornando o GPCR pronto para a ligação com a proteína G (Figura 10) (ZHOU et al., 2019).

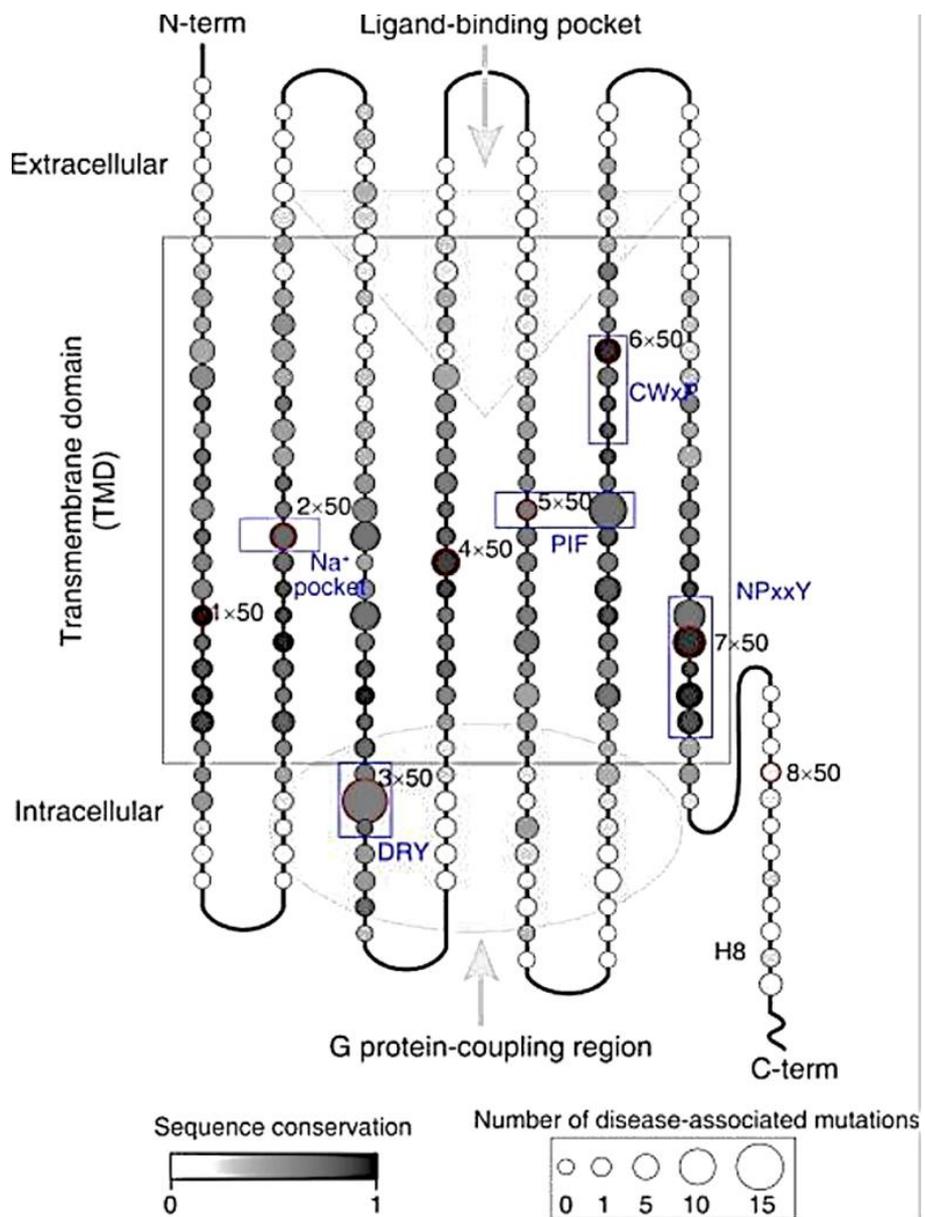


Figura 8. O padrão de resíduos conservados de CB1.

Fonte - Zhou, Q. et al. Common activation mechanism of class A GPCRs. *eLife*, 8, e50279, 2019.

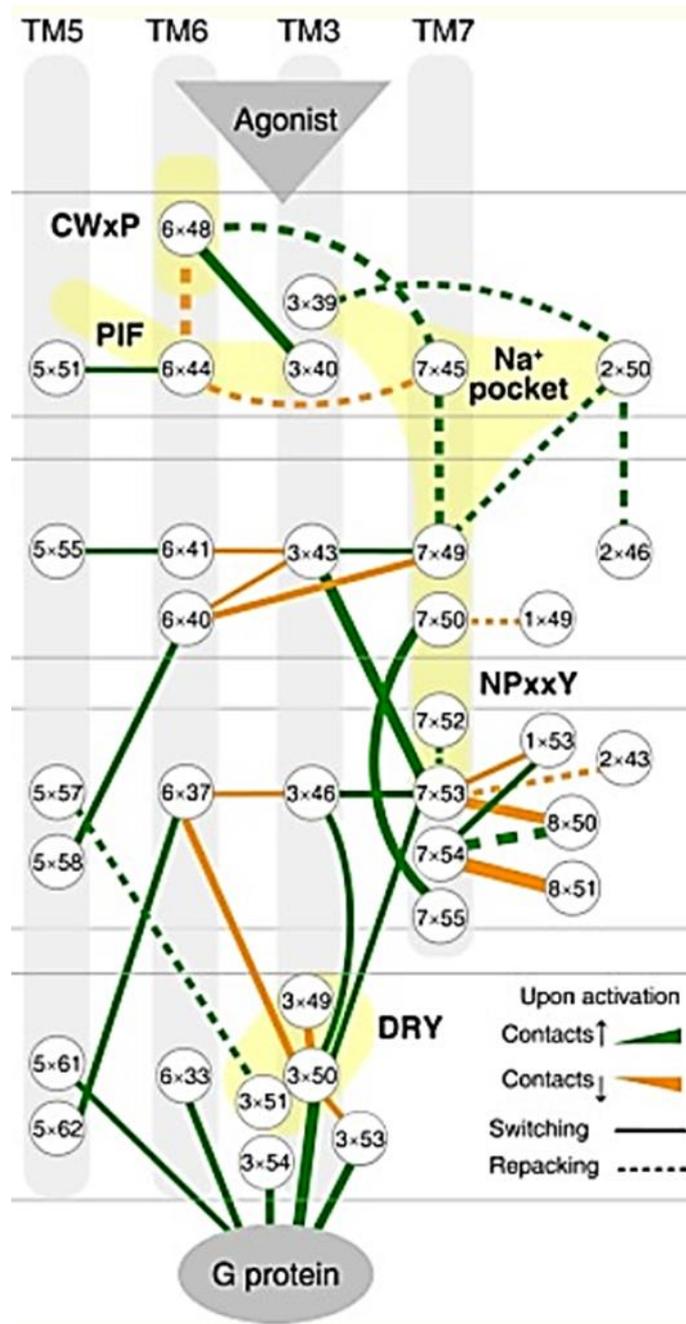


Figura 9. A via de ativação das GPCR.

Fonte - ZHOU, Q. et al. Common activation mechanism of class A GPCRs. *eLife*, 8, e50279, 2019.

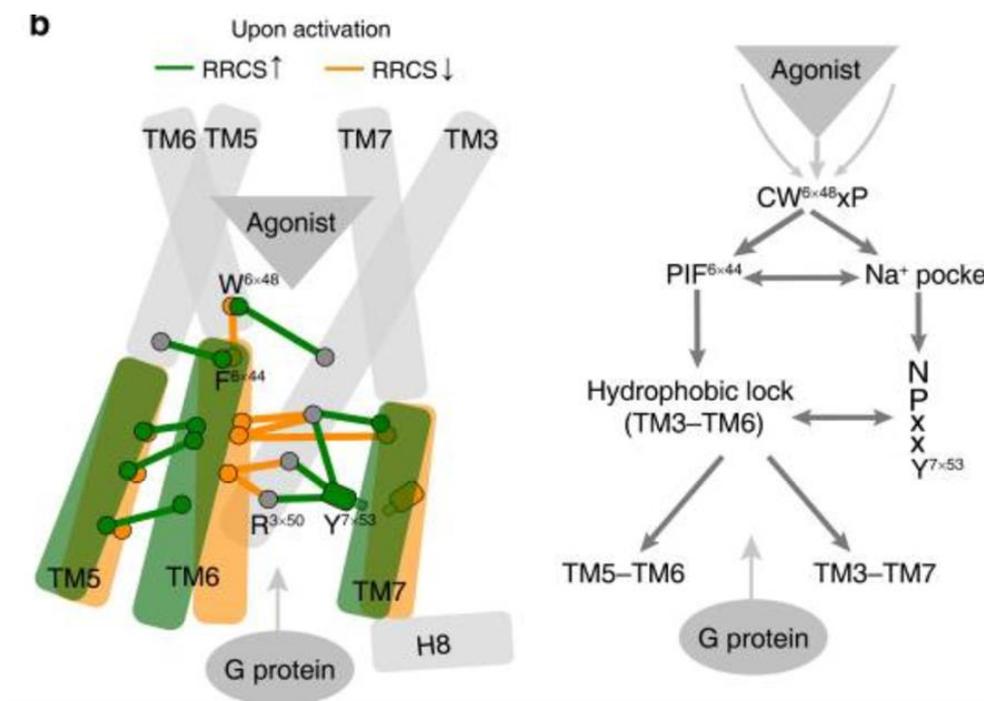


Figura 10. Mudanças conformacionais dos GPCR após ativação.

Fonte - ZHOU, Q. et al. Common activation mechanism of class A GPCRs. *eLife*, 8, e50279, 2019.

Há quatro interruptores moleculares comuns na ativação dos GPCRs- dois são relacionados a movimentação da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos- o interruptor do Trp 356, no motivo conservado CWxP na hélice transmembranar 6, que é seguido por movimentos em aminoácidos vizinhos, e o interruptor da Tyr 397, no motivo NPxxY na hélice transmembranar 7. Os outros dois são relacionados a quebras de interações que aproximam as hélices transmembranares entre si, a trava iônica entre as hélices transmembranares 3 e 6, e a trava entre as hélices transmembranares 3 e 7 (FILIPEK, 2019).

Além dos quatro interruptores comumente presentes nos GPCRs, no CB1 há um interruptor molecular extra, entre os resíduos Phe 200 e Trp 356, formando um interruptor duplo (Figura 11). As simulações usando dinâmica molecular mostram o movimento do interruptor medido em nanossegundos, sugerindo que o CB1 pode ser ativado espontaneamente sem a presença de ligantes, talvez mostrando o mecanismo molecular da sua atividade constitutiva (LATEK, et al., 2011).

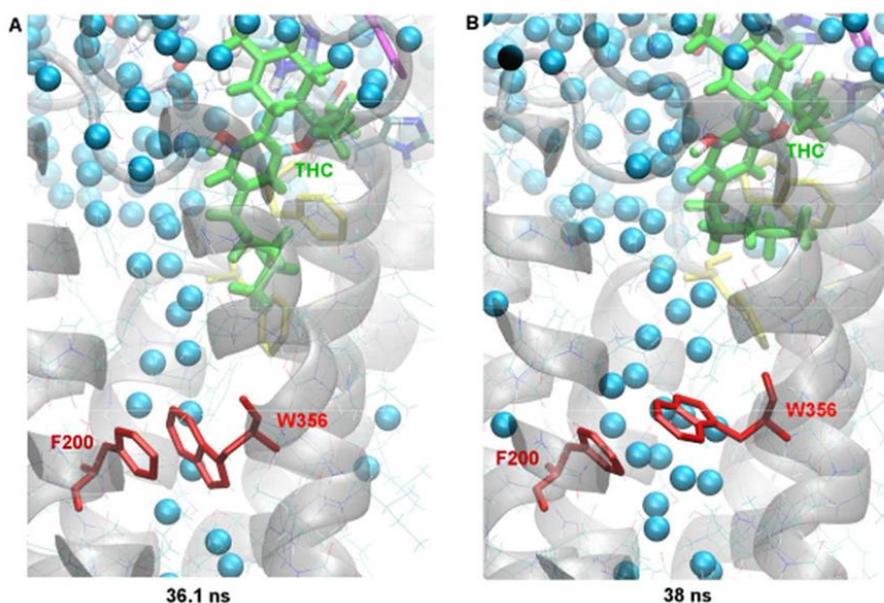


Figura 11. Interruptor de CB1, Phe 200 e Trp 356, CB1 inativo à esquerda, ativo à direita. A cadeia lateral do resíduo de triptofano gira para posição mais distante.

Fonte – JAKOWIECKI; FILIPEK. Hydrophobic Ligand Entry and Exit Pathways of the CB1 Cannabinoid Receptor. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 12, p. 2457–2466, 2016.

As torções são partes funcionais das hélices alfa. Nos GPCR, as torções das hélices transmembranares têm funções específicas. Alguns resíduos de aminoácidos são associados às torções, sendo prolina o resíduo mais comumente encontrado na posição após a torção (Figura 12). Especula-se que a causa seja a falta do átomo de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio na prolina. Nas hélices, este átomo de hidrogênio costuma fazer parte de uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da carboxila na base da hélice, no quarto resíduo anterior. Em vários GPCR, prolina não está presente na torção. Nesses casos, se imagina que a prolina estava originalmente presente, causando a torção na hélice, e depois sofrendo uma mutação para outro resíduo, porém a torção continuou sendo mantida pelas ligações intermoleculares com os resíduos circundantes. A torção que se mantém conservada num grupo de proteínas provavelmente tem importância funcional, servindo para criar uma região com flexibilidade. Nos GPCR, as torções nas hélices transmembranares 6 e 7 são conservadas e têm os maiores ângulos. As hélices transmembranares 1 e 3 são retas, e as hélices 2, 4 e 5 têm torções não conservadas. Na hélice 6, o ângulo tem  $40^\circ$  na posição 47 e, na hélice 7, esse ângulo tem  $8^\circ$  na posição 34. O movimento da hélice 6 é o mais importante no processo de mudanças

conformacionais dos GPCRs que acontecem na cascata de ativação da proteína após a interação com o ligante (LAW, et al., 2016).

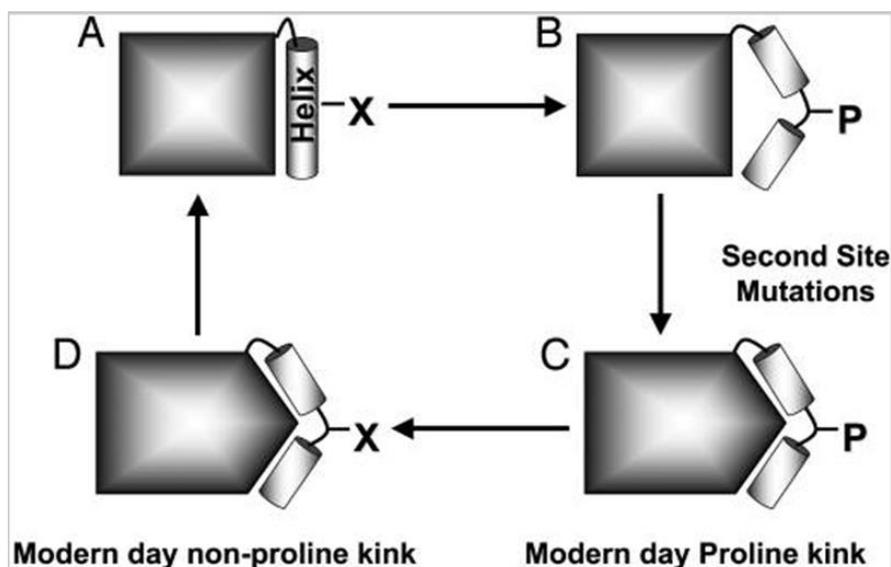


Figura 12. Torções na hélice, inicialmente causadas por prolina, se mantêm, com as mutações circundantes e suas interações moleculares, quando o resíduo de prolina sofre mutação.

Fonte - YOHANNAN, S. et al. The evolution of transmembrane helix kinks and the structural diversity of G protein-coupled receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 4, p. 959–963, 2004.

### 1.8. Atividade Constitutiva

A maioria dos GPCR não apresentam atividade basal constitutiva, e poucos, como os CB1s, apresentam alta atividade constitutiva. É possível que a atividade constitutiva reflita algum grau maior de flexibilidade do receptor, e, portanto, uma tendência à existência de várias conformações, pois, apesar da crença que as proteínas são estruturas rígidas, elas possuem flexibilidade conformacional. Isso pode refletir um estado que necessite de menor quantidade de energia para passar de um estado inativo a outro ativo, tendo facilidade na troca de interações moleculares entre as hélices do receptor, e que possa adotar uma conformação do tipo ativado mesmo na ausência de ligante, o que caracteriza a atividade constitutiva (DEUPI; KOBILKA, 2007). Essa atividade basal pode ser aumentada ou diminuída pelos diversos tipos de ligantes, sendo que estes causam diferentes níveis de atividade do GPCR, variando de totalmente ativo até totalmente inativo, levando a múltiplas conformações

estruturais diferentes do receptor. Então, cada ligante induz uma conformação diferente e única que vai ser característica da ativação por esse ligante específico, e que vai ser continuado por uma posterior via de sinalização específica (WACKER; STEVENS; ROTH, 2017).

### **1.9. Sinalização do Receptor Canabinoide 1**

Após a ativação, o CB1 sofre mudança conformacional e se liga a proteínas G heterotriméricas (com subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) da classe i/o. O CB1 ativado, então, causa alteração conformacional na subunidade  $G\alpha$ , que troca a molécula de GDP por GTP, levando à dissociação da subunidade  $G\alpha$  do dímero  $G\beta\gamma$  (ZOU; KUMAR, 2018). O dímero  $G\beta\gamma$  vai inibir os canais de Cálcio do tipo N, dificultando a fusão das vesículas que contêm neurotransmissores à membrana pré-sináptica e sua posterior liberação na fenda sináptica, e estimular os canais de Potássio do tipo GIRK, causando uma hiperpolarização do neurônio pré-sináptico, o que vai levar a uma diminuição da atividade neuronal. Estando livre, a subunidade  $G\alpha$  pode inativar a enzima Adenilciclase, com consequente inibição da formação de AMP cíclico. Essa queda na produção de AMP cíclico vai causar uma diminuição na fosforilação da enzima Proteína Quinase A (PKA), ocasionando mudanças na atividade celular. A PKA é importante na expressão gênica e fosforilação de proteínas (DEMUTH; MOLLEMAN, 2006). A Figura 13 traz uma visão geral desse processo de sinalização.

O CB1 induz MAP Quinase (MAPK) por mecanismos desconhecidos. Esta via é importante no crescimento celular e apoptose. MAPK pode fosforilar vários tipos de proteínas tanto no citoplasma quanto no núcleo, e pode induzir a expressão de genes relacionados a plasticidade neuronal como BDNF (DEMUTH; MOLLEMAN, 2006). O dímero  $G\beta\gamma$  vai ativar a cascata de MAPK, que vai levar a expressão de genes envolvidos com sobrevivência e diferenciação celular e plasticidade sináptica (FLETCHER-JONES, et al., 2020). Dependendo do tecido e dos diferentes tipos de agonistas, CB1 também pode se ligar a proteínas G do tipo  $G_s$ ,  $G_q$  e  $G_{12/13}$  (TURU; HUNYADY, 2009).

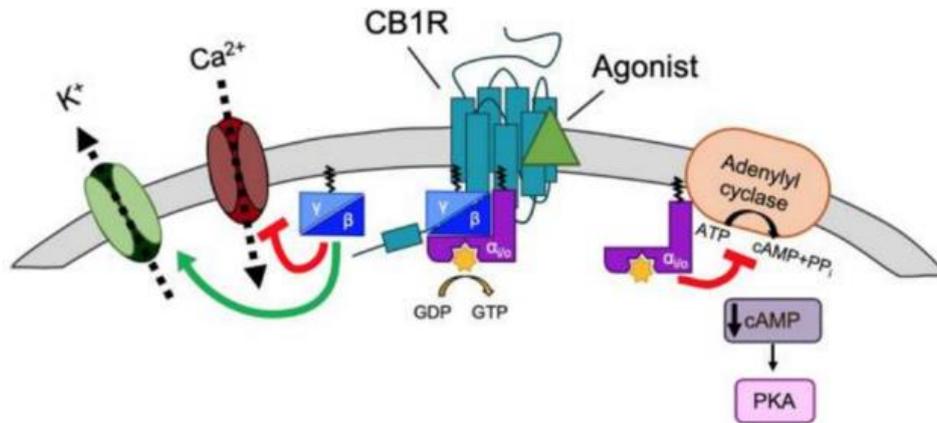


Figura 13. Sinalização de CB1.

Fonte - FLETCHER-JONES, et al. Protein Interactors and Trafficking Pathways That Regulate the Cannabinoid Type 1 Receptor (CB1R). **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, p. 108, 2020.

### 1.10. Proteínas G e Arrestinas

A ativação dos GPCRs vai dar início a várias respostas fisiológicas. A sinalização é bem diversificada, pois os GPCRs podem se acoplar a múltiplas Proteínas G, que é a ativação clássica, ou independentemente das Proteínas G, principalmente às proteínas arrestinas. As diferentes subclasses de Proteínas G sinalizam através de vias de sinalização distintas, envolvendo segundo mensageiros como AMP cíclico, inositol trifosfato e cálcio (DEFEA, 2008). As Proteínas G são proteínas heterotriméricas compostas pelas subunidades alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), e gama ( $\gamma$ ). As subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  são consideradas um dímero, pois se mantêm associadas durante a sinalização. A subunidade  $\alpha$  das Proteínas G está dividida em 4 tipos : Gas, Gai/o (Gai1–3, GaoA,B, Gaz), Gaq (Gaq, Ga11, Ga14,16), e G $\alpha$ 13 (G $\alpha$ 12, G $\alpha$ 13) (LUO, 2019). Um tipo de GPCR também pode se acoplar a vários tipos diferentes de Proteína G, levando a sinalizações diferentes, dependendo do tipo ou dose do agonista, ou do tipo de célula (DEFEA, 2008). A ativação dos GPCRs é acompanhada pelo movimento para fora das hélices V e VI, o que cria uma cavidade na porção citoplasmática do receptor, que vai servir como bolsão de ligação para a hélice alfa 5 da subunidade alfa da Proteína G. Uma vez ligada ao GPCR, a Proteína G vai apresentar a abertura de seu bolsão de ligação do nucleotídeo, resultando na perda do GDP que ocupava este bolsão na forma inativa, e vai iniciar a ligação com GTP. A subunidade alfa que se encontra ligada ao GTP, se dissocia do GPCR e do dímero beta-gama, que vai se ligar às moléculas seguintes na

cascatas de sinalização. O GPCR livre pode interagir com uma nova Proteína G (GUREVICH, V.; GUREVICH, E., 2019).

A família das Proteínas Quinases A, G e C (GRK) termina a ativação das Proteínas G através de fosforilação da porção citoplasmática terminal do GPCR, que, fosforilado, vai se ligar, então, às beta-arrestinas, o que vai levar à internalização do receptor, terminando com a sinalização. As GRKs são divididas em 7 subtipos, GRK de 1 a 7, dependendo do receptor ao qual se ligam. A família GRK da rho compreende as GRK 1 e 7, que são expressas na retina, as GRK 2 e 3 pertencem à família do receptor beta-adrenérgico, e a família GRK 4 compreende as GRKs 4, 5 e 6. GRKs 2, 3, 5, e 6 são expressas em vários tipos de células, e a expressão de GRK4 acontece no cérebro, rim e testículos (LUO, 2019).

A família das proteínas arrestinas regula a sinalização nos GPCRs, terminando a sinalização das Proteínas G. As arrestinas são divididas em quatro tipos: arrestina-1 (arrestina visual), arrestina-2 (ou beta-arrestina-1), arrestina-3 (ou beta-arrestina-2), and arrestina-4 (arrestina cone). Arrestina-1 and arrestina-4 são expressas somente na retina, e arrestina-2 e arrestina-3 são expressas em várias células (LUO, 2019).

### **1.11. Sinalização Tendenciosa**

A sinalização tendenciosa é o fenômeno pelo qual uma via de sinalização intracelular diferente é iniciada a partir da interação de diferentes ligantes com o receptor, interação essa que vai causar uma alteração da conformação estrutural do receptor, e essa alteração única, vai tornar possível uma interação específica com a próxima molécula na cascata. A ativação do CB1 leva ao início de diferentes cascatas de sinalização, através da interação do CB1 com Proteínas G ou arrestinas. Cada cascata de sinalização leva a uma resposta farmacológica diferente, as quais podem ser utilizadas para se obter um tratamento específico para uma determinada patologia (AL-ZOUBI; MORALES; REGGIO, 2019).

A descoberta de que os GPCRs também sinalizavam através da arrestina, e, não só através de diversos tipos de Proteínas G, levou a tentativa de desenvolvimento de fármacos seletivos para cada via de sinalização com a intenção de minimizar o desenvolvimento de efeitos adversos causados pela ativação da outra cascata (ILTER; MANSOOR; SENSOY, 2019). Isso colocou em disputa o conceito de apenas duas conformações de GPCR, a ativa e a inativa, e levando ao novo conceito de múltiplas alterações de conformação. Por exemplo, os agonistas que alteram o formato das hélices transmembranares 6 e

7 são tendenciosos para a Proteína G, sendo que aqueles que alteram só a hélice transmembranar 6 seriam agonistas parciais e os que alteram a hélice 8 são tendenciosos para arrestina (ILTER; MANSOOR; SENSOY, 2019).

Após a interação com o ligante, o GPCR sofre uma alteração conformacional, que permite a interação com um dos vários subtipos de Proteína G. A especificidade da interação ocorre devido a mudanças conformacionais do GPCR. Por exemplo, observam-se algumas diferenças entre as interações do GPCR e as Proteínas Gi ou Gs, especialmente nas hélices 6 e 7 e na hélice 8. Na interação de GPCR com a proteína Gs, a hélice 6 está mais afastada do corpo da GPCR em direção ao seu lado externo, do que se observa em relação a Gi, aonde a hélice transmembranar 6 está mais reta e mais próxima. Quanto à Proteína G, em Gs, sua alça alfa 5 está mais introduzida no bolsão de ligação da GPCR e mais próxima da hélice transmembranar 6 do que a proteína Gi. Na interação com a proteína Gs, a hélice 6 está dobrada para o lado externo, fazendo o bolsão estar mais aberto. A alça alfa 5 da Proteína G está mais inserida no sítio da GPCR. A proteína Gi está mais externa e interagindo com a alça 6, que está mais reta (ZHOU; MELCHER; XU, 2019).

Essa interação com do GPCR vom a Proteína G permite recrutar uma das Quinases de GPCR (GPCRK) (ZHOU; MELCHER; XU, 2017), levando à hipótese da sinalização tipo código de barras, a qual ocorre pela fosforilação de conjuntos variados de resíduos de serina ou treonina na alça intracelular 3 ou terminal carboxílico, dependendo de qual GPCRK foi ativada. Ligantes diferentes, ao se ligar ao GPCR, levam a diferentes mudanças conformacionais do GPCR, ativando, diferentes GPCRKs. Cada GPCRK fosforila diferentes conjuntos de resíduos, então, pode-se dizer que, cada GPCRK leva a um padrão diferente de fosforilação. Esses diferentes resíduos fosforilados, ao interagirem com alguma arrestina, vão causar diferentes alterações conformacionais nas arrestinas, sendo que cada conformação vai ativar uma via de sinalização diferente (NOBLES, 2011), como a internalização do GPCR, ou iniciar uma cascata de sinalização, levando à dessensibilização, endocitose, ubiquitinação do GPCR, ou sinalização independente da Proteína G (AL-ZOUBI; MORALES; REGGIO, 2019).

Na interação do GPCR com a arrestina, vai acontecer a finalização da sinalização das Proteínas G e iniciar a sinalização com a arrestina. A interação do GPCR com a arrestina acontece com a ligação da alça intracelular 3 do GPCR ou seu terminal carboxílico com o terminal amina da arrestina (ZHOU; MELCHER; XU, 2017). O recrutamento da arrestina até a porção fosforilada do GPCR vai inibir futuras interações com a proteína G, terminando, desta forma, a sinalização e reduzindo a resposta do GPCR a estimulação repetitiva, fenômeno

chamado de desensibilização. A arrestina também pode se ligar ao GPCR no terminal carboxílico, preservando, assim, o bolsão de ligação do GPCR com a Proteína G, a qual ainda poderia acontecer. Desta forma, ainda é possível a internalização do GPCR, mas não sua desensibilização (AL-ZOUBI; MORALES; REGGIO, 2019).

A estrutura cristalográfica de CB1 ligada a Proteína G (PDB 6N4B) mostra uma rotação da hélice transmembranar 6, causando uma protusão dessa hélice para o lado intracelular com um movimento para o interior da célula, aumentando o bolsão de ligação intraplasmático para acomodar a hélice alfa 5 da Proteína Gi (KRISHNA-KUMAR, et al., 2019). O exato mecanismo molecular da sinalização tendenciosa ainda não é completamente conhecido. A observação das estruturas resolvidas por cristalografia das GPCR mostra que o desvio externo da alça transmembranar 6 formando um bolsão citoplasmático na GPCR é bem maior para acomodar a Proteína G do que o desvio necessário para acomodar a arrestina, sendo esta interação menos estável. Porém a fosforilação do terminal carboxila em sua ligação com a hélice 8 é específica para a interação com a arrestina (AL-ZOUBI; MORALES; REGGIO, 2019) (Figura 14).

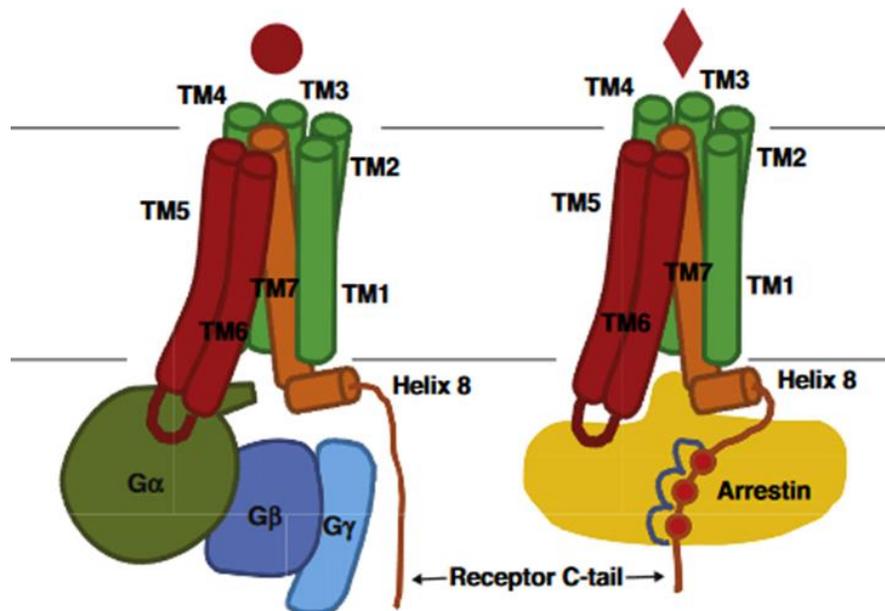


Figura 14. GPCR interagindo com Proteína G à esquerda e com arrestina à direita.

Fonte - ZHOU; MELCHER; XU. Understanding the GPCR biased signaling through G protein and arrestin complex structures. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 45, p. 150–159, 2017.

## 1.12. Transmissão Sináptica Retrógrada

O conceito de comunicação neuronal envolve a junção sináptica, aonde os neurotransmissores são liberados e transmitem a informação de forma anterógrada, ou seja, dos neurônios pré-sinápticos em direção aos neurônios pós-sinápticos. Perturbações nesse fluxo de informação, no SNC, podem levar a um mau funcionamento do sistema. Nos sistemas biológicos o fluxo de informação é controlado por mecanismos de feedback (KATONA; FREUND, 2012). Os eCBs são os principais mediadores da transmissão sináptica retrógrada, tendo o papel de modular os excessos de neurotransmissores, pois são um sinal de feedback negativo, trazendo proteção contra o excesso de atividade sináptica e, conseqüentemente, contra as lesões por excitotoxicidade (KATONA; FREUND, 2008). Enquanto a transmissão sináptica anterógrada é estudada há décadas, há pouca informação sobre as vias de sinalização sinápticas retrógradas.

O CB1 é o receptor mais prevalente no SNC, e está presente em vários tipos de sinapses. A partir de estudos que mostram a alta atividade da anandamida-sintase no hipocampo, percebeu-se que a maioria dos CB1s se acumulam na membrana pré-sináptica e seu efeito inibitório na liberação de neurotransmissor é um achado comum na maioria dos axônios do SNC e SNP. A localização dos CB1s coincide com a densidade dos RmGlu e dos Receptores GABAérgicos. Os RmGlu são moléculas pós-sinápticas. Estão localizados na periferia da fenda sináptica e detectam quando há um excesso de glutamato na sinapse, iniciando a cascata de feedback negativa dos eCBs. O glutamato estimula liberação de eCBs através da ativação de RmGlu, o que faz iniciar síntese de eCBs. Os RmGlu ativados são, então, acoplados à proteína Gq11, cuja ativação é seguida pela clivagem de bifosfato de fosfatidilinositol em trifosfato de inositol e diacilglicerol, o qual é o precursor do 2-AG, o EC que é sintetizado no neurônio pós-sináptico, e vai atravessar a fenda sináptica retrogradamente, ativando, assim, os CB1s localizados no neurônio pré-sináptico (ARAQUE, et al., 2017). Além do RmGlu, também os receptores dopaminérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos, de orexina e colecistoquinina ativados são estímulos efetivos para liberação eCBs (HEIFETS; CASTILLO, 2009). O CB1 ativado vai iniciar o processo de decrescer a força desta mesma sinapse ao diminuir a liberação de neurotransmissores usando diversos mecanismos, tais como, a inibição pré-sináptica do influxo de cálcio através de canais de cálcio voltagem-dependentes, ou a ativação de canais de potássio pré-sinápticos causando hiperpolarização do neurônio, ou vai atuar em sinapses próximas, causando uma alça de feedback e diminuindo a propagação do sinal (KATONA; FREUND, 2008). O término da sinalização dos eCBs é iniciado pela sua recaptação e subsequente degradação.

As moléculas sinalizadoras eCBs são expressas em várias regiões cerebrais, incluindo o córtex, hipocampo, amígdala, estriado, hipotálamo, cerebelo e medula espinhal, que são as áreas cerebrais responsáveis pelas funções neurais relacionadas com o SEC, como aprendizado, memória, ansiedade, adição a drogas, analgesia, função motora, humor, e comportamentos relacionados à alimentação (KANO, 2014). Os eCBs são uma família de moléculas lipídicas que agem como moduladores da transmissão neuronal e da plasticidade sináptica. São sintetizados somente após o início do estímulo da despolarização neuronal. Além deste mecanismo de ação mais comum, os eCBs também participam de sinalização não retrógrada, sinalização por astrócitos, potenciação de longa duração, e envolvimento com os CB1 mitocondriais (ARAQUE, et al., 2017). Refletindo a distribuição de CB1 no cérebro, ligantes exógenos de CB1 impactam um grande número de funções cerebrais. Alguns ligantes estão associados com desordens neuropsiquiátricas (HEIFETS; CASTILLO, 2009).

Sabe-se que o SEC tem importância primordial na mudança de força das sinapses (ZACHARIOU et al., 2013). A sinalização retrógrada mediada por eCBs é um tema importante no estudo da plasticidade sináptica.

### **1.13. Plasticidade Sináptica**

A plasticidade sináptica é importante para adaptações derivadas de experiência dos circuitos neurais e da função cerebral normal. Desde o início do desenvolvimento até a idade adulta, mudanças na função sináptica em resposta a estímulos do meio ambiente e a experiências individuais são necessárias para o aprendizado de novas habilidades até a geração de novos comportamentos adaptativos (ARAQUE, et al., 2017).

O enfraquecimento ou fortalecimento das sinapses depende da menor ou maior atividade neuronal. Essa mudança na força da sinapse é a base da formação de memória e aquisição de aprendizados. As memórias estão representadas nas vias sinápticas de redes neurais conectadas. A plasticidade das sinapses cerebrais permite adaptações comportamentais. A habilidade de adquirir aprendizado a partir das experiências da vida e a formação de memórias proveniente dos acontecimentos, novas experiências e mudanças ocorridas no ambiente, bem como o ajuste do comportamento que é proveniente da aquisição de novas memórias e novos conhecimentos, todas essas habilidades são propiciadas pelas mudanças acontecidas nas sinapses.

As sinapses são zonas de contato entre neurônios que permitem a comunicação entre eles. A Plasticidade Sináptica é a habilidade de uma rede neural de se tornar mais forte, habilidade chamada de Potenciação, ou de se tornar mais fraca, chamada de Inibição, acontecida por função de mudanças na sinapse. (ZACHARIOU et al., 2013). As sinapses inibitórias e facilitatórias no SNC são alvos de plasticidade tanto de curta quanto de longa duração. As mudanças de curta duração podem durar segundos, e as de longa duração podem durar de minutos a horas. As mudanças de curta duração, na transmissão sináptica, compreendem os mecanismos de supressão da excitação induzida por despolarização (DSE) e supressão da inibição induzida por despolarização (DSI), dependendo se o alvo dos eCBs são neurônios glutamatérgicos ou GABAérgicos, respectivamente. Sabe-se que a diminuição transiente da despolarização em uma quantidade pequena de neurônios é característica da DSI causada por eCBs. O uso de THC leva a um efeito mais drástico, de maior extensão e duração mais prolongada quando comparado com o efeito fisiológico dos eCBs (HEIFETS; CASTILLO, 2009).

Na Plasticidade Sináptica, a ativação simultânea ou sequencial de dois neurônios conectados leva a mudança na força da sinapse entre eles. (FELDMAN, 2012). Hebb propôs que, quando um neurônio habitualmente despolariza outro através da sinapse entre eles, esse processo é facilitado, enquanto as sinapses vizinhas ficam enfraquecidas (lei de Hebb) (ALMEIDA-FILHO, et al., 2014). As mudanças sinápticas de longa duração com duração de minutos a horas, como a Depressão de Longa Duração (LTD) e a Facilitação de Longa Duração (LTP), são dependentes de sinalização eCB, e podem causar alterações de maior duração na sinapse envolvida, tendo a capacidade de moldar circuitos cerebrais e causar mudanças no comportamento. Sabe-se que essas mudanças de longa duração, na força da sinapse, feita pela liberação dos eCBs, são importantes no mecanismo de plasticidade sináptica, e que disfunções na liberação dos eCBs têm sido associadas com distúrbios neuropsiquiátricos, tais como depressão, esquizofrenia, ansiedade e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (ARAQUE, et al., 2017). Ocorrem em resposta a diversos padrões de atividade pré-sináptica e pós-sináptica, sendo, portanto, reguladoras tanto de sinapses inibitórias quanto de sinapses excitatórias, de um grande número de funções cerebrais, incluindo cognição, controle motor, emoção, recompensa e comportamentos de alimentação. Esses mecanismos são atingidos através de LTD e LTP. Enquanto LTP é originada por despolarização de alta frequência, LTD é iniciada por disparos de baixa frequência (BLISS; LØMO, 1973). O tipo de plasticidade ativada no SEC tem requerimentos prévios específicos. As alterações de curta duração são causadas pela entrada de cálcio no neurônio pós-sináptico. As alterações de longa duração são causadas por ativação dos

RmGlus na membrana pós sináptica (HEIFETS; CASTILLO, 2009). A LTD é considerada a forma mais comum de plasticidade ocasionada pelo SEC. Pontos importantes na formação de LTD incluem a maior produção e expressão de enzimas relacionadas a maior ou menor síntese e degradação de ECs (HEIFETS; CASTILLO, 2009).

#### **1.14. Métodos Computacionais**

A recente popularização dos métodos computacionais na pesquisa e desenho de fármacos deve-se ao fato do equipamento ter se tornado mais poderoso e mais barato, popularizando o seu uso e permitindo o desenvolvimento de vários softwares que realizem a análise das interações moleculares entre ligante e proteína, através do uso de algoritmos computacionais. Isso diminui o custo da pesquisa, pois ao invés de serem usados métodos experimentais mais caros e que demandam mais tempo, pode-se encurtar uma parte da pesquisa, geralmente a triagem inicial, usando os métodos computacionais. Além disso, a cristalografia por difração de raios X de proteínas também se popularizou, e isso permitiu que várias estruturas de proteínas resolvidas estruturalmente fossem disponibilizadas para a pesquisa.

##### **1.14.1. O Modelo Chave e Fechadura**

Este modelo descreve a interação de diversas moléculas com o bolsão de ligação de uma proteína, atribuído a Emil Fischer, que o desenvolveu em 1894. É uma analogia na qual o ligante é a chave e a proteína é a fechadura (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019a). Quando um ligante de formato específico se encaixa em uma cavidade na proteína de formato complementar, esse encaixe firme vai levar a uma alteração conformacional na proteína, alteração a qual, por sua vez, vai dar início a uma cascata de sinalização. O modelo de chave e fechadura é um ponto de início para a modelagem de fármacos, e foi integrado em modelos computacionais que usam docking molecular, o qual pode mostrar quais são os elementos importantes da interação ligante-proteína (TRIPATHI; BANKAITIS, 2017).

O docking molecular procura prever o modo de ligação mais favorável de um determinado ligante em um bolsão de ligação de determinada proteína. Os protocolos de docking contêm um algoritmo de posicionamento e um sistema de ranqueamento. O algoritmo de posicionamento faz diversas amostragens do espaço disponível para o ligante no bolsão de ligação e, por isso, gera um grande número de poses, ou posições potenciais do ligante. O sistema de ranqueamento

classifica todas estas e poses e identifica a mais provável (TRIPATHI; BANKAITIS, 2017).

O processo de geração de poses exige velocidade e acurácia, ou seja, não perder poses potencialmente importantes enquanto se mantém eficiência computacional. Também é necessário que o sistema de escore gere uma lista que corresponda à afinidade (TRIPATHI; BANKAITIS, 2017). A identificação do bolsão de ligação é feita a partir da estrutura tridimensional da proteína. A maior qualidade da informação estrutural trará mais informações, porque o formato preciso do bolsão de ligação ditará o formato do ligante que vai interagir com ele. O formato do bolsão de ligação pode sofrer variações, quando se levam em conta as rotações possíveis das cadeias laterais dos aminoácidos que formam o bolsão, os movimentos da hélice ou as mudanças induzidas pelo ligante, trazendo dificuldades na realização do docking. Depois de definir a superfície do bolsão de ligação, procura-se a localização de sítios de interação dentro do bolsão, com a intenção do entendimento do ambiente químico e suas propriedades, tais como carga e hidrofobicidade (TRIPATHI; BANKAITIS, 2017).

O número de estruturas tridimensionais de proteínas que foram resolvidas e depositadas no PDB aumentou substancialmente nestes últimos anos, assim como a qualidade de resolução. Concomitantemente, observamos a melhora de qualidade nos hardwares e softwares e a diminuição no seu preço.

#### **1.14.2. Princípios do Reconhecimento Molecular**

As interações moleculares não covalentes são fundamentais na interação de ligante e proteína. A complementaridade entre as superfícies do ligante e do bolsão de ligação da proteína e as propriedades estéricas, eletroestáticas e lipofílicas determinam a estabilidade do sistema (NOLAN; SINGH; MCCURDY, 2009).

A rede de interações da água com a proteína, através de ligações de hidrogênio, é desfeita pela incapacidade dos ligantes hidrofóbicos de formarem ligações de hidrogênio. As interações não covalentes são responsáveis pela formação do complexo proteína-ligante. Devido a energia mais fraca, são necessárias muitas interações hidrofóbicas para se formar um sistema estável, além de proximidade entre as estruturas, o que demonstra a importância da complementaridade de formas (NOLAN; SINGH; MCCURDY, 2009).

A importância das ligações de hidrogênio é contrabalancear os efeitos energéticos desfavoráveis que ocorrem após o deslocamento das moléculas de água, dando estabilidade à ligação. As ligações de hidrogênio são atrações entre

dois dipolos. O próton está em uma ligação covalente no grupo doador, carrega uma carga positiva e é capaz de fazer uma ligação com o par de elétrons do receptor negativo. A sua energia é de 3–5 kcal/mol/ligação. São importantes na manutenção de estruturas tridimensionais (NOLAN; SINGH; MCCURDY, 2009).

As interações de van der Waals dependem da complementaridade de formas do bolsão de ligação da proteína e do ligante. Resultam da atração entre dipolos temporários que são produzidos quando ocorre uma distribuição desigual de densidade eletrônica. São interações que necessitam distâncias próximas, e são mais fracas que as ligações de hidrogênio com uma energia de 0.5–1 kcal/mol. Se a complementaridade da superfície for alta, estas interações serão numerosas e terão grande importância na estabilidade (NOLAN; SINGH; MCCURDY, 2009).

As interações hidrofóbicas ocorrem entre duas regiões não polares, como anéis aromáticos. A organização não favorável da água ao redor de regiões hidrofóbicas expostas é diminuída pela associação entre regiões não polares, levando a mudanças conformacionais, com a proteína englobando o ligante para reduzir a exposição da sua superfície hidrofóbica ao meio aquoso (NOLAN; SINGH; MCCURDY, 2009).

O reconhecimento molecular é o processo no qual as moléculas biológicas interagem. O conhecimento dos mecanismos envolvidos é importante no desenvolvimento de novos fármacos. As proteínas têm funções extensas nos sistemas biológicos, incluindo sinalização e estrutura das células. Essas funções são realizadas através de sua interação com outras moléculas. Um sistema proteína-ligante contém interações complexas que envolvem troca de calor. As forças presentes nessa interação são o resultado de troca de energia entre a proteína, o ligante, água e íons. A energia livre de Gibbs mede a capacidade do sistema. A interação entre proteína e ligante acontece somente quando a energia livre de Gibbs é negativa, quando o sistema atinge o equilíbrio. Quanto mais negativa a variação na energia livre de Gibbs, mais estabilidade tem o sistema, ou maior afinidade tem o ligante pela proteína (DU et al., 2016).

Entalpia é a medida da energia total do sistema, a soma das energias internas, podendo ser negativa nos processos exotérmicos, nos quais há formação de interações favoráveis, e positiva nos processos endotérmicos, nos quais há perda de interações. A entalpia de ligação reflete a mudança de energia do sistema que acontece quando o ligante interage com a proteína, que acontece quando há a formação das interações não covalentes, como ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, e é o resultado da formação e ruptura de interações formadas, principalmente com o solvente (DU et al., 2016).

Entropia é a medida da distribuição homogênea da energia no sistema. Então, a interação entre proteína e ligante só vai ocorrer quando a energia livre do sistema fica negativa, e a magnitude desse valor determina a estabilidade do sistema (DU et al., 2016).

Os métodos experimentais usados na investigação da interação proteína-ligante são a Cristalografia por Difração de Raios X, Ressonância Magnética Nuclear, Microscopia Crio-Eletrônica. Os métodos computacionais usam os dados experimentais que trazem as informações tridimensionais da proteína para tentar prever as mudanças em entalpia e entropia, que vão direcionar novos experimentos com fármacos (DU et al., 2016).

### **1.14.3. Docking Molecular**

A determinação computacional da posição de um fármaco em potencial no bolsão de ligação de uma proteína alvo tem um impacto positivo na fase inicial de projetos de desenho e desenvolvimento de fármacos (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019a). Esse processo tem a denominação de docking molecular.

O estudo das interações moleculares que acontecem entre um ligante e os resíduos do bolsão de ligação da proteína permite o entendimento de quais interações são essenciais para o início da ativação da proteína, incluindo quais os átomos e quais suas posições no ligante, que são imprescindíveis para tal. Esse conhecimento permite que se façam modificações na molécula do ligante, visando atingir uma maior ou menor afinidade e eficácia, e também tirar partido de cada alteração conformacional da proteína que vai ser observada com a interação a cada um dos ligantes modificados, sendo que cada conformação dará início a uma cascata de sinalização tendenciosa, com efeitos biológicos diferentes no organismo, procurando-se assim, pelo efeito farmacológico necessário para o tratamento da patologia de interesse (DE RUYCK, et al. 2016).

Tendo-se disponível a estrutura resolvida da proteína, e seus dados de localização atômica no espaço, pode-se valer do docking molecular, que vai fazer a análise das interações moleculares entre o ligante e a proteína, além da complementaridade da forma proteína-ligante. Ao se receber, como resultado do processo de docking molecular, várias possibilidades de interação, através de posições diferentes do ligante no bolsão de ligação da proteína, é analisado se o algoritmo utilizado computacionalmente foi capaz de encontrar a mesma posição e interações já observadas no experimento cristalográfico. Esse

algoritmo é escolhido para testar a ligação de moléculas diferentes (MESTRES et al., 2009).

#### **1.14.4. Estrutura Cristalográfica do CB1**

Só recentemente temos os primeiros modelos estruturais do CB1 resolvidos por Cristalografia por Difração de Raios X. O primeiro modelo da rho apareceu em 2000 (PALCZEWSKI et al., 2000). A primeira estrutura cristalográfica resolvida do CB1 foi descrita no ano 2016, seguida por mais três estruturas.

A primeira estrutura do CB1 resolvida (PDB-5TGZ) precisou de ajustes técnicos da proteína para que o processo de cristalização fosse possível. O CB1 foi truncado nos terminais amina e carboxila e teve uma fladotoxina inserida na alça intracelular 3, para fins de estabilidade do complexo CB1 e o agonista inverso AM6358 (HUA et al., 2016). A segunda estrutura foi resolvida com novos parâmetros, e, desta vez, CB1 estava complexado com o agonista inverso taranabanto (PDB 5U09) (SHAO et al., 2016). As duas estruturas seguintes, mostraram CB1 complexado com agonistas, AM11542 (PDB 5XRA) e AM841 (PDB 5XR8) (HUA et al., 2017), derivados do THC. Em 2019 foi resolvida a estrutura de CB1 complexada com o agonista FUBINACA, um canabinoide sintético de alta eficácia, usado como entorpecente recreativo com potencial de toxicidade. A novidade é que este complexo mostra também a proteína G acoplada ao CB1 (PDB 6N4B) (KRISHNA-KUMAR et al., 2019). Nesse ano também foi resolvida a estrutura do CB2 complexado com o antagonista AM10257 (PDB 5ZTY) (LI et al., 2019).

As estruturas cristalográficas do CB1 disponibilizadas publicamente no PDB (BERMAN et al., 2000) tornam possível o estudo das interações moleculares dos ligantes com a proteína e também o estudo de cada interação molecular importante que seja específico para determinada via de sinalização, possibilitando a modificação da estrutura química de outros ligantes de acordo com seu potencial farmacológico em iniciar cada uma destas vias, além de tornar possível o screening virtual de fármacos já existentes e que possam ser reposicionados para o tratamento de outras patologias, diminuindo o custo na descoberta de novos tratamentos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O CB1 é um receptor prevalente no SNC. Acredita-se que fármacos orientados ao CB1 seriam de valia no tratamento de doenças neurodegenerativas, neuropsiquiátricas e dor crônica, entre outras. As últimas tentativas de desenvolvimento de fármacos da indústria farmacêutica têm mostrado resultados decepcionantes com fármacos que foram retirados do mercado. A disponibilidade de um modelo estrutural de CB1 para pesquisa proporcionou que fosse possível o estudo computacional da relação entre a proteína e seus ligantes, que pudesse evidenciar interações moleculares importantes, as quais poderiam ajudar no desenvolvimento de fármacos que visem o CB1. Usando as ferramentas computacionais, é possível estreitar alvos terapêuticos através da seleção das moléculas com perfil de interação mais provável, dessa forma, otimizando os recursos.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar as interações intermoleculares entre ligantes e o CB1 em estruturas de complexos obtidos por meio de simulação de docking molecular.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÌFICOS**

Identificar um protocolo de docking molecular que reproduza as interações moleculares entre CB1 e ligante encontrado na estrutura cristalográfica do CB1-ligante disponibilizado no PDB.

Mostrar as interações moleculares relevantes para a interação de ligantes com o CB1.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Docking Molecular de Complexos Proteína-Ligante

O uso de abordagens computacionais para descoberta e desenvolvimento de fármacos começou na década de 1980 (KUNTZ et al., 1982) e teve sua primeira aplicação de grande sucesso na década de 1990, com a descoberta de inibidores da protease do HIV que passaram a ser usados para o tratamento de pacientes com Aids (DESJARLAIS; DIXON, 1994; VAILLANCOURT; COHEN; SAUVE, 1995; KING; VAJDA; DELISI, 1996). De uma forma geral, nós podemos dizer que o uso de abordagens computacionais contribuiu de forma substancial para o desenvolvimento de fármacos nas últimas décadas (HILLISCH; HEINRICH; WILD, 2015; MUEGGE; BERGNER; KRIEGL, 2017).

O docking molecular é um método de simulação computacional que prevê a posição de um ligante contra a estrutura de uma proteína. O ligante da simulação é uma pequena molécula orgânica (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019a; 2019b). Deve-se destacar que essa abordagem computacional não se limita ao estudo das interações intermoleculares envolvendo uma proteína alvo e uma pequena molécula orgânica. Temos docking molecular envolvendo qualquer par de moléculas, podendo ser proteína-proteína, proteína-DNA, RNA-proteína, DNA-ligante e RNA-ligante (AZEVEDO et al., 2012).

A principal ideia atrás do uso do docking molecular para o estudo da interação de ligantes com proteínas alvo, e seu uso em potencial para a descoberta de fármacos, reside na teoria da chave-fechadura para especificidade enzimática (FISCHER, 1890; FISCHER, 1894), apesar da proteína alvo não ser necessariamente uma enzima. A Figura 16 ilustra essa analogia indicando a equivalência do ligante com a chave e o bolsão de ligação da proteína como a fechadura. Usando essa teoria como base, podemos dizer que o ligante é a chave, e o bolsão de ligação da proteína, a fechadura. Assim, numa simulação de docking molecular, podemos pensar que tentamos computacionalmente encaixar a chave na fechadura.

Podemos fazer um experimento mental (*Gedanken-Experiment*, ou *Gedankenerfahrung*), onde nos transportamos para uma sala escura e estamos de pé bem próximo (ao alcance das mãos) a uma porta. Estamos com uma chave (ligante) na mão direita e com a mão esquerda sobre a fechadura da porta (bolsão de ligação da proteína alvo) para termos uma ideia da sua localização. A simulação de docking molecular é, basicamente, procurarmos a posição da chave na fechadura, considerando-se a situação de escuridão. Essa analogia é interessante para obtermos uma visão geral do processo, mas deve-se destacar

que, tanto no uso da teoria da chave-fechadura para especificidade enzimática (FISCHER, 1890; FISCHER, 1894), quanto na analogia com a simulação de docking molecular, tal abordagem é uma simplificação do processo.

No caso do docking molecular, normalmente não consideramos o ligante rígido como uma chave. Na Figura 16 trazemos a estrutura de um ligante para ilustrar o conceito de flexibilidade nas simulações de docking molecular. Na estrutura do ligante, destacamos os ângulos de torção, que podem ter a liberdade de girar durante a simulação de docking molecular. Os ângulos de torção são definidos como os ângulos diedros que envolvem quatro átomos ligados covalentemente em sequência (Figura 17), onde os átomos B e C apresentam uma ligação covalente simples, que permite o giro. Essa liberdade de giro tem um custo computacional, pois temos que girar dentro de uma rotação fixa, todas as estruturas possíveis. Por exemplo, para o ângulo de torção ( $\phi_1$ ) podemos ter passos de  $20^\circ$ , ou seja, teremos para um ângulo de torção 18 posições possíveis ( $18 \times 20^\circ = 360^\circ$ ).

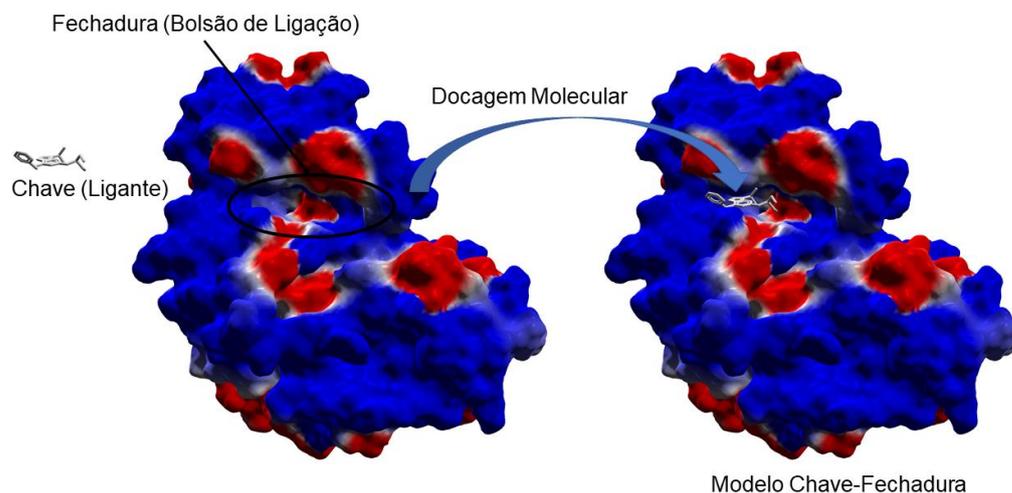


Figura 15. A analogia do docking molecular com o modelo chave-fechadura. Figura gerada com a estrutura 2A4L (DE AZEVEDO et al., 1997). Na figura temos a estrutura do ligante (chave) desenhado com bastões na cor cinza claro. A proteína é representada por sua superfície molecular, com a coloração vermelha indicando concentração de carga elétrica negativa, azul indica carga elétrica positiva e branca mostra ausência de carga elétrica. Foi usado o programa Molegro Virtual Docker (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) para gerar esta figura. À esquerda temos o ligante (chave) e o bolsão de ligação da proteína (fechadura). O ligante está numa posição aleatória fora do bolsão de ligação. A simulação de docking molecular leva à formação do complexo proteína-ligante (à direita), com o ligante (chave) acoplado ao bolsão de ligação da proteína (fechadura).

Na molécula do agonista inverso AM6538 (HUA et al., 2016), temos 7 ângulos de torção (Figura 16), ou seja, temos que testar  $18^7$  posições, se fixarmos passos de  $20^\circ$ , isto para uma configuração (x,y,z) do centro do ligante e com ângulos de rotação ( $\theta_x$ ,  $\theta_y$ ,  $\theta_z$ ) ao longo dos eixos cartesianos x,y,z. Resumindo, ao permitirmos a liberdade de rotação do ligante (liberdade conformacional), temos um sistema mais realista, mas com um aumento do custo computacional para a simulação do ligante, pois temos um maior número de graus de liberdade a serem simulados. Nos estudos de docking molecular deste trabalho, adotamos como abordagem de docking molecular simulações onde temos liberdade de giro para os ângulos de torção.

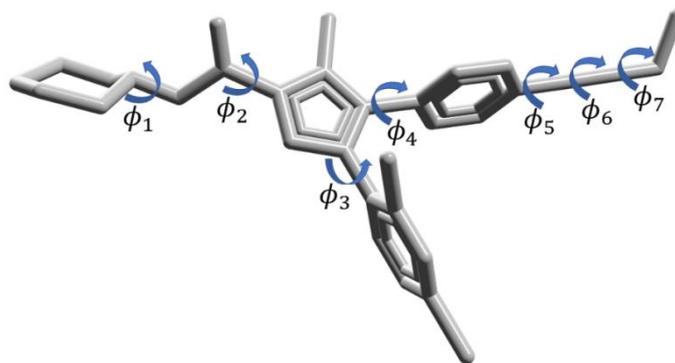


Figura 16. Estrutura do agonista inverso AM6538 (PDB: 5TGZ) (HUA et al., 2016). Foi usado o programa Molegro Virtual Docker (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) para gerar esta figura.

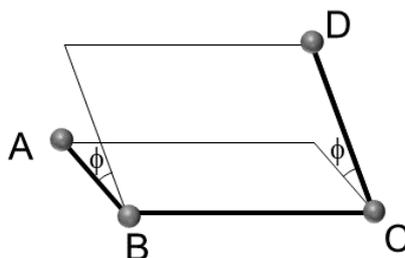


Figura 17. Estrutura de um sistema de quatro átomos ligados covalentemente em sequência. Neste sistema, a ligação covalente entre os átomos B e C é simples, o que permite o giro relativo dos planos definidos pelos átomos A,B,C e B,C,D.

Outra possibilidade é considerarmos a liberdade dos ângulos de torção das cadeias laterais dos aminoácidos que se localizam no bolsão de ligação. Na Figura 18 temos uma visão do bolsão ligação do CB1, com destaque para as

cadeias laterais de alguns dos aminoácidos que interagem com o agonista inverso AM6538. Durante a simulação de docking molecular, além da flexibilidade dos ângulos de torção do ligante, podemos selecionar as cadeias laterais dos aminoácidos que permitiremos que girem durante a simulação. Novamente, a adoção da flexibilidade das cadeias laterais dos aminoácidos deixa o sistema biológico mais realista, mas com um aumento considerável dos graus de liberdade e, conseqüentemente, uma elevação do custo computacional da simulação de docking molecular. Na presente tese, deixamos as cadeias laterais dos aminoácidos fixas durante as simulações de docking molecular.

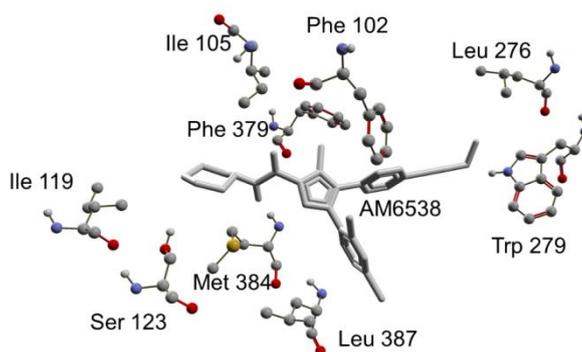


Figura 18. Estrutura da molécula AM6538 e alguns aminoácidos do bolsão de ligação do CB1 (PDB: 5TGZ) (HUA et al., 2016). As cadeias laterais dos aminoácidos podem girar em simulações de docking molecular. O ligante AM6538 é desenhado com bastões cinza. Os aminoácidos são desenhados com esferas e bastões. Foi usado o programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) para gerar esta figura.

Retornando à analogia da docking molecular com o modelo chave-fechadura, quando procuramos no escuro a posição da chave (ligante) na fechadura (bolsão de ligação), podemos dizer que o equivalente desta procura, no escuro, da posição da chave, na simulação de docking molecular, é a aplicação do algoritmo de busca da posição do ligante na estrutura da proteína alvo. Esse algoritmo varia a posição do ligante (chave), procurando achar o seu melhor posicionamento no bolsão de ligação (fechadura). Forçando um pouco a analogia, podemos dizer que o melhor posicionamento da chave na fechadura, pronta para abrir a porta, seria a posição de mínima energia do ligante ao “acomodar-se confortavelmente” no bolsão de ligação da proteína. O desafio do ponto de vista computacional é utilizarmos um algoritmo de busca eficaz e uma equação (função escore) que, baseada nas coordenadas atômicas do ligante (chave) e do bolsão de ligação (fechadura), seja capaz de identificar a melhor posição do ligante na estrutura.

Sempre que possível, consideramos a disponibilidade de estruturas cristalográficas complexadas com ligantes para validarmos a combinação de algoritmo de busca e função escore disponíveis na simulação de docking molecular. Essa validação é chamada de redocking. Em seguida, teremos seções específicas para tratar desses conceitos fundamentais para entendermos as simulações de docking molecular.

## 4.2. Algoritmo de Busca

Como destacado, uma etapa fundamental na simulação de docking molecular, é a procura da melhor posição do ligante (chave) no bolsão de ligação da proteína (fechadura). Muito do sucesso do desenvolvimento dos programas para simulação de docking molecular deve-se ao uso de técnicas de computação biologicamente inspirada (HEBERLÉ; DE AZEVEDO, 2011), como algoritmos de busca. Entre os mais usados para as simulações de docking molecular, temos os algoritmos genéticos disponíveis em programas como o AutoDock4 (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019c) e ArgusLab (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019d) e evolução diferencial disponível nos programas GemDock (YANG; CHEN, 2004; BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019e) e Molegro Virtual Docker (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019f).

Na busca do melhor protocolo de docking molecular, testamos 32 combinações diferentes de algoritmos de busca e funções escores. A função escore com melhor resultado, combinada com o algoritmo ACO, foi a função Moldock Score, descrita na próxima seção (XAVIER et al., 2016), e o melhor algoritmo foi Otimização da Colônia de Formigas (*Ant Colony Optimization*) (ACO) disponível no programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019e).

O algoritmo ACO foi usado para recuperar a posição dos ligantes cristalográficos e simular a interação de candidatos a ligantes do CB1. Faremos uma breve descrição do algoritmo ACO. Na aplicação do algoritmo ACO ao problema do docking molecular, o caminho mais curto a ser achado pelo algoritmo indica a posição do ligante gerada computacionalmente (pose) de menor energia. Os detalhes computacionais do algoritmo ACO no livro texto escrito pelos desenvolvedores do método (DORIGO; STÜTZLE, 2004); a ideia biológica é a procura por alimento das formigas. Enquanto buscam por alimento, as formigas se deslocam em volta da colônia, e neste deslocamento depositam uma molécula denominada feromônio no solo. As formigas se comunicam por meio da trilha de feromônio deixada no solo. Considerando-se o

comportamento de uma formiga isolada, esta, quando acha alimento, carrega o máximo que pode de volta para colônia e deixa uma trilha de feromônio no seu caminho de volta. O feromônio depositado no solo é baseado na quantidade e na qualidade do alimento encontrado. Outras formigas podem sentir o cheiro do feromônio ao sair do formigueiro. Quanto mais alto o nível de feromônio da trilha, maior é a chance de uma dada formiga seguir esta trilha. Quanto mais formigas seguem uma determinada trilha, maior é o reforço no feromônio desta trilha. Consideremos que temos duas trilhas possíveis para se chegar até a fonte de alimento a partir da colônia de formigas, uma curta e outra longa. Inicialmente não temos feromônio depositados nas trilhas. Vamos considerar a saída de duas formigas, uma em cada trilha (Figura 19-A). As distâncias das trilhas são diferentes, a formiga que segue a trilha curta chega antes à fonte de alimento (Figura 19-B). Depois de encontrar o alimento elas carregam parte do alimento de volta à colônia deixando um rastro de feromônio sobre as trilhas. A formiga que segue a trilha mais curta chega antes à colônia (Figura 19-C). Quando uma terceira formiga sai do formigueiro em busca de alimento, esta seguirá a trilha mais curta (Figura 19-D), devido ao mais alto nível de feromônio desta. Quando a formiga seguindo a trilha longa chegar à colônia, outras formigas já saíram da colônia seguindo a trilha mais curta (Figura 19-E). A próxima formiga a sair do formigueiro tem 50 % de chance de seguir cada caminho, assim digamos que ela escolheu a trilha mais longa (Figura 19-E). A repetição contínua do processo (iteração), leva à prevalência da escolha da trilha mais curta (Figura 19-F).

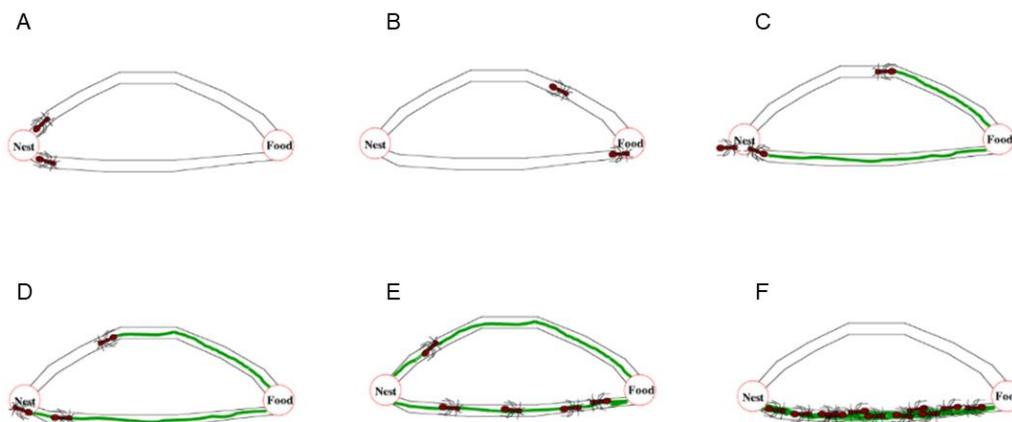


Figura 19. Sequência de etapas do algoritmo ACO. A) Saída das formigas por trilhas distintas. B) A formiga da trilha mais curta chega antes ao alimento. C) As formigas retornam ao formigueiro deixando feromônio sobre a trilha (indicado em verde nos desenhos). D) A terceira formiga segue a trilha mais curta devido a presença de feromônio. E) As três formigas seguintes seguem a trilha mais curta e a sétima formiga segue a trilha mais longa, que agora tem indicação de feromônio. F) A repetição do processo leva ao fortalecimento do feromônio da

trilha mais curta. Imagem modificada a partir de sequência de figuras disponível no site: <https://towardsdatascience.com/the-inspiration-of-an-ant-colony-optimization-f377568ea03f> (acesso em 30 de julho de 2020).

### 4.3. Função Escore

A função escore na simulação de docking molecular tem o objetivo de achar a “melhor posição da chave na fechadura”, o “melhor”, computacionalmente, significa o menor valor da função escore calculado para uma dada posição do ligante no bolsão de ligação. De uma forma geral, podemos dizer que a função escore é uma equação que tem como entrada as coordenadas atômicas do complexo proteína-ligante. As coordenadas atômicas dos complexos proteína-ligante são armazenadas em um arquivo no formato Protein Data Bank (PDB) (BERMAN, 2000; BERMAN et al., 2002; WESTBROOK et al., 2003).

Só para ilustrar, vamos destacar as partes do arquivo PDB que são lidas pelos programas que realizam simulações de docking molecular. Quando uma estrutura de proteína é resolvida, terminamos com um arquivo texto simples com as coordenadas atômicas de cada átomo. A Figura 20 traz a identificação de cada campo de informação contida numa linha de um arquivo PDB com coordenadas atômicas. Nos arquivos PDB, além das coordenadas atômicas, há informações sobre a sequência da proteína, detalhes da técnica usada para resolução da estrutura, os autores, entre outros dados.

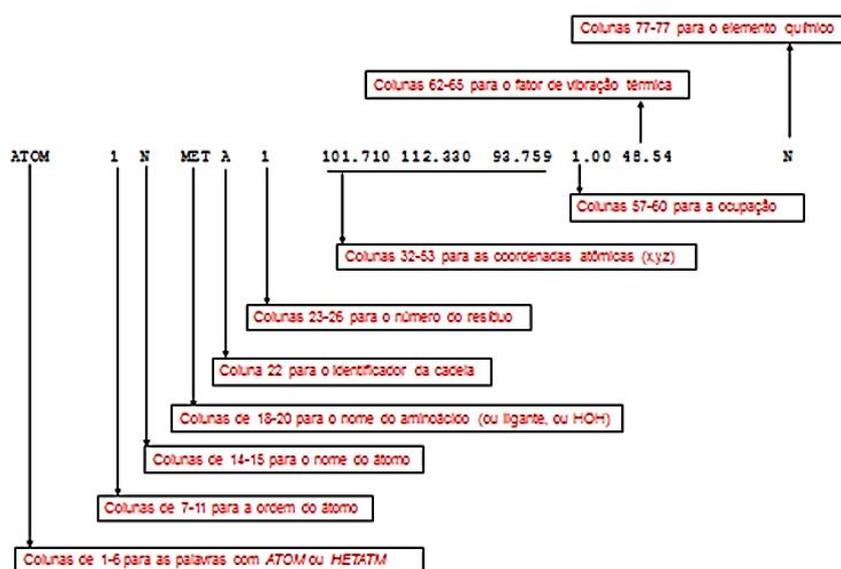


Figura 20. Identificação dos campos de informação do arquivo PDB. A linha mostrada armazena as coordenadas atômicas de um átomo de uma proteína. As coordenadas x,y,z estão em Å. O fator de ocupação indica a porcentagem de um átomo nas coordenadas indicadas, 1 indica 100 %. Números menores que 1 podem acontecer devido à desordem do empacotamento da molécula no cristal, por exemplo, átomos da cadeia lateral de um aminoácido, devido à sua flexibilidade, podem aparecer em duas ou mais posições quando da análise da estrutura cristalográfica. Essa situação é indicada com um fator de ocupação menor que 1 para o átomo que apresenta duas ou mais posições, porém, no total, a soma tem que ser 1. O último número indica o fator de vibração térmica, quanto maior este número, maior a amplitude de oscilação do referido átomo.

As informações sobre as coordenadas x,y,z dos átomos são identificadas pelas palavras-chaves “ATOM” e “HETATM” no início da linha. Se uma linha começa com “ATOM”, indica que a linha se refere a um átomo de proteína. Para uma linha que começa com “HETATM”, o que segue são informações sobre átomos não proteicos, que podem ser as coordenadas atômicas de ligantes não proteicos, RNA, DNA, co-fatores usados para facilitar a cristalização e moléculas de água. Quando vão calcular o valor da função escore para uma dada posição de um ligante, os programas de docking molecular usam as coordenadas x,y,z armazenadas dessa forma.

A Figura 21 ilustra a equivalência de cada coordenada atômica com a posição dos átomos na estrutura de uma proteína. Na figura temos poucos átomos, só para ilustrar a equivalência entre as coordenadas atômicas e a representação gráfica dos átomos. Essa figura nos dá uma ideia geral de como os programas gráficos usam as coordenadas atômicas para desenhar átomos e

moléculas.

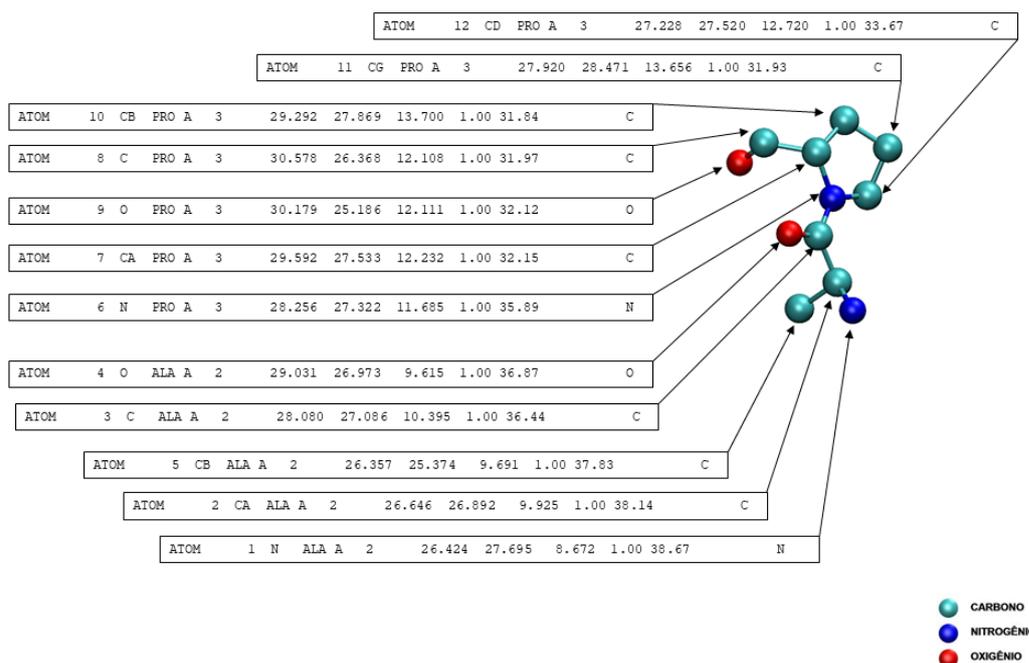


Figura 21. Equivalência entre as coordenadas atômicas e a representação gráfica de moléculas. Na figura temos o detalhamento da estrutura, onde vemos as coordenadas atômicas usadas para gerar as posições para cada átomo da figura, exceto os hidrogênios. As coordenadas atômicas estão em angstrom (Å). A legenda de cores dos átomos está mostrada abaixo à direita.

Cada tipo de programa para simulação de docking molecular adota um tipo de função escore, às vezes várias, como no caso do MVD. Essa diversidade de abordagens, na verdade, reflete a limitação das funções escores na estimativa da energia de interação do ligante com a proteína. Métodos mais precisos para o cálculo da energia de interação do complexo proteína-ligante podem ser conseguidas por meio de métodos de mecânica quântica (RATHORE et al., 2013) e dinâmica molecular (DE AZEVEDO, 2011; BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019g). A limitação desses métodos é o custo computacional alto, quando comparado com funções escores (BITENCOURT-FERREIRA & DE AZEVEDO, 2019a).

Uma das formas de estimar a energia da interação de um ligante por uma proteína é por meio de funções escore. A função MolDock Score calcula a energia de interação do sistema proteína-ligante ( $V$ ) por meio da seguinte expressão,

$$V = V_{inter} + V_{intra} \text{ (equação 1)}$$

Onde  $V_{inter}$  indica a energia intermolecular calculada pela seguinte equação,

$$V_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}}^{M1} \sum_{j \in \text{proteína}}^{M2} \left[ V_{PLP}(r_{ij}) + 332 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}} \right]$$

(equação 2)

Na equação (2) as somatórias são feitas para todos os átomos da proteína (M1 indica o número de átomos da proteína) e do ligante (M2 indica o número de átomos do ligante). O  $V_{PLP}$  é o potencial por partes (*piecewise linear potential* em inglês) detalhado no artigo Thomsen & Christensen, 2006. As cargas dos átomos são indicadas por  $q_i$  e  $q_j$  e a distância interatômica é representada por  $r_{ij}$ , sendo  $i$  do ligante e  $j$  da proteína. A distância interatômica ( $r_{ij}$ ) é determinada a partir das coordenadas atômicas armazenadas nos arquivos PDB (Figura 19). A distância ( $r_{ij}$ ) entre um átomo do ligante ( $i$ ) e outro da proteína ( $j$ ) tem a seguinte expressão,

$$r_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \text{ (equação 3)}$$

onde  $x_i, y_i, z_i$  e  $x_j, y_j, z_j$  indicam as coordenadas atômicas do ligante e da proteína, respectivamente. As coordenadas atômicas lidas do arquivo PDB estão em Å e, consequentemente, o  $r_{ij}$  é expresso em Å.

Na equação (1) o termo  $V_{intra}$  indica o potencial intramolecular e tem a seguinte forma,

$$V_{intra} = \sum_{i \in \text{ligante}}^{M1} \sum_{j \in \text{ligante}}^{M1} V_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} [1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + V_{clash}$$

(equação 4)

Na equação (4), M1 representa o número de átomos no ligante,  $\theta$  e  $\theta_0$  representam ângulos de torção do ligante,  $m$  é um inteiro relacionado com a geometria do ângulo de torção,  $r_{ij}$  a distância interatômica (equação 3) e  $V_{clash}$  é uma penalidade para átomos com distância interatômica menor que 2 Å (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

#### 4.4. Avaliação dos Resultados de Docking Molecular

Antes de usarmos um determinado protocolo de docking molecular, é necessário realizarmos sua validação, usando-se a estrutura cristalográfica de um complexo proteína-ligante, onde tentamos recuperar computacionalmente a posição do ligante (redocking). A posição do ligante gerada na simulação de docking molecular é chamada pose. A principal forma de avaliarmos um determinado protocolo de docking molecular é por meio do cálculo do desvio médio quadrático de docking (em inglês, docking root mean square deviation) (RMSD). De uma forma geral, espera-se que a pose esteja o mais próximo possível da posição cristalográfica do ligante. Consideramos razoável um RMSD < 2 Å. O RMSD tem a seguinte expressão,

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [(x_{x,i} - x_{p,i})^2 + (y_{x,i} - y_{p,i})^2 + (z_{x,i} - z_{p,i})^2]}{N}}{a}} \quad (\text{equação 5})$$

Na equação (5)  $x_{x,i}, y_{x,i}, z_{x,i}$  indicam as coordenadas atômicas do ligante cristalográfico,  $x_{p,i}, y_{p,i}, z_{p,i}$  indicam as coordenadas atômicas da pose (gerada na simulação de docking molecular) e N indica o número de átomos no ligante (BITENCOURT-FERREIRA & DE AZEVEDO, 2019a). Neste estudo, para a validação do protocolo de docking molecular foi usada a estrutura 5TGZ (HUA et al., 2016). As coordenadas atômicas dos agonistas inversos (rimonabanto, otenabanto e taranabanto) foram obtidas da base de dados do ZINC (IRWIN; SHOICHET, 2005; IRWIN et al., 2012). Usamos o programa MVD em todas as simulações de docking molecular. As cargas dos átomos dos ligantes e da proteína foram determinadas usando-se o sistema de atribuição de cargas parciais do MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

As simulações de docking molecular com o programa MVD geram mais de uma posição do ligante (pose), o que nos permite investigar se há uma correlação positiva entre os RMSDs de docking e os valores da energia de ligação calculadas pela função MolDock Score. Usamos o coeficiente de correlação de Spearman (ZAR, 1972) para a avaliação desses resultados. Nas avaliações das correlações, consideramos significativas correlações acima de 0,5 (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019a).

#### 4.5. Avaliação da Interação Proteína-Ligante

Usamos o programa LigPlot+ para avaliarmos a interação proteína-ligante (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Esse programa usa as coordenadas atômicas do complexo proteína-ligante e gera um diagrama esquemático bidimensional, mapeando as interações intermoleculares. Esse tipo de representação padroniza a análise das interações intermoleculares, facilitando a comparação e destacando aspectos relevantes

das interções proteína-ligante. De forma geral, consideradas as etapas previamente descritas, podemos colocar na forma de um fluxograma todas as etapas executadas para o estudo computacional das interações de ligantes com o CB 1. A Figura 22 ilustra todas as etapas.

Como ilustrado no fluxograma, inicialmente buscamos no PDB as estruturas cristalográficas do CB1. Na sequência, selecionamos uma das estruturas que tenha um ligante complexado à estrutura. Depois analisamos a estrutura com o MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), cruzando com as informações do PDB para identificamos entre os ligantes aqueles que são agonistas, antagonistas, ou agonistas inversos. Essa estrutura complexada é usada para os testes dos protocolos de docking molecular (XAVIER et al., 2016). Entre os protocolos de docking molecular testados, selecionamos aquele que gera menor RMSD. Aplicamos o melhor protocolo de docking molecular para identificar a posição de ligantes para os quais não há informação cristalográfica. As coordenadas atômicas dos ligantes para os quais não há estrutura cristalográfica foram obtidas da base de dados ZINC (IRWIN; SHOICHET, 2005; IRWIN et al., 2012). Depois, analisamos todas as estruturas dos complexos proteína-ligante com o LigPlot+ (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). A partir dos resultados gerados pelo LigPlot+, analisamos as interações intermoleculares dos complexos proteína-ligante.

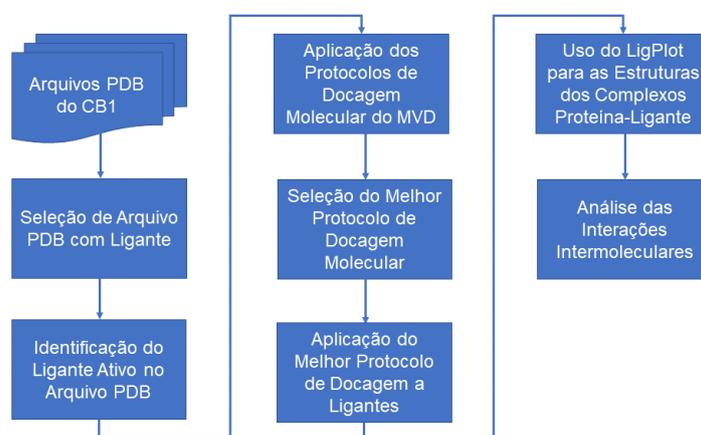


Figura 22. Fluxograma para a análise computacional das interações intermoleculares entre o CB1 e ligantes.

## 5. RESULTADOS

Durante o período de doutorado foram redigidos dois artigos científicos: Russo & de Azevedo, 2019 (publicado), Russo & de Azevedo, 2020 (aceito para publicação). Ambos em periódico com fator de impacto acima de 4,1 (Current Medicinal Chemistry).

## **5.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO ARTIGO 1**

### **5.1.1. Análise da Estrutura do Receptor de Canabinoide 1**

Realizamos uma busca no PDB usando a sequência de aminoácidos do CB1 (busca realizada em 27 de novembro de 2017). Dessa busca retornaram nove estruturas tridimensionais com identidade sequencial de 25 % ou mais alta com a sequência de busca. Além das quatro estruturas cristalográficas do CB1, a busca encontrou estruturas do Receptor de Adenosina 2A (A2A) (códigos de acesso PDB: 3PWH, 3REY, 3RFM, 3UZA, 3UZC) (DORE et al., 2011; CONGREVE et al., 2012). As estruturas de A2A apresentam uma identidade sequencial de 25 % com a estrutura do CB1. Essas estruturas apresentam o enovelamento característico com sete hélices transmembranares formando um pacote de hélices. Uma outra proteína que apresenta esse enovelamento é a rho (código de acesso PDB: 1F88) (PALCZEWSKI et al., 2000). A Figura 23 apresenta o alinhamento sequencial dessas proteínas (rho, CB1 e A2A), que têm o pacote de sete hélices transmembranares. O CB1 apresenta uma oitava hélice alfa curta no C-terminal. O CB1 apresenta uma sequência alinhada com as hélices das outras duas proteínas, como destacado na Figura 23.

A estrutura cristalográfica do CB1 em complexo com a molécula AM6538 (código de acesso PDB: 5TGZ) (HUA, et al., 2016) está detalhada na Figura 24. A análise da estrutura do CB1 revela que as hélices alfa variam de tamanho entre 25 a 35 resíduos de aminoácidos e não se alinham perpendicularmente aos fosfolipídios da bicamada, como observado para a estrutura da rho (código de acesso PDB: 1F88). A estrutura do CB1 mostra o pacote de hélices alfa que envolve as seguintes faixas de resíduos de aminoácidos: hélice I (Pro 112-His 143), hélice II (Ser 152-Val 179), hélice III (Arg 186-Arg 220), hélice IV (Arg 230-Gly 254), hélice V (Lis 273-His 304), hélice VI (Asp 333-Ile 362) e hélice VII (Lis 373-Arg400) (Figura 24 A).

Além do pacote de hélices transmembranares, há, na estrutura do CB1, três alças extracelulares (ECL1–ECL3) e mais três intracelulares (ICL1–ICL3) que conectam estas hélices. O terminal amina tem 14 resíduos (Gly 99-Asn 112) e forma uma alça com forma de V, que se insere no bolsão de ligação de antagonista e funciona como uma tampa o que limita o acesso ao bolsão de ligação a partir do meio extracelular (Figuras 24 A e 24 B). A alça ECL2 apresenta 18 resíduos (Trp 255-Asp 272) enovelando-se num arranjo complexo que expõe



na vizinhança do bolsão de ligação de antagonista do CB1 na hélice VII (Pro 358) serve para torcer esta hélice, o que resulta na aproximação dos resíduos Leu 359 e Met 363 deste bolsão de ligação. Resumindo, as torções identificadas no pacote de hélices alfa da estrutura do CB1 permitem um empacotamento mais denso destas hélices e criam um bolsão de ligação com um volume de 424,3 Å<sup>3</sup> (Figura 24 C), suficiente para receber as moléculas de agonistas inversos.

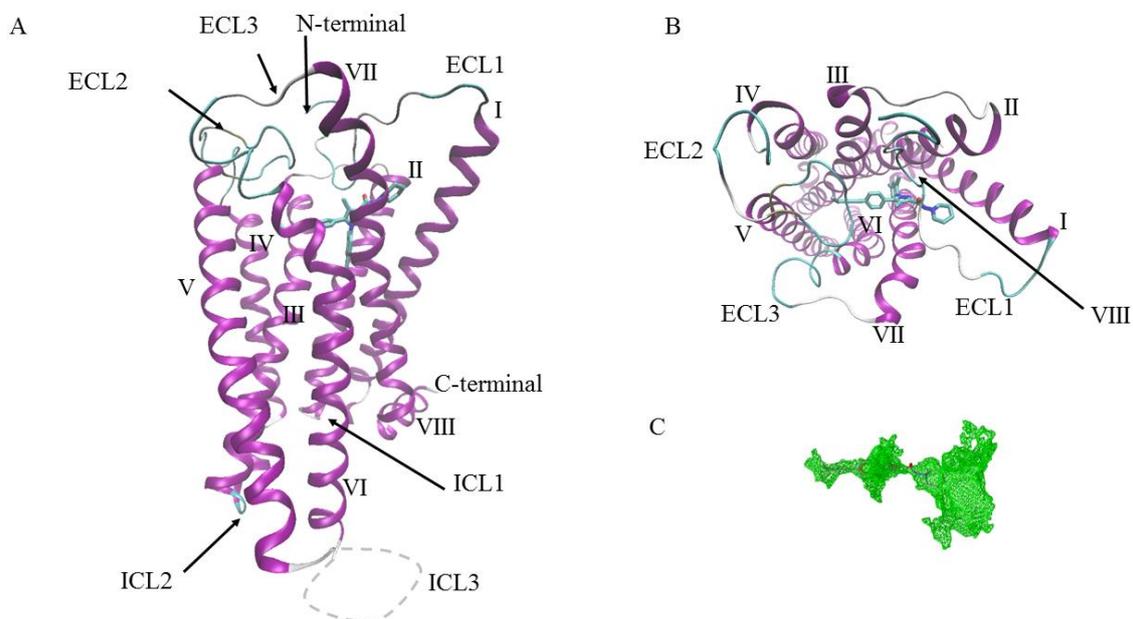


Figura 24. Estrutura cristalográfica do CB1 e AM6538 (código de acesso PDB: 5TGZ) (HUA et al., 2016). A) Vista de perfil da estrutura cristalográfica do CB1. A parte superior está voltada para o meio extracelular quando o CB1 está inserido na bicamada fosfolipídica. B) Vista de cima da estrutura do CB1. C) Visualização da cavidade acessível ao sovente (gradeado verde) do bolsão de ligação do CB1. As Figuras 24 A e B foram geradas com o programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). A Figura 24 C foi gerada com o programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Figuras extraídas do artigo RUSSO; DE AZEVEDO, 2019.

A Figura 25 mostra detalhes estruturais do bolsão de ligação de agonistas inversos do CB1. Nesta parte da estrutura há a participação de resíduos que estão envolvidos na torção das estruturas helicoidais. Foi observado, na estrutura da rho (PALCZEWSKI et al., 2000), um sistema elaborado de moléculas de água, interconectadas por ligações de hidrogênio.

Uma análise detalhada das ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de água, entre as hélices da estrutura cristalográfica do CB1, revela uma ligação de hidrogênio mediada por água nos resíduos de aminoácidos Arg 214 (hélice III) e Gly 334 (hélice VI) e uma ligação de hidrogênio (sem a participação de

molécula de água) com a Tyr 224 (hélice curta entre as hélices III e IV) e Asp 213 (hélice III). O número menor de ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água na estrutura do CB1 é devido ao número reduzido destas moléculas identificadas no CB1 (sete moléculas de água), contra 27 moléculas de água na estrutura da rho.

A identificação de moléculas de água em estruturas de proteínas resolvidas a partir da técnica de cristalografia por difração de raios X é dependente de diversos fatores (CANDURI; DE AZEVEDO, 2008), notadamente a resolução cristalográfica. Quanto melhor (menor número absoluto) a resolução cristalográfica, mais precisa é a estrutura, o que permite a identificação maior número, em média, de moléculas de água. O que, para essas duas estruturas, não pode ser usado como explicação para diferença no número de moléculas de água, visto que ambas foram resolvidas com a mesma resolução cristalográfica, 2,80 Å.

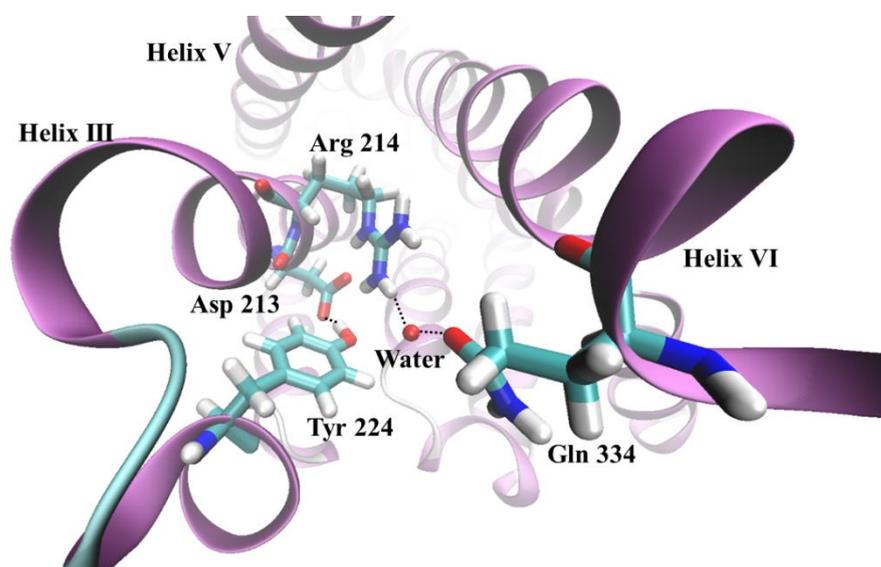


Figura 25. Rede de ligações de hidrogênio na estrutura do CB1. Esta figura foi gerada com o programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY et al., 1996). Figura extraída do artigo RUSSO, DE AZEVEDO, 2019.

### 5.1.2. Simulações de Docking Molecular

Para validação do protocolo de docking molecular usando-se o MVD, nós simulamos o encaixe da molécula AM6538 (código do ligante: ZDG) contra a estrutura do CB1 (código de acesso PDB: 5TGZ). A Figura 26 mostra os resultados de docking molecular. As coordenadas cartesianas do centro da esfera de docking são  $x = 43,44 \text{ \AA}$ ;  $y = 27,17 \text{ \AA}$ ;  $z = 318,99 \text{ \AA}$ , com um raio da esfera de docking molecular de  $14 \text{ \AA}$  (Fig. 26 A). O melhor RMSD de docking

obtido foi de 0,8 Å (Fig. 26 B). A análise dos resultados de docking molecular para todas as poses geradas indica um coeficiente de correlação de Spearman de 0,63 entre o RMSD de docking contra a energia de ligação calculada pela função MolDock Score. (Fig. 26 C). Esse valor de correlação é levemente significativo.

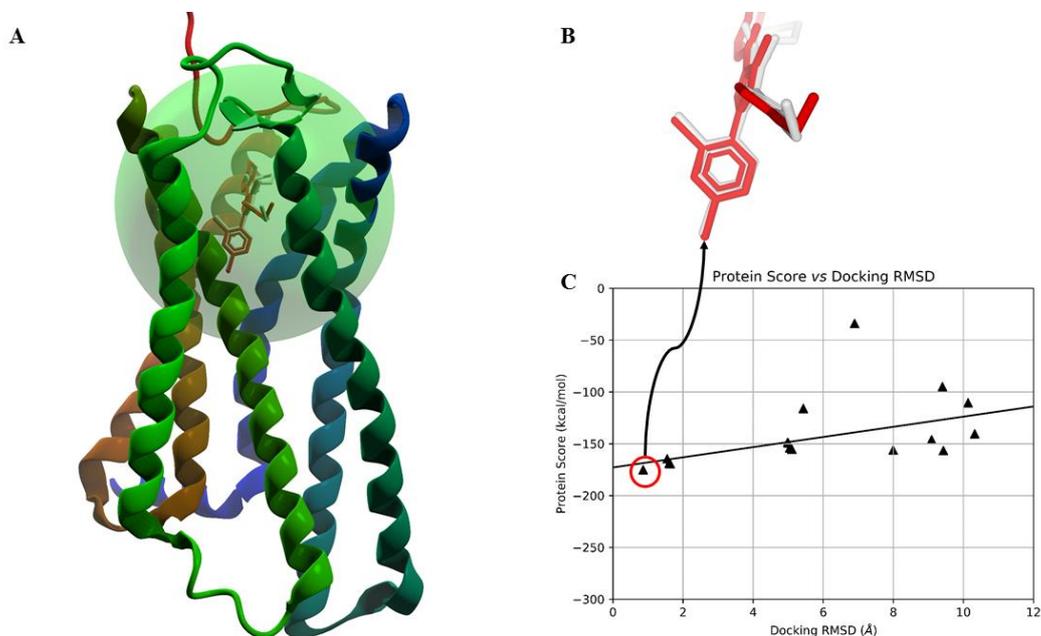


Figura 26. Resultados do re-docking com a estrutura do CB1 (código de acesso PDB: 5TGZ). A) Estrutura do CB1 com a esfera de docking (em verde) usada em todas as simulações. A estrutura mostra a pose (em vermelho) e a posição cristalográfica do ligante (cinza claro) AM6538. B) Resultado da simulação de docking mostra a pose (em vermelho) e a posição cristalográfica do ligante (cinza claro) AM6538. C) Gráfico de dispersão entre o valor previsto de energia e o RMSD de docking. Cada triângulo no gráfico de dispersão indica uma pose gerada nas simulações de docking molecular realizadas com o programa MVD. As Figuras 26 A e B foram geradas com o programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). A Figura 26 C foi gerada com o programa SAnDReS (XAVIER et al., 2016). Figuras extraídas do artigo RUSSO, DE AZEVEDO, 2019.

A aplicação do melhor protocolo de docking molecular usando o programa MVD, que foi o uso da combinação do algoritmo da ACO com a função Moldock Score, mostrou os detalhes do modo de ligação das moléculas rimonabanto, otenabanto e taranabanto, contra a estrutura do CB1. A Figura 27 mostra os resultados das simulações de docking molecular (poses) para os agonistas inversos rimonabanto, otenabanto e taranabanto comparada com a posição cristalográfica da molécula AM6538. Na figura 27, vemos claramente a boa superposição das posições geradas computacionalmente dos agonistas inversos

(rimonabanto, otenabanto e taranabanto) com a posição cristalográfica da molécula AM6538.

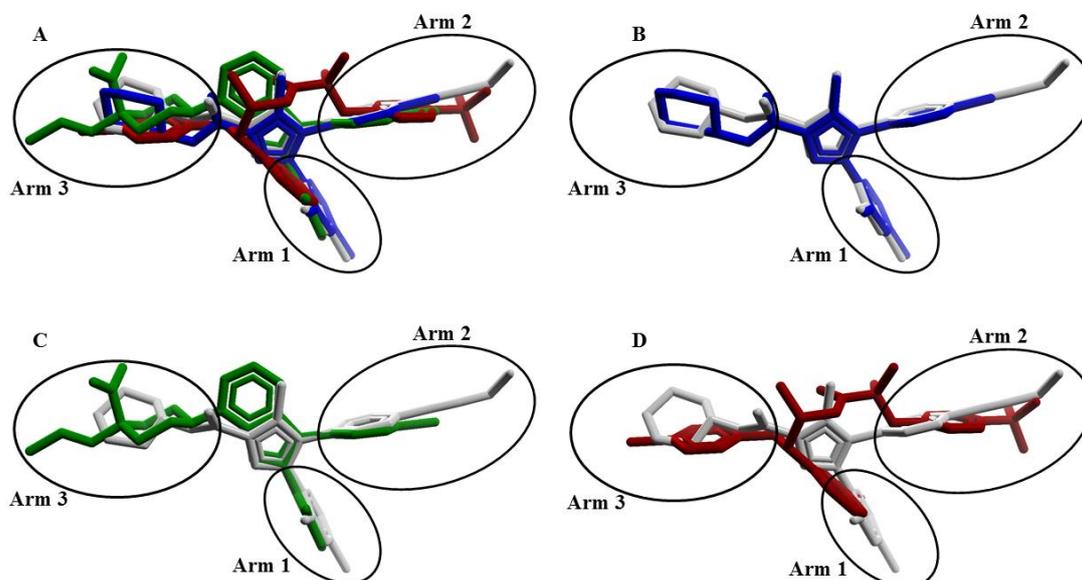
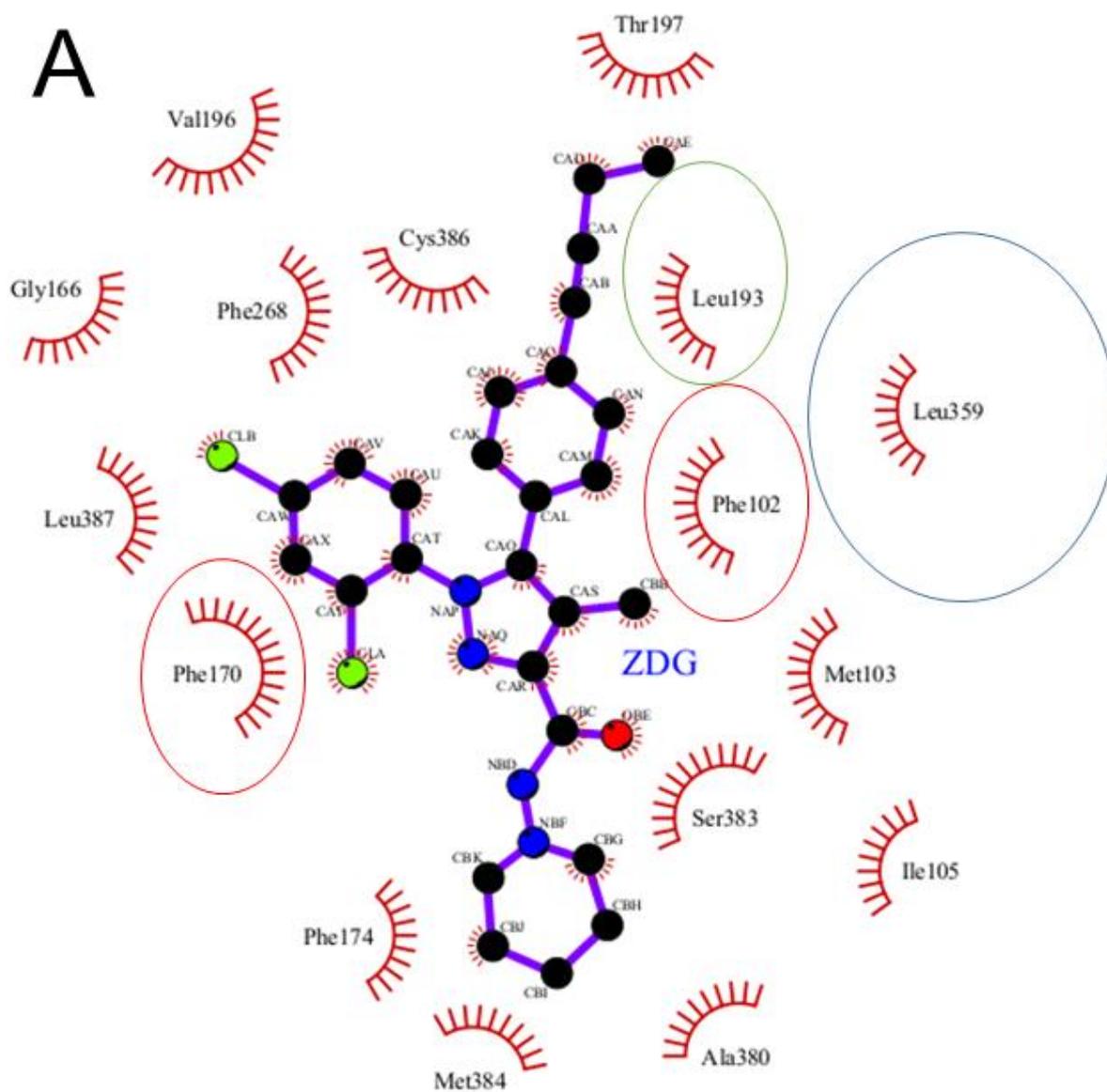


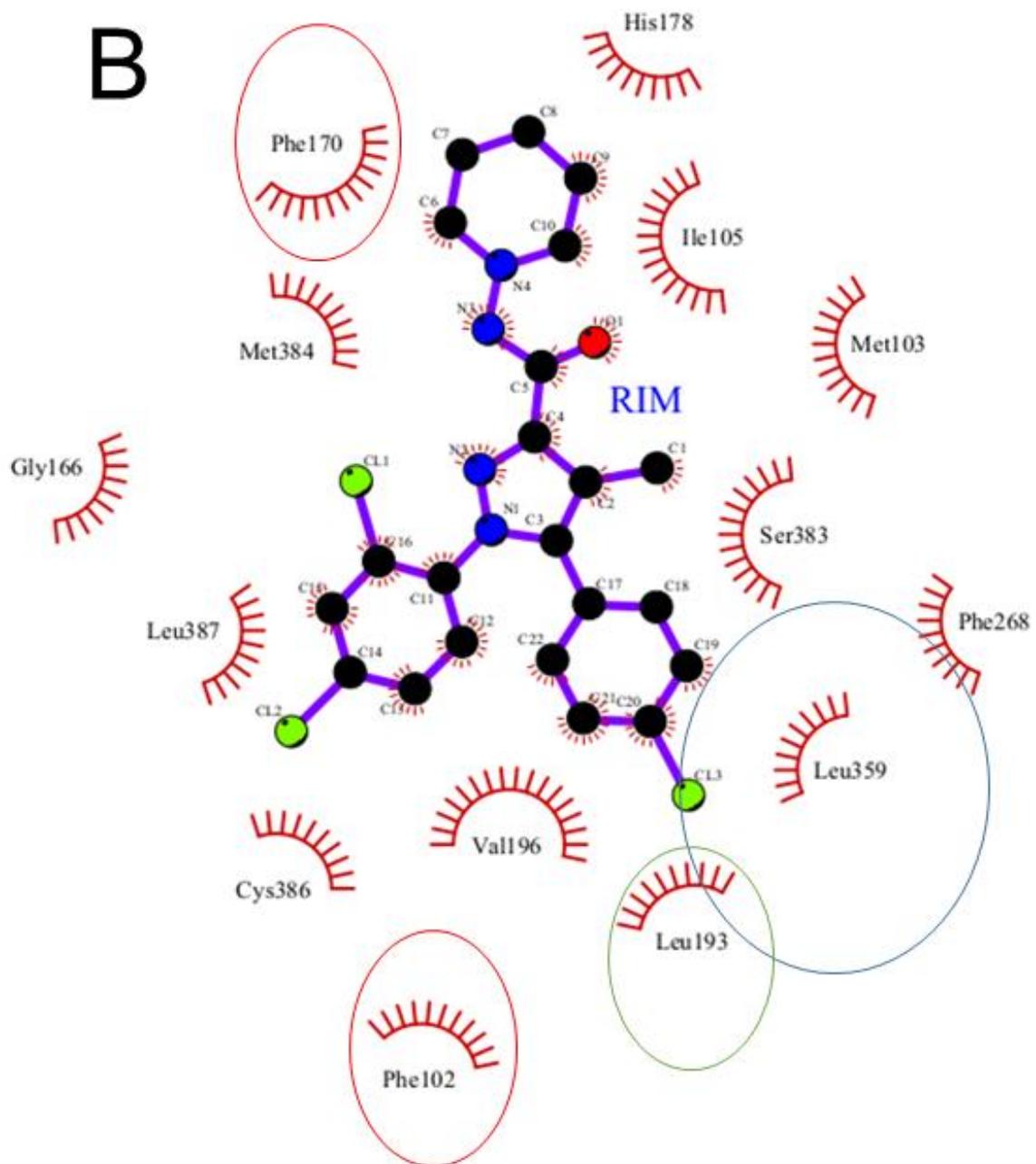
Figura 27. Docking molecular (poses) dos agonistas inversos. A) Todas as quatro estruturas dos agonistas inversos. B) Estruturas dos AM6538 (cinza) e rimonabanto (ZINC01540228) (azul). C) Estruturas dos AM6538 (cinza) e otenabanto (ZINC03948997) (verde). D) Estruturas dos AM6538 (cinza) e taranabanto (ZINC28701758) (vermelho). As Figuras foram geradas com o programa Molegro Virtual Docker (MVD) (Thomsen & Christensen, 2006). Figuras extraídas do artigo RUSSO, DE AZEVEDO, 2019.

### 5.1.3. Interações Intermoleculares entre CB1 e agonistas inversos

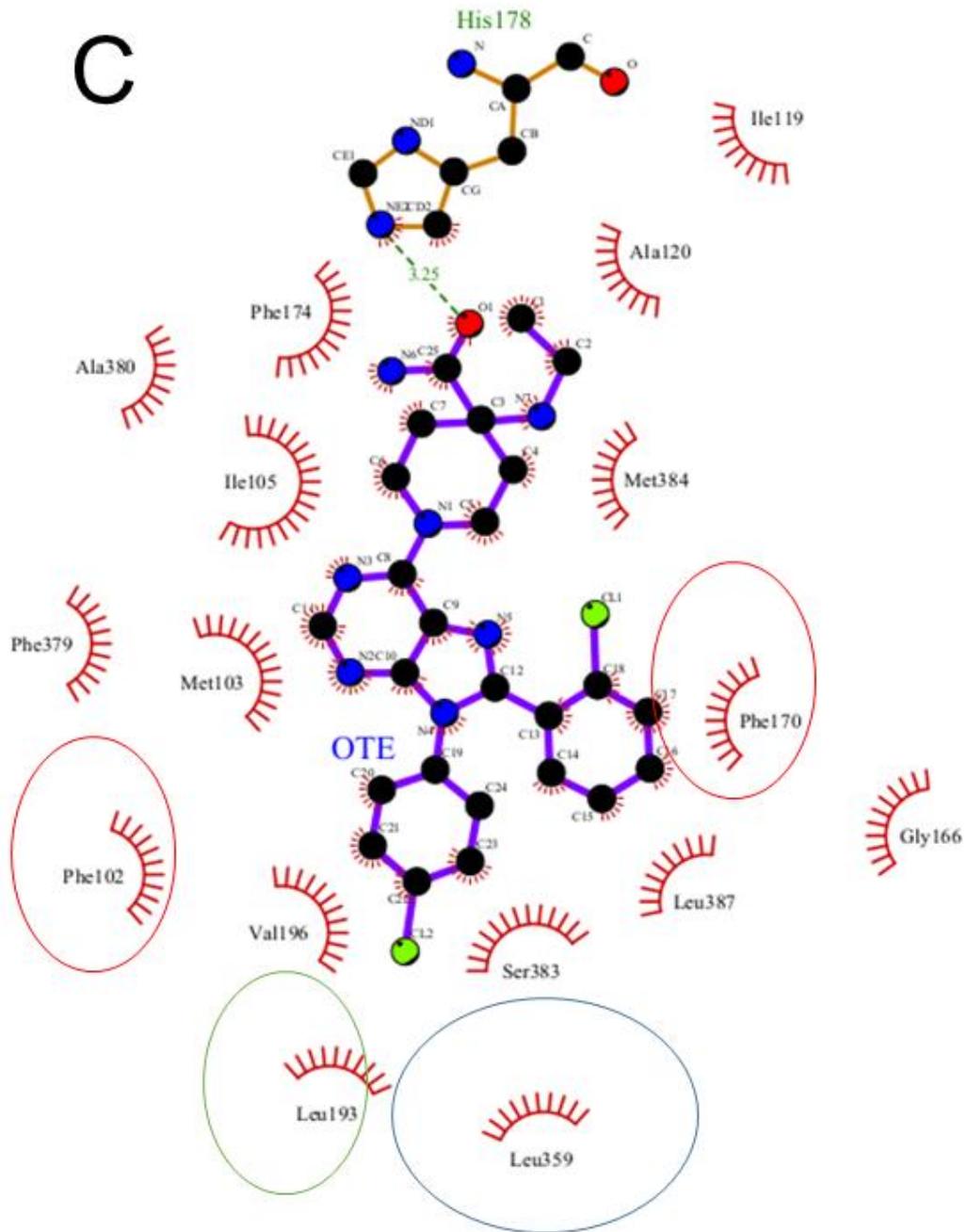
Para investigar as interações intermoleculares envolvendo CB1 com ligantes usamos o programa LigPlot+ (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Os resultados dessa análise estão destacados na Figura 28. A análise das interações para estrutura cristalográfica do complexo CB1-AM6538 (Figura 28 A) mostra uma rede intrincada de contatos de van der Waals, como foi previamente reportado (HUA, et al., 2016).

# A





C



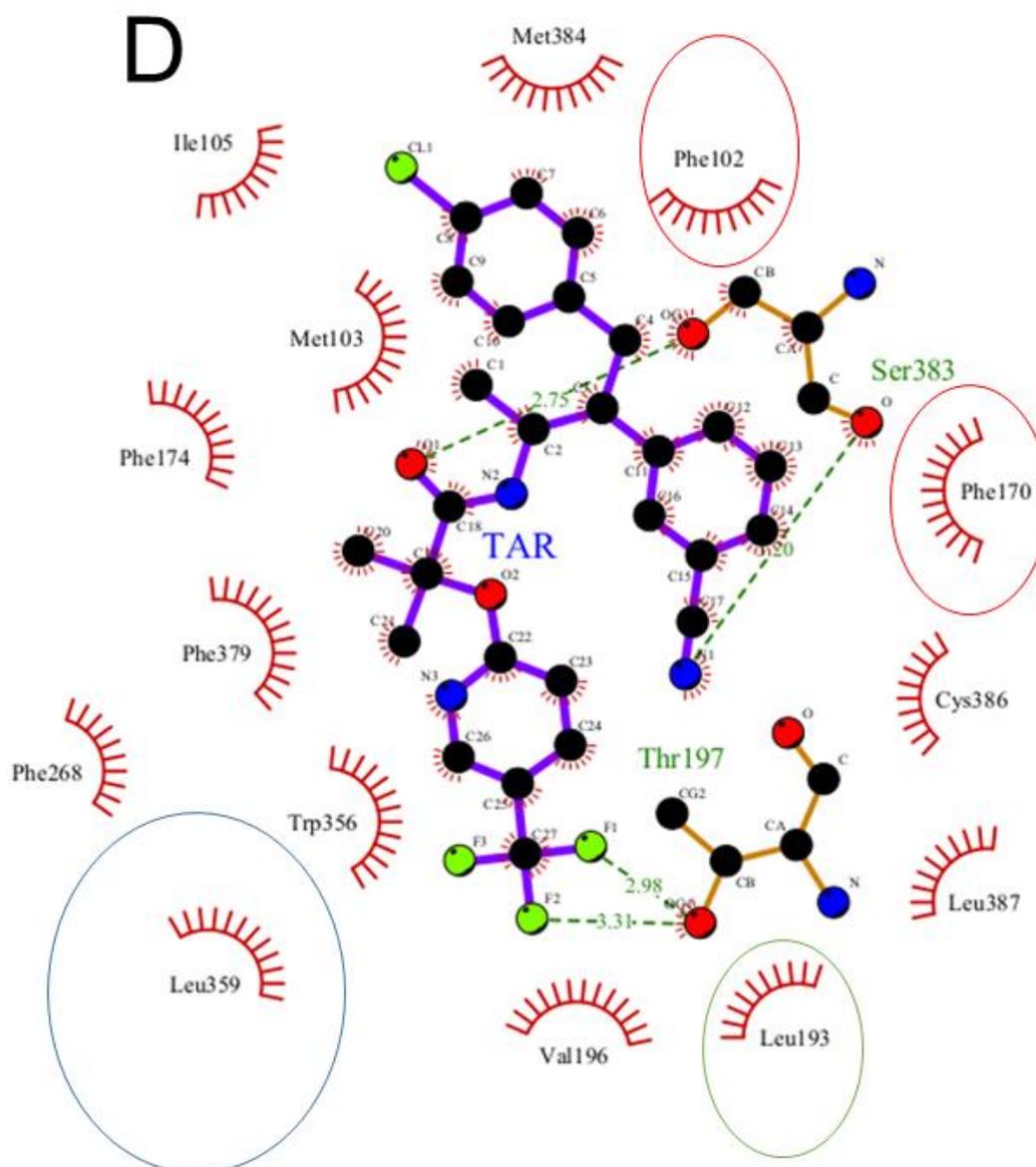


Figura 28. A análise das interações intermoleculares entre agonistas inversos e o CB1. A) AM6538, B) rimonabanto (ZINC01540228), C) otenabanto (ZINC03948997), D) taranabanto (ZINC28701758). Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas tracejadas com a indicação da distância em Å. Os resíduos de aminoácidos que participam de ligações de hidrogênio têm suas estruturas desenhadas com todos os átomos. Os resíduos de aminoácidos que participam de contatos de van der Waals são desenhados como semicírculos com raios divergentes. Os átomos dos ligantes que participam de interações de van der Waals têm desenhos de raios divergentes nos círculos que representam os átomos. As figuras foram geradas com o programa LigPlot+ (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Figuras extraídas do artigo RUSSO; DE AZEVEDO, 2019.

Na estrutura do complexo CB1- AM6538 (Figura 28 A) (código de acesso PDB: 5TGZ) não há ligações de hidrogênio intermoleculares entre o CB1 e a molécula AM6538 (código de ligante: ZDG). Vemos, principalmente, interações hidrofóbicas com o amino terminal e a alça ECL2. Há, também, interações hidrofóbicas com quase todas as hélices do CB1, com exceção da hélice IV. Vemos na estrutura da molécula AM6538 um anel central (anel pirrole) com três braços que, seguindo a nomenclatura proposta por HUA et al., 2016, são chamados braços 1, 2 e 3 (Figura 27).

No complexo CB1-AM6538, o anel pirrole localiza-se entre as hélices II e VII, onde observamos contatos hidrofóbicos entre as cadeias laterais da Phe 170 (hélice II) e da Ser 383 (hélice VII) (Figura 28 A). A maioria dos contatos com o braço 1 da molécula AM6538 envolve os resíduos das hélices II (Gly 166 e Phe 170), III (Val 196) e VI (Cys 386 e Leu 387). O braço 1 faz interações  $\pi$ - $\pi$  com o resíduo Phe 170 e com átomos da cadeia principal do resíduo Gly 166. Observamos, ainda, contatos com o resíduo Phe 268.

Considerando-se as interações intermoleculares do braço 2 da estrutura da molécula AM6538, nós observamos interações  $\pi$ - $\pi$  com os resíduos Phe 102 e Phe 268. Nós identificamos, também, contatos hidrofóbicos com a hélice III (Leu 193 e Val 196) e VI (Leu 359). Finalmente, para o braço 3 da molécula AM6538, não identificamos interações  $\pi$ - $\pi$  com os resíduos de aminoácidos do CB1. Observamos contatos hidrofóbicos do braço 3 da molécula AM6538 com os seguintes resíduos de aminoácidos: Met 103, Ile 105, Phe 170, Phe 174, Ala 380, Ser 383 e Met 384. Em resumo, as interações intermoleculares da molécula AM6538 com o CB1 envolvem somente contatos de van der Waals. A análise das interações intermoleculares realizada com o LigPlot+ não identificou ligações de hidrogênio intermoleculares no complexo CB1-AM6538. Um aspecto ao ser destacado, é o papel do resíduo de aminoácido Phe 170, que interage com o anel central e com os braços 1 e 3 da molécula AM6538.

A análise da estrutura do complexo CB1-rimonabanto, obtida por simulação de docking molecular, revela uma rede de contatos de van der Waals similares aos observados para a estrutura cristalográfica do complexo CB1-AM6538 (Figuras 28 A e 28 B). Não observamos ligações de hidrogênio intermoleculares entre rimonabanto e CB1. A estrutura do anel pirrole da molécula de rimonabanto ocupa aproximadamente o mesmo sítio de ligação do anel pirrole da molécula de AM6538 (Figura 27 B).

A estrutura obtida por docking molecular do rimonabanto apresenta também posicionamento similar para os braços da estrutura, quando comparado

com a molécula AM6538. Entre os 16 resíduos de aminoácidos envolvidos em contatos de van der Waals com a molécula AM6538, três resíduos não são observados na estrutura do rimonabanto; são eles Phe 174, Thr 197 e Ala 380. Além disso, nós observamos a interação da His 178 no complexo CB1-rimonabanto. Esse resíduo não apresenta interações intermoleculares na estrutura do complexo CB1-AM6538 (Figuras 28 A e 28 B). Essas pequenas diferenças, observadas na rede de contatos de van der Waals entre os dois complexos, são provavelmente devido à cadeia mais longo do braço 2 na molécula AM6538 e ao posicionamento diferente do braço 3 na estrutura do rimonabanto (Figura 27B).

Para o complexo CB1-otenabanto obtido por docking molecular, nós observamos uma ligação de hidrogênio intermolecular envolvendo o resíduo His 178 (Figura 28 C). Esta histidina mostra contatos de van der Waals no complexo CB1-rimonabanto, mas sem ligações de hidrogênio com o rimonabanto. Tomando a estrutura do complexo CB1-AM6538 como referência, nós não observamos interações intermoleculares envolvendo os resíduos Thr 197, Phe 268 e Cys 386. Há quatro contatos adicionais com o ligante otenabanto, além de His 178, nós observamos contatos de van der Waals envolvendo os resíduos Ile 119, Ala 120 e Phe 379. Essas diferenças no padrão de interações intermoleculares, são, provavelmente, devidas à maior estrutura do otenabanto, que substitui o anel pirrole encontrado nos ligantes AM6538 e rimonabanto.

Finalmente, para a estrutura do complexo CB1-taranabanto, nós observamos quatro ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo os resíduos de aminoácidos Thr 197 e Ser 383, duas interações para cada resíduo (Figura 28 D). A análise das estruturas prévias não mostrou a participação desses resíduos em ligações de hidrogênio intermoleculares. A estrutura do complexo CB1-taranabanto exibe a maioria dos contatos de van der Waals observados para a estrutura do CB1-AM6538, com duas exceções, os resíduos Gly 166 e Ala 380. O agonista inverso taranabanto apresenta interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Trp 356 e Phe 379. Nós propomos que essas diferenças podem ser devidas à substituição do anel pirrole presente nas estruturas das moléculas de AM6538 e rimonabanto por uma estrutura flexível com seis ângulos de torção, que foram colocadas com liberdade de giro durante as simulações de docking molecular do taranabanto e contra a estrutura do CB1.

#### **5.1.4. CONCLUSÃO ARTIGO 1**

A análise geral dos resultados revelou aspectos interessantes da estrutura cristalográfica do CB1-AM6538 e dos complexos do CB1 com agonistas inversos obtidos por simulação de docking molecular. Esses resultados nos permitem destacar alguns aspectos estruturais relevantes para as interações dessas moléculas com o CB1. O papel central exercido pelos resíduos Phe 170 e Leu 359 em todos os complexos de CB1 e a identificação de ligações de hidrogênio envolvendo otenabanto e taranabanto, destacam a importância da investigação das interações intermoleculares no desenho e desenvolvimento de novos agonistas inversos para o CB1. A identificação dos resíduos-chave responsáveis para a especificidade de ligantes é especialmente interessante se considerarmos o desenvolvimento de fármacos que não cruzam a barreira hematoencefálica, por exemplo, aqueles para tratar doenças metabólicas relacionadas à obesidade (HUA, et al., 2016; JANERO, et al., 2011; MAZIER, et al., 2015; COTA, 2017; TAM, et al., 2017). Por esta razão, a descrição dos resíduos-chave responsáveis pela especificidade de fármacos nos ajuda a focar na parte do agonista inverso que pode alterar a lipofilicidade. Por exemplo, adicionar doadores ou aceitadores de ligações de hidrogênio na estrutura do braço 2 da molécula de taranabanto pode aumentar a especificidade por CB1 e diminuir a lipofilicidade. Ou de outra forma, a adição de um grupo metil na estrutura do braço 3 da molécula de taranabanto tem o potencial de aumentar a lipofilicidade.

## **5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO ARTIGO 2**

A dipirona é uma pró-droga utilizada há um século no tratamento da dor moderada. O mecanismo molecular principal da ação analgésica da dipirona foi desconhecido por muito tempo. Em relação à ativação do SEC, recentemente, Santos et al. (DOS SANTOS, et al., 2014) sugeriu um possível papel da dipirona ativando o CB1. Além disso, também recentemente foi resolvida a estrutura do CB1, desta vez complexado a agonistas derivados do THC (HUA, et al. , 2017), tornando possível o uso desta estrutura na aplicação de simulações computacionais de docking molecular para investigar as interações proteína ligante que possam auxiliar no desenvolvimento de fármacos. A análise do metabolismo da dipirona indica que seu metabólito 4-aminoantipirina (4-AA) (Figura 29) é ativo e participa dos efeitos analgésicos na ativação de CB1 no SNP. Várias pesquisas mostram evidências fortes da ação de 4-AA nos CB1, tanto no SNC, como no SNP (MAIONE, et al., 2015; ESCOBAR, et al., 2012), além de ter seu efeito antagonizado por antagonistas de CB1 como AM251 (CRUNFLI; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2015). Além disso, a dipirona como agonista CB1 também foi testada em relação a seus efeitos comportamentais, tendo efeitos analgésicos, hipotérmicos e de hipomotilidade em ratos (SCHLOSBERG, et al., 2012), além de catalepsia (CRUNFLI; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2015). Esses quatro comportamentos são também observados rotineiramente com o tratamento de ratos com THC, sendo largamente usados em pesquisa e conhecidos como Testes da Tétrade Comportamental Canabinoide (FRIDE, et al., 2006). Tendo como partida os achados de que o metabólito de dipirona 4-AA age como agonista em relação a CB1 (DOS SANTOS, et al., 2014), e usando a estrutura de CB1 complexada a um agonista (HUA, et al. , 2017), nós testamos a hipótese de 4-AA como agonista do CB1 usando estudos de simulação computacional.

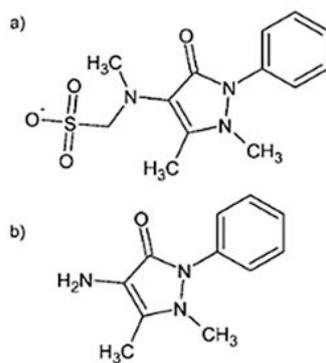


FIGURA 29. Estruturas moleculares de dipirona (a) e 4-aminoantipirina (b).

### 5.2.1. Simulações de Docking Molecular

Para validação do protocolo de docking molecular usando-se o MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), nós simulamos o docking do ligante AM11542 (código do ligante: 8D3) contra a estrutura do CB1 (código de acesso PDB: 5XRA). Nós utilizamos o algoritmo ACO como mecanismo de busca e a função escore Plants no cálculo da energia da pose, e o programa SAnDReS calculou o RMSD entre as poses e a posição cristalográfica do ligante AM11542 (XAVIER, et al., 2016). Nós realizamos o download da estrutura da molécula de 4-AA (ZINC61079) a partir do banco de dados do ZINC (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011), e da estrutura 5XRA do CB1 do PDB (BERMAN, et al., 2000) e utilizamos a mesma semente aleatória (1369043707) em todas as simulações de docking. As coordenadas cartesianas do centro da esfera de docking foram  $x = -42,18$ ;  $y = -164,18$ ;  $z = 306,52$  Å, e o raio da esfera de docking foi de 15 Å. O melhor RMSD obtido foi de 0,8 Å. Nós utilizamos a função escore Plants para gerar as poses. Depois utilizamos o programa Sandres para calcular o RMSD entre as poses e a posição cristalográfica do ligante AM11542, e a posição de menor energia apresentou RMSD de 0,92 Å. A energia total do complexo (escore Plants) foi -124,774 au (unidades arbitrárias). A avaliação da energia total (escore Plants) do complexo usando as coordenadas cristalográficas do ligante, mostrou energia semelhante, de -114,767 au. Essa pequena diferença, de 10,007 au (8,02%), é devida ao deslocamento de 0,92 Å da posição da pose em relação à posição cristalográfica do ligante (Figura 30).

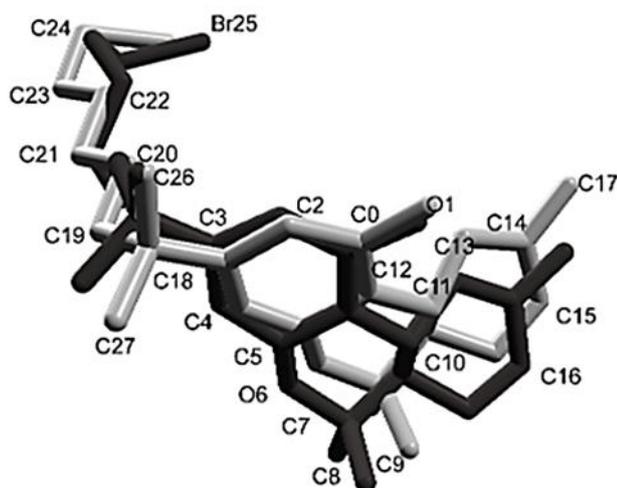


FIGURA 30. Resultados do redocking com a estrutura do CB1 mostra a pose (em cinza escuro) e a posição cristalográfica do ligante (cinza claro) Figura foi gerada com o programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

A aplicação deste protocolo descrito, para a estrutura do 4-AA, mostrou que era necessário reposicionar o centro da esfera de docking para as

coordenadas  $x = -41,19$ ;  $y = -165,55$ ;  $z = 308,08$  Å, com um raio de 6 Å, para se beneficiar da similaridade de formas entre 4-AA e o sistema de anéis do AM11542. A avaliação das poses obtidas através do docking entre 4-AA contra a estrutura cristalográfica de CB1 (PDB 5XRA) mostrou que o escore Plants variou entre -48,5925 a -46,2056 au. Nós consideramos a pose com o menor escore como a melhor pose, e usamos suas coordenadas atômicas para analisar as interações moleculares entre CB1 e 4-AA. Embora a energia total do complexo entre 4-AA e CB1 ter sido maior do que a energia total do complexo de CB1 com o agonista AM11542, a maioria das interações intermoleculares fundamentais estão conservadas na estrutura de docking entre 4-AA e CB1, e, além disso, por 4-AA ser uma estrutura que contém apenas o sistema de anéis, e por perder as interações favoráveis da cadeia alquila do AM11542, este resultado já era esperado (Figura 31).

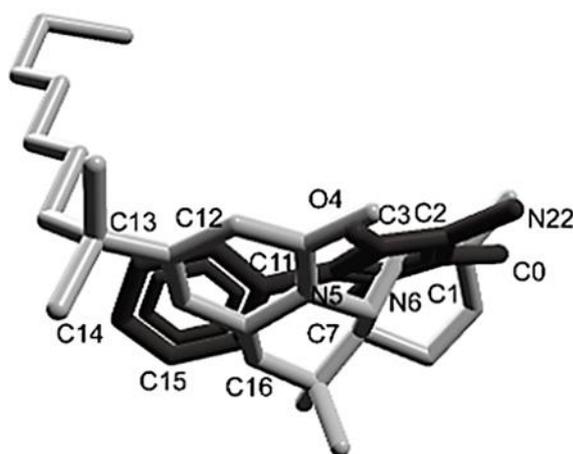


FIGURA 31. Superposição entre a pose de menor energia entre 4-AA (cinza escuro) e a posição cristalográfica do ligante AM11542 (cinza claro). Figura foi gerada com o programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

A análise tridimensional da distribuição dos resíduos hidrofóbicos comuns presentes nas interações de CB1 tanto com 4-AA quanto com AM11542, mostra quatro regiões hidrofóbicas (Figura 32). A região hidrofóbica 1 é composta dos resíduos Phe 170, Phe 174 e Phe 177, localizados na hélice II de CB1. Uma segunda região hidrofóbica mostra os seguintes resíduos, encontrados na hélice III: Phe 189, Leu 193 e Val 196, uma região hidrofóbica 3, de menor tamanho, está em posição oposta à região 2, e é composta pelo resíduo Phe 379, na hélice VII. Por último, a região hidrofóbica 4 apresenta o resíduo Phe 268, o qual se localiza entre as hélices IV e V. O único resíduo que participa em uma ligação de hidrogênio é Ser 383. Este resíduo polar fica na hélice VII. Sua cadeia lateral

está próxima às regiões hidrofóbicas 1 e 3, que o acomodam numa orientação favorável a participar na ligação de hidrogênio intermolecular.

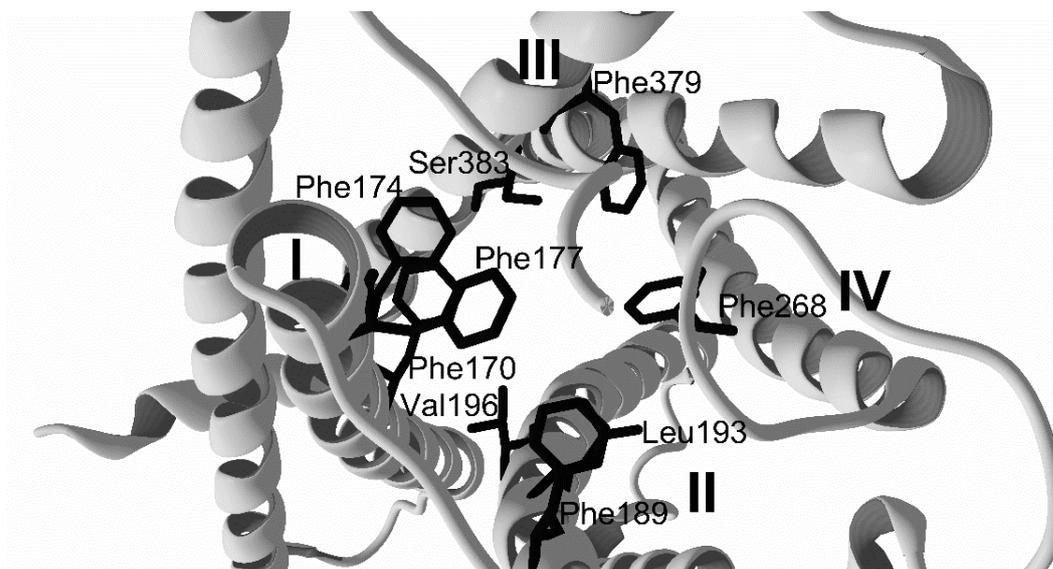


FIGURA 32. As regiões hidrofóbicas identificadas na participação de interações moleculares entre CB1-4-AA e entre CB1-AM11542. A figura foi gerada com o programa MVD (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

### 5.2.2 Interações Moleculares entre CB1 e 4-AA.

Nós utilizamos o programa LigPlot+ (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) para analisar as interações moleculares na estrutura obtida pela simulação de docking entre CB1 e 4-AA e para analisar as interações moleculares entre AM11542 (código 8D3) e CB1 (PDB 5XRA) na estrutura cristalográfica. Nós encontramos contatos de van der Waals entre a estrutura de 4-AA e os resíduos Phe 174, Phe 177, His 178, Phe 379, e uma ligação de hidrogênio em Ser 383. Além disso, também identificamos interações entre Phe 170, Phe 189, Leu 193, Val 196 e Phe 268 (Figura 33).

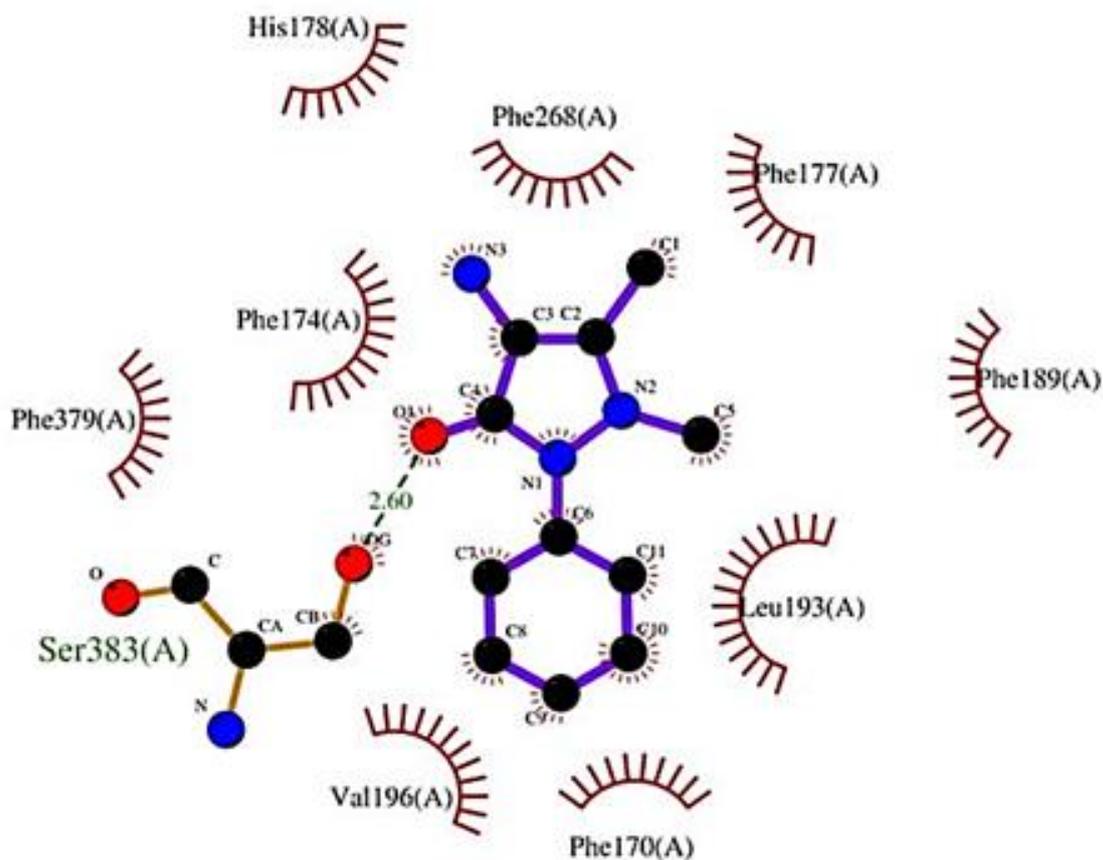


FIGURA 33. A análise das interações intermoleculares entre 4-AA e o CB1. As figuras foram geradas com o programa LigPlot+ (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) Figuras extraídas do artigo RUSSO; DE AZEVEDO, 2020.

Já entre a estrutura de CB1 e AM11542, nós encontramos uma ligação de hidrogênio também em Ser 383, e interações de van der Waals envolvendo Phe 170, Phe 174, Phe 177, Phe 189, Leu 193, Thr 197, Val 196, Ile 267, Phe 268, Pro 269, Leu 276, Trp 279, Leu 359, Met 363, e Phe 379 (Figura 34).

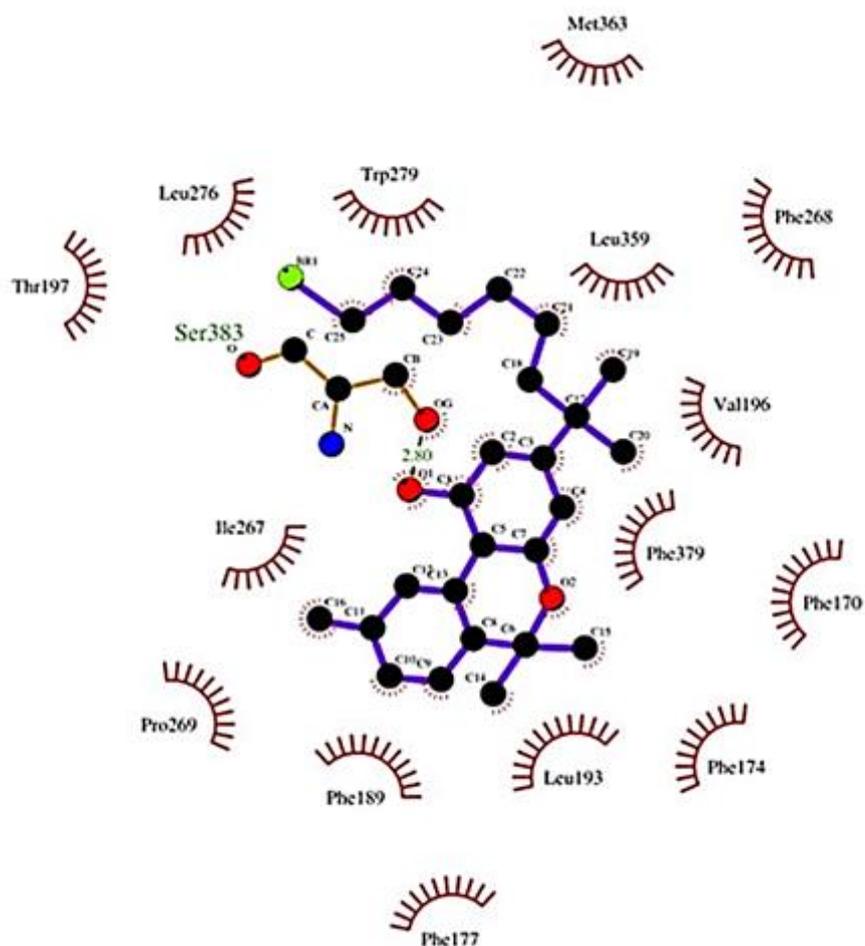


FIGURA 34. A análise das interações intermoleculares entre AM11542 e o CB1. As figuras foram geradas com o programa LigPlot+ (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995). Figuras extraídas do artigo RUSSO; DE AZEVEDO, 2020.

A superposição das duas estruturas mostrou os mesmos contatos de van der Waals envolvendo os resíduos Phe170, Phe 174, Phe 177, Phe 189, Leu 193, Val 196, Phe 268 e Phe 379, além da ligação de hidrogênio conservada em Ser 383 (Figura 35).

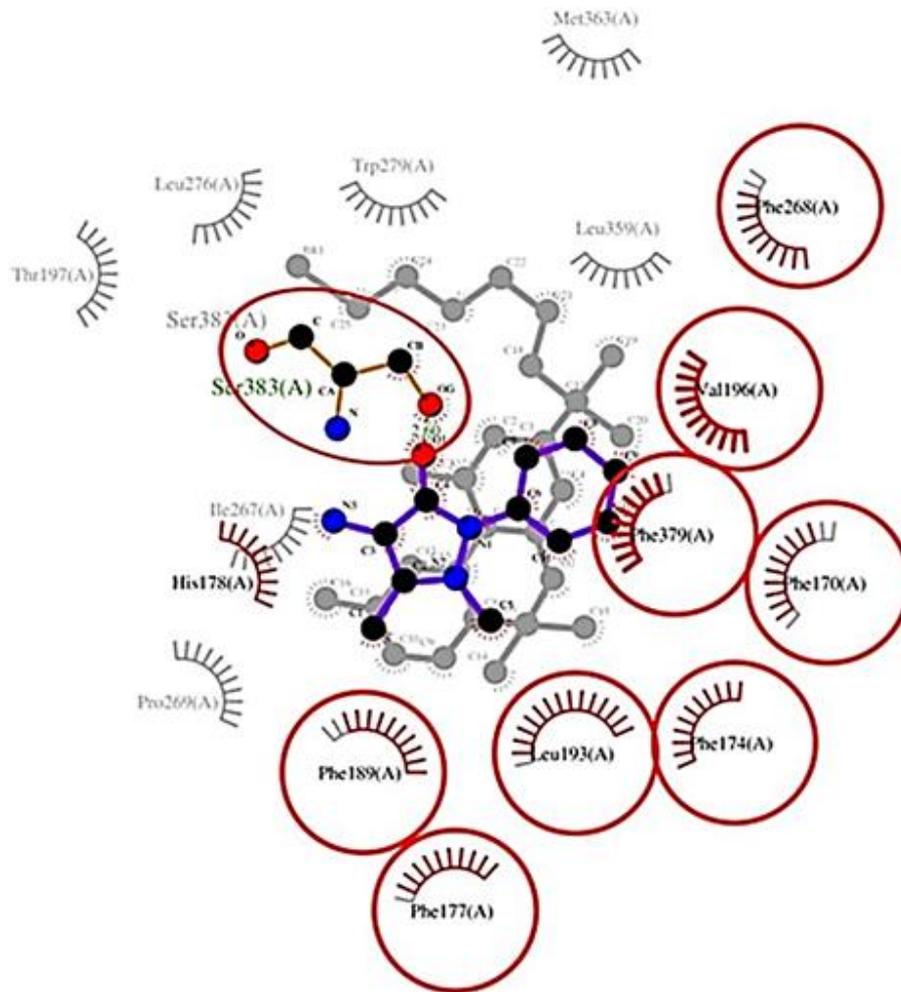


FIGURA 35. A análise das interações intermoleculares para a superposição entre as estruturas do CB1 com 4-AA e AM11542. As figuras foram geradas com o programa LigPlot+ (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Figuras extraídas do artigo RUSSO; DE AZEVEDO, 2020.

Nos estudos estruturais de CB1, nós encontramos as seguintes semelhanças entre as interações moleculares que evidenciamos e as que foram mostradas nesses estudos.

Hua et al. (HUA, et al., 2016) dividiu o agonista inverso de CB1, AM6538, em um anel pirazol e três braços. O anel pirazol interage com Phe 170, Phe 379 e Ser 383. O braço 1 interage com Phe 170 e Val 196. O braço 2 tem interações com Leu 193, Val 196, Thr 197, Leu 359 e Met 363. E o braço 3 forma interações

com os resíduos hidrofóbicos Met 103, Ile 105, Ile 119, Ser 123, Phe 170, Phe 174, Ala 380, Ser 383 e Met 384.

No estudo de Shao et al. (SHAO, et al., 2016), no qual o CB1 está ligado ao agonista inverso taranabanto, a maior parte dos resíduos do bolsão de ligação de CB1, identificados em estudos mutagênicos, como determinantes para a interação, estão em contato com o taranabanto, incluindo Phe 170, Phe 174, Leu 193, Phe 379 e Ser 383.

Já nos estudos em que CB1 está complexado com agonistas, Hua et al. (HUA, et al., 2017) observou que o sistema de anel tricíclico de AM11542, forma interações  $\pi$ - $\pi$  com Phe 268, Phe 379, Phe 189 e Phe 177, e uma ligação de hidrogênio com Ser 383. A cadeia alquila do AM11542 se estende em um canal, fazendo interações hidrofóbicas com Leu 193, Val 196, Tyr 275, Leu 276, Leu 359 e Met 363. As cadeias alquilas mais longas permitem mais interações com o CB1, o que está de acordo com estudos de relação entre atividade e estrutura de canabinoides, os quais mostram que os comprimentos maiores das cadeias alquilas estão relacionadas a maior afinidade do ligante. [39,40].

### 5.2.3. Conclusão do Artigo 2

Nós propusemos um alvo molecular para o metabólito da dipirona, 4-AA. Novas evidências mostram a interação de 4-AA com CB1. Nós realizamos docking molecular e análise das interações moleculares entre 4-AA e CB1, e observamos várias semelhanças entre essas interações moleculares e aquelas entre CB1 e o agonista AM11452, as quais envolviam os resíduos Phe 170, Phe 174, Phe 177, Phe 189, Leu 193, Val 196, Phe 379, e Ser 383. Este último resíduo apresentou somente interações hidrofóbicas quando ligado a agonistas inversos, e ligação de hidrogênio quando ligado a agonistas. É possível especular que a ocorrência de Ser 383 em ambiente hidrofóbico pode ser explorada no desenho de ligantes específicos para CB1 já que isto poderia contribuir na diminuição da energia de ligação necessária a outras ligações de hidrogênio intermoleculares. 4-AA é uma molécula que mostra similaridade de formas e similaridade de interações moleculares com o sistema de anéis do agonista de CB1 AM11542, não apresentando a cadeia alquila. O comprimento da cadeia alquila é associado com a afinidade do ligante a CB1 (HUA, et al., 2017; NIKAS, et al. 2010; XIE; MELVIN; MAKRIYANNIS,1996)

Nós hipotetizamos que a disfunção cognitiva causada por alguns agonistas CB1 poderia ser causada pelas interações moleculares entre CB1 e a cadeia alquila presente em THC e alguns derivados, e faltando em 4-AA. Juntos,

a análise mecânica e o presente estudo de simulação computacional indicam que 4-AA possivelmente interage com CB1.

## **6. CONCLUSÃO**

Na interação do CB1 com agonistas, observam-se os resíduos Phe 170, Phe 174, Phe 177, Phe 189, Leu 193, Thr 197, Val 196, Ile 267, Phe 268, Pro 269, Leu 276, Trp 279, Leu 359, Met 363, e Phe 379.

Na interação do CB1 com agonistas inversos, se observam os resíduos Phe 102, Met 103, Ile 105, Ile 119, Ala 120, Gly 166, Phe 170, Phe 174, His 178, Leu 193, Val 196, Thr 197, Phe 268, Trp 356, Leu 359, Phe 379 Ala 380, Ser 383, Met 384, Cys 386 e Leu 387.

Deve-se dar atenção especial, nos agonistas inversos, aos resíduos Phe 102, Met 103, Ile 105 do terminal amino, ao resíduo Phe 170 na hélice II, e ao resíduo Phe 268 em ECL2. Na hélice VII, sempre vão ser observados dois ou três resíduos nas interações com agonistas inversos, sendo o mais encontrado, o resíduo Ser 383. Os resíduos Phe 170 e Leu 359 foram observados em todas as estruturas de CB1 com agonistas inversos.

Os resíduos Phe 170, Phe 174, Phe 177, Phe 189, Leu 193, Val 196, e Ser 383 estavam presentes em todas as estruturas analisadas, tanto nas estruturas do CB1 complexado a agonistas inversos, como nas estruturas do CB1 complexado a agonistas, mostrando sua importância na especificidade de interação com CB1 e sendo relevantes para o desenho de fármacos.

## **7. TRABALHOS FUTUROS**

O desenvolvimento de um protocolo de docking molecular confiável torna possível explorarmos as estruturas cristalográficas do CB1 e mais recentemente do CB2 para estudar as interações intermoleculares de potenciais ligantes contra estes importantes alvos para o desenho de fármacos. Pretendemos avançar com esta pesquisa, explorando bibliotecas de pequenas moléculas, como as disponíveis no ZINC (IRWIN; SHOICHET, 2005; IRWIN et al., 2012), investigando outras moléculas que apresentam potencial de interagir com o CB1 por meio de abordagens computacionais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N.Y.; KNOWLES, R.; DEHORTER, N. New Insights Into Cholinergic Neuron Diversity. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. 204, p. 1-12, 2019.

ALMEIDA-FILHO, D. G. et al. An investigation of Hebbian phase sequences as assembly graphs. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. 34, p. 1-13, 2014.

AL-ZOUBI, R.; MORALES, P.; REGGIO, P. H. Structural Insights into CB1 Receptor Biased Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1837, 2019.

ARAQUE, A., et al. Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. **Neuropharmacology**, v. 15, n. 124, p.13-24, 2017.

AYMERICH, M. S. et al. Cannabinoid pharmacology/therapeutics in chronic degenerative disorders affecting the central nervous system. **Biochemical Pharmacology**, v. 157, p. 67–84, 2018.

AZEVEDO, L. S., et al. Recent Progress of Molecular Docking Simulations Applied to Development of Drugs. **Current Bioinformatics**, v. 7, n. 4, p. 352–65, 2012.

BADOWSKI, M. E.; YANFUL, P. K. Dronabinol oral solution in the management of anorexia and weight loss in AIDS and cancer. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 14, p. 643–651, 2018.

BASAVARAJAPPA, B. S. et al. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 5, p. 624–648, 2017.

BENARD, G., et al. Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. **Nature Neuroscience**, v. 15, p. 558–564, 2012.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BERMAN, H.M. et al. The protein data bank. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 58:6, n. 1, p. 899–907, 2002.

Bisogno, T., et al. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. **The Biochemical Journal**, v. 351, Pt 3(Pt 3), p. 817–824, 2000.

BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. How Docking Programs Work. **Methods in Molecular Biology**, v. 2053, p. 35–50, 2019a.

- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. SAnDReS: A Computational Tool for Docking. **Methods in Molecular Biology**, v. 2053, p. 51–65, 2019b.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Docking with AutoDock4. **Methods in Molecular Biology**, v. 2053, p. 125–148, 2019c.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Molecular Docking Simulations with ArgusLab. **Methods in Molecular Biology**, v. 2053, p. 203–220, 2019d.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Docking with GemDock. **Methods in Molecular Biology**, v. 2053, p. 169–188, 2019e.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Molegro Virtual Docker for Docking. **Methods in Molecular Biology**, v. 2053, p. 149–167, 2019f.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Molecular Dynamics Simulations with NAMD2. **Methods in Molecular Biology**, v. 2053, p. 109–124, 2019g.
- BLISS, T. V.; LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **Journal of Physiology**, v. 232, p. 331–56, 1973.
- BRAILOIU, G. C., et al. Intracellular cannabinoid type 1 receptors are activated by anandamide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 33, p. 29166–29174, 2011.
- BUSQUETS-GARCIA, A., et al. Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. **F1000Research**, 5:F1000 Faculty Rev-990, 2016. doi:10.12688/f1000research.8245.1.
- CAJANUS, K. et al. Effect of endocannabinoid degradation on pain: role of FAAH polymorphisms in experimental and postoperative pain in women treated for breast cancer. **Pain**, v. 157, n. 2, p. 361–369, 2016.
- CANDURI, F.; DE AZEVEDO, W. F. Protein crystallography in drug discovery. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 12, p. 1048–1053, 2008.
- CONGREVE, M. et al. Discovery of 1,2,4-triazine derivatives as adenosine A(2A) antagonists using structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2012, v. 55, p. 1898-1903, 2012.

- COTA, D. The brain strikes back: hypothalamic targets for peripheral CB1 receptor inverse agonism. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 10, p. 1077-1078, 2017.
- COVEY, D. P., et al. Endocannabinoid modulation of dopamine neurotransmission. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 52–61, 2017.
- CRUNFLI, F.; VILELA, F.C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyron. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 3, p. 246-255, 2015.
- DE AZEVEDO, W. F., et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, n. 1-2, p. 518–526, 1997.
- DE AZEVEDO, W.F. JR. Molecular dynamics simulations of protein targets identified in Mycobacterium tuberculosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 1353–1366, 2011.
- DEFEA K. Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, Suppl 1(Suppl 1), p.s. 298-309, 2008.
- DEMUTH, D. G.; MOLLEMAN, A. Cannabinoid signalling. **Life Sciences**, v. 78, n. 6, p. 549–563, 2006.
- DE PETROCELLIS, L., et al. Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 377-387, 1999.
- DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 1-15, 2009.
- DE RUYCK, J., et al. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry : AABC**, v. 9, p. 1-11, 2016.
- DESJARLAIS, R. L.; DIXON, J. S. A shape- and chemistry-based docking method and its use in the design of HIV-1 protease inhibitors. **Journal of Computer Aided Molecular Design**, v. 8, p. 231–242, 1994.
- DEUPI, X.; KOBILKA, B. Activation of G Protein–Coupled Receptors. Mechanisms and Pathways of Heterotrimeric G Protein Signaling, **Advanced Protein Chemistry**, v. 74, p. 137–166, 2007.

- DI FORTI, M. et al. The contribution of cannabis use to variation in the incidence of psychotic disorder across Europe (EU-GEI): a multicentre case-control study. **Lancet Psychiatry**, v. 6, n. 5, p. 427–436, 2019.
- DI MARZO, V.; PISCITELLI, F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 692–698, 2015.
- DIXON, R. A. et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. **Nature**, v. 321, n. 6065, p. 75–79, 1986.
- DORE, A. S. et al. Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. **Structure**, v. 19, p. 1283–1293, 2011.
- DORIGO M., STÜTZLE, T. Ant Colony Optimization. Cambridge: MIT Press, 305 p. 2004.
- DOS SANTOS, G.G., et al. The analgesic effect of dipyrone in peripheral tissue involves two different mechanisms: neuronal K(ATP) channel opening and CB(1) receptor activation. **Behavioural Pharmacology**, v. 741, p. 124–131, 2014.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004a.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 113, 2004b.
- EICHEL, K.; VON ZASTROW, M. Subcellular Organization of GPCR Signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 2, p. 200–208, 2018.
- ELPHICK, M. R. The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Sciences**, v. 367, n. 1607, p. 3201–3215, 2012.
- ESCOBAR, W., et al. Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. **European Journal of Pain**, v. 16, n. 5, p. 676–689, 2012.
- FATTORE, L.; FRATTA, W. Beyond THC: the new generation of cannabinoid designer drugs. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, n. 60, 2011.
- FELDMAN D. E. The spike-timing dependence of plasticity. **Neuron**, v. 75, n. 4, p. 556–571, 2012.

FILIPEK, S. Molecular switches in GPCRs. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 55, p. 114–120, 2019.

FISCHER, E. Über die optischen Isomeren des Traubenzuckers, der Gluconsäure und der Zuckersäure. **Berichte Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 23, p. 2611–2624, 1890.

FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Berichte Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 27, p. 2985–2993, 1894.

FLETCHER-JONES, A. et al. Protein Interactors and Trafficking Pathways That Regulate the Cannabinoid Type 1 Receptor (CB1R). **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, n. 108, p. 1-19, 2020.

FREDRIKSSON, R. et al. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1256-1272, 2003.

FREDRIKSSON, R. The Repertoire of G-Protein-Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 1414–1425, 2005.

FRIDE, E., et al. Behavioral methods in cannabinoid research. **Methods in Molecular Medicine**, v. 123, p. 269-290, 2006.

GOLDBERG, Y. P. et al. Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. **Clinical Genetics**, v. 71, p. 311–319, 2007.

GUREVICH, V.; GUREVICH, E. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 125, p 1-11, 2019.

HABIB, A. M. et al. Microdeletion in a FAAH pseudogene identified in a patient with high anandamide concentrations and pain insensitivity. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, e249–e253, 2019.

HAIJ-DAHMANE, S.; SHEN, R. Y. Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 414–420, 2011.

HANUS, L., et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 7, p. 3662–3665, 2001.

HAUSER, A. S. et al. Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. **Cell**, v. 172, n. 1-2, p. 41-54.e19, 2018.

HEBERLÉ, G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, n. 9, p. 1339–1352, 2011.

HEIFETS, B. D.; CASTILLO, P. E. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. **Annual Review of Physiology**, v. 71, p. 283–306, 2009.

HILLISCH, A.; HEINRICH, N.; WILD, H. Computational chemistry in the pharmaceutical industry: from childhood to adolescence. **Chem Med Chem**, v. 10, n. 12, p. 1958–1962, 2015.

HOURANI, W.; ALEXANDER, S. Cannabinoid ligands, receptors and enzymes: Pharmacological tools and therapeutic potential. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, 2398212818783908, 2018.

HUA, T., et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 750-762.e14, 2016.

HUA, T. et al. Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB1. **Nature**, v. 547, n. 7664, p. 468–471, 2017.

HUANG, S. M., et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 12, p. 8400–8405, 2002.

HUANG, Y.; TODD, N.; THATHIAH, A. The role of GPCRs in neurodegenerative diseases: avenues for therapeutic intervention. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 32, p. 96-110, 2017.

HUMPHREY, W.; DALKE, A; SCHULTEN, K. VMD - Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33-38, 1996.

ILTER, M.; MANSOOR, S.; SENSOY, O. Utilization of Biased G Protein-Coupled Receptor Signaling towards Development of Safer and Personalized Therapeutics. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2052, 2019.

IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, n. 1, p.177-182, 2005.

IRWIN, J.J.; STERLING, T.; MYSINGER, M.M.; BOLSTAD, E.S.; COLEMAN, R.G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2012, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.

JAKOWIECKI, J.; FILIPEK, S. Hydrophobic Ligand Entry and Exit Pathways of the CB1 Cannabinoid Receptor. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 12, p. 2457–2466, 2016.

JAKOWIECKI, J., et al. The Hydrophobic Ligands Entry and Exit from the GPCR Binding Site-SMD and SuMD Simulations. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1930, 2020.

JANERO, D.R., et al. Cannabinoid 1 G protein-coupled receptor (periphero) neutral antagonists: emerging therapeutics for treating obesity-driven metabolic disease and reducing cardiovascular risk. **Expert Opinion in Drug Discovery**, v. 6, p. 995-1025, 2011.

JONES, E. K.; KIRKHAM, T. C. Noladin ether, a putative endocannabinoid, enhances motivation to eat after acute systemic administration in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 6, p. 1815–1821, 2012.

KANO M. Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. **Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Sciences**, v. 90, n. 7, p. 235-250, 2014.

KATRITCH, V., et al. Allosteric sodium in class A GPCR signaling. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 5, p. 233-244, 2014.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. **Nature Medicine**, v. 14, n. 9, p. 923-30, 2008.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. **Annual Review Neuroscience**, v. 35, p. 529-58, 2012.

KERBRAT, A. et al. Acute Neurologic Disorder from an Inhibitor of Fatty Acid Amide Hydrolase. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 18, p. 1717–1725, 2016.

KING, B. L.; VAJDA, S.; DELISI, C. Empirical free energy as a target function in docking and design: application to HIV-1 protease inhibitors. **FEBS Letter**, v. 384, p. 87–91, 1996.

KOBILKA, B. K. G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 4, p. 794–807, 2007.

KRISHNA-KUMAR, K. et al. Structure of a Signaling Cannabinoid Receptor 1-G Protein Complex. **Cell**, v. 176, n. 3, p. 448–458.e12, 2019.

KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, p. 269–288, 1982.

LAMPERT, A. et al. Sodium channelopathies and pain. **Pflugers Archives - European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 249–263, 2010.

LASKOWSKI, R.A.; SWINDELLS, M.B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, p. 2778-2786, 2011.

LATEK, D., et al. Modeling of Ligand Binding to G Protein Coupled Receptors: Cannabinoid CB1, CB2 and Adrenergic  $\beta$  2 AR. **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, n. 9, p. 2353-66, 2011.

LAUN, A. S. et al. GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 300-308, 2019.

LAW, E. C., et al. Examining the Conservation of Kinks in Alpha Helices. **PloS one**, v. 11, n. 6, e0157553, 2016.

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

LOEWE, S. Studies on the pharmacology and acute toxicity of compounds with marihuana activity. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 88, p. 154–161, 1946.

LOKE, M. F. et al. Deep sequencing analysis to identify novel and rare variants in pain-related genes in patients with acute postoperative pain and high morphine use. **Journal of Pain Research**, v. 12, p. 2755-2770, 2019.

LUO, J. et al. The role of GPCRs in bone diseases and dysfunctions. **Bone Research**, v. 8; n. 7, p. 19, 2019.

MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 168, p. 299–325, 2005.

MAIONE, S., et al. Effects of metabolites of the analgesic agent dipyrone (metamizol) on rostral ventromedial medulla cell activity in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 748, p. 115-122, 2015.

MCHUGH, D. GPR18 in microglia: implications for the CNS and endocannabinoid system signalling. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 8, p. 1575-1582, 2012.

MCPARTLAND, J. M. et al. Cannabinoid receptors are absent in insects. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 436, n. 4, p. 423–429, 2001.

MCPARTLAND, J. M. Phylogenomic and chemotaxonomic analysis of the endocannabinoid system. **Brain Research Reviews**, v. 45, n. 1, p. 18–29, 2004.

MCPARTLAND, J. M. et al. Cannabinoid receptors in invertebrates. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 19, n. 2, p. 366–373, 2006.

MESTRES, J., et al. The topology of drug-target interaction networks: implicit dependence on drug properties and target families. **Molecular Biosystems**, v. 5, n. 9, p. 1051-1057, 2009.

MOBAREC, J.; FILIZOLA, M. Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n. 3, p. 343-355, 2008.

MORALES, P.; REGGIO, P. H. An Update on Non-CB1, Non-CB2 Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 2, n. 1, p. 265–273, 2017.

MUEGGE I.; BERGNER, A.; KRIEGL, J. M. Computer-aided drug design at Boehringer Ingelheim. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 31, p. 275–285, 2017.

NAHORSKI, M. S.; CHEN, Y. C.; WOODS, C. G. New Mendelian Disorders of Painlessness. **Trends in Neuroscience**, v. 38, n. 11, p. 712–724, 2015.

NIKAS, S.P., et al. Novel 1',1'-chain substituted hexahydrocannabinols: 9 $\beta$ -hydroxy-3-(1-hexyl-cyclobut-1-yl)-hexahydrocannabinol (AM2389) a highly potent cannabinoid receptor 1 (CB1) agonist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 6996-7010, 2010.

NOBLES, K. N. et al. Distinct phosphorylation sites on the  $\beta$ (2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of  $\beta$ -arrestin. **Science Signaling**, v. 4, n. 185, ra51, 2011.

NOLAN, T., SINGH, N.; MCCURDY, C. R. Ligand Macromolecule Interactions: Theoretical Principles of Molecular Recognition. **Methods in Molecular Biology**, v. 572, p. 13–29, 2009.

NYÍRI, G., et al. GABAB and CB1 cannabinoid receptor expression identifies two types of septal cholinergic neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 11, p. 3034-3042, 2005.

OLIVELLA, M.; CALTABIANO, G.; CORDOMI, A. The role of Cysteine 6.47 in class A GPCRs. **BMC Structural Biology**, v. 13, p. 3. 2013.

OLMO, I. G.; FERREIRA-VIEIRA, T. H.; RIBEIRO, F. M. Dissecting the Signaling Pathways Involved in the Crosstalk between Metabotropic Glutamate 5 and Cannabinoid Type 1 Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 5, p. 609–619, 2016.

PALCZEWSKI, K. et al. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. **Science**, v. 289, n.5480, p. 739-745, 2000.

Pandey, P., et al. Interactions of endocannabinoid virodhamine and related analogs with human monoamine oxidase-A and -B. **Biochemical Pharmacology**, v. 155, p. 82–91, 2018.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, Suppl 1(Suppl 1), p. 163-171, 2006.

PERTWEE, R. G. Endocannabinoids and Their Pharmacological Actions. **Handbooh of Experimental Pharmacooogylogy**, v. 231, p. 1-37, 2015.

PORTER, A. C., et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 301, n.3, p. 1020-1024, 2002.

RATHORE, R. S. et al. Advances in binding free energies calculations: QM/MM-based free energy perturbation method for drug design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 26, p. 4674–4686, 2013.

REN, J., et al. Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. **Elife**, 8:e49424, 2019.

RHO, H. J.; KIM, J. H.; LEE, S. H. Function of Selective Neuromodulatory Projections in the Mammalian Cerebral Cortex: Comparison Between Cholinergic and Noradrenergic Systems. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 12, p. 47, 2018.

RUSSO, S.; DE AZEVEDO, W. F. Advances in the Understanding of the Cannabinoid Receptor 1 - Focusing on the Inverse Agonists Interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 1908–1919, 2019.

RUSSO, S.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Computational Analisis of Dipyrone Metabolite 4-Aminoantipyrine as a Cannabinoid Receptor 1 Agonist. **Current Medicinal Chemistry**, doi: 10.2174/0929867326666190906155339.

SCHLOSBURG, J.E., et al. Evaluation of the endogenous cannabinoid system in mediating the behavioral effects of dipyrone (metamizol) in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, n. 7, p. 722-726, 2012.

SHAO, Z. et al. High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. *Nature*, v. 540, n. 7634, p. 602–606, 2016.

SHARIR, H., et al. The endocannabinoids anandamide and virodhamine modulate the activity of the candidate cannabinoid receptor GPR55. **Journal of Neuroimmune Pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 856–865, 2012.

SHIPTON, E. A.; SHIPTON, E. E.; SHIPTON, A. J. A Review of the Opioid Epidemic: What Do We Do About It?. **Pain Therapy**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2018. doi:10.1007/s40122-018-0096-7.

SILVER R. J. The Endocannabinoid System of Animals. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 9, n. 9, p. 686, 2019. doi: 10.3390/ani9090686.

SIMON, V.; COTA, D. Mechanisms in Endocrinology: Endocannabinoids and metabolism: past, present and future. **European Journal of Endocrinology**, v. 176, n. 6, R309–R324, 2017. doi:10.1530/eje-16-1044.

SWANSON, O. K.; MAFFEI, A. From Hiring to Firing: Activation of Inhibitory Neurons and Their Recruitment in Behavior. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 168, 2019. doi: 10.3389/fnmol.2019.00168.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n.11, p. 3315–3321, 2006.

TRIPATHI, A.; BANKAITIS, V. A. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. **Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications**, 2(1), 10.16966/2575-0305.106, 2017.

TSUBOI, K., et al. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: biological activities and metabolism. **Inflammation and Regeneration**, v. 38, n. 28, p. 1-10, 2018.

TURU, G.; HUNYADY, L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 2, p. 75–85, 2009.

VAILLANCOURT, M.; COHEN, E.; SAUVE, G. Characterization of dynamic state inhibitors of HIV-1 protease. **Journal of Enzymatic Inhibitors**, v. 9, p. 217–233, 1995.

VENKATAKRISHNAN, A. J. et al. Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 484-497, 2016.

- WACKER, D.; STEVENS, R. C.; ROTH, B. L. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. **Cell**, v. 170, n. 3, p. 414-427, 2017.
- WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engeneering**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.
- WESTBROOK, J. et al. The Protein Data Bank and structural genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 489–491, 2003.
- WILEY, J. L.; MARUSICH, J. A.; HUFFMAN, J. W. Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. **Life Sciences**, v. 97, n. 1, p. 55–63, 2014.
- WYROFSKY, R. R., et al. Endocannabinoids, stress signaling, and the locus coeruleus-norepinephrine system. **Neurobiology of Stress**, 11, 100176, eCollection, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100176>.
- XAVIER, M. M. et al. SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions. **Combinatorial Chemistry High Throughput Screen**, v. 19, n. 10, p. 801–812, 2016.
- XIE, X.Q.; MELVIN, L.S.; MAKRIYANNIS, A. The conformational properties of the highly selective cannabinoid receptor ligand CP-55,940. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10640-10647, 1996.
- YANG, J. M.; CHEN, C. C. GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking. **Proteins**, v. 55, p.288–304, 2004.
- YOHANNAN, S. et al. The evolution of transmembrane helix kinks and the structural diversity of G protein-coupled receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 4, p. 959–963, 2004.
- ZACHARIOU, M. et al. A biophysical model of endocannabinoid-mediated short term depression in hippocampal inhibition. **PloS one**, v. 8, n. 3, e58926, 2013.
- ZAR, J. H. Significance Testing of the Spearman Rank Correlation Coefficient. **Journal of American Statical Association**, v. 67, n. 339, p. 578-580, 1972.
- ZHANG, D.; ZHAO, Q.; WU, B. Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. **Molecules and Cells**, v. 38, n. 10, p. 836-842, 2015.
- ZHANG, S. et al. Clinical features for diagnosis and management of patients with PRDM12 congenital insensitivity to pain. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 8, p. 533–535, 2016.

ZHOU, X. E.; MELCHER, K.; XU, H. E. Understanding the GPCR biased signaling through G protein and arrestin complex structures. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 45, p. 150–159, 2017.

ZHOU, X. E.; MELCHER, K.; XU, H. E. Structural biology of G protein-coupled receptor signaling complexes. **Protein Science: a publication of the Protein Society**, v. 28, n. 3, p. 487–501, 2019.

ZHOU, Q. et al. Common activation mechanism of class A GPCRs. **eLife**, 8, e50279, 2019. <https://doi.org/10.7554/eLife.50279>.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, n. 3, p. 833, 2018.

## 9. ARTIGOS PUBLICADOS

### 9.1. ARTIGO 1

Russo S, De Azevedo WF. Advances in the Understanding of the Cannabinoid Receptor 1 - Focusing on the Inverse Agonists Interactions. *Curr Med Chem*. 2019; 26(10): 1908–1919. O PDF do artigo 1 está disponível no link: [https://azevedolab.net/resources/Russo\\_de\\_Azevedo\\_Jr\\_Curr\\_Med\\_Chem\\_2019\\_26\\_10\\_1908\\_1919.pdf](https://azevedolab.net/resources/Russo_de_Azevedo_Jr_Curr_Med_Chem_2019_26_10_1908_1919.pdf)

## Advances in the Understanding of the Cannabinoid Receptor 1 – Focusing on the Inverse Agonists Interactions

Silvana Russo <sup>1 2 3</sup>, Walter Figueira De Azevedo <sup>1 2 3</sup>

Affiliations + expand

PMID: 29667549 DOI: 10.2174/0929867325666180417165247

### Abstract

**Background:** Cannabinoid Receptor 1 (CB1) is a membrane protein prevalent in the central nervous system, whose crystallographic structure has recently been solved. Studies will be needed to investigate CB1 complexes with its ligands and its role in the development of new drugs.

**Objective:** Our goal here is to review the studies on CB1, starting with general aspects and focusing on the recent structural studies, with emphasis on the inverse agonists bound structures.

**Methods:** We start with a literature review, and then we describe recent studies on CB 1 crystallographic structure and docking simulations. We use this structural information to depict protein-ligand interactions. We also describe the molecular docking method to obtain complex structures of CB 1 with inverse agonists.

**Results:** Analysis of the crystallographic structure and docking results revealed the residues responsible for the specificity of the inverse agonists for CB 1. Most of the intermolecular interactions involve hydrophobic residues, with the participation of the residues Phe 170 and Leu 359 in all complex structures investigated in the present study. For the complexes with otenabant and taranabant, we observed intermolecular hydrogen bonds involving residues His 178 (otenabant) and Thr 197 and Ser 383 (taranabant).

**Conclusion:** Analysis of the structures involving inverse agonists and CB 1 revealed the pivotal role played by residues Phe 170 and Leu 359 in their interactions and the strong intermolecular hydrogen bonds highlighting the importance of the exploration of intermolecular interactions in the development of novel inverse agonists.

**Keywords:** Cannabinoid receptor; GPCR; docking; drug design; inverse agonist; membrane protein.

Copyright© Bentham Science Publishers; For any queries, please email at [epub@benthamscience.net](mailto:epub@benthamscience.net).

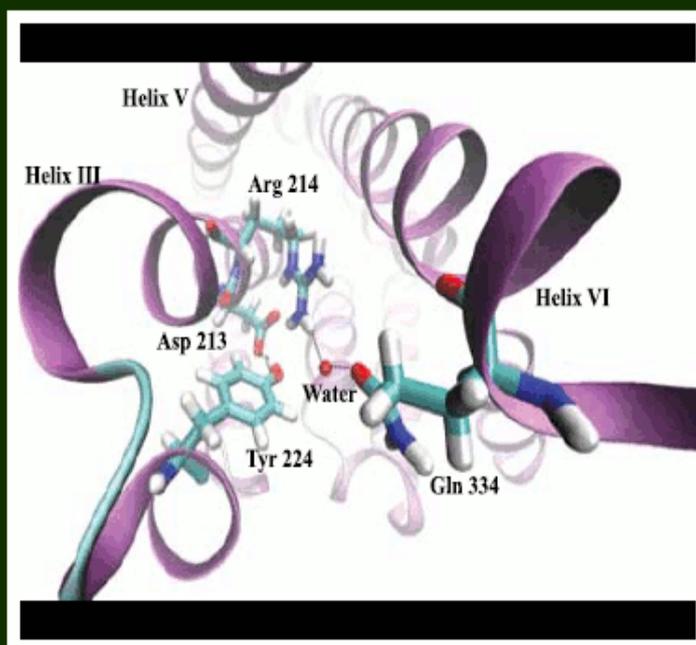
eISSN: 1875-533X

ISSN: 0929-8673

VOLUME 26  
NUMBER 10



# Current Medicinal Chemistry



*The  
International  
Journal for  
Timely In-depth  
Reviews  
in Medicinal  
Chemistry*



**BENTHAM  
SCIENCE**

## 9.2. ARTIGO 2

Russo S, de Azevedo WF Jr. Computational Analysis of Dipyrone Metabolite 4-Aminoantipyrine as a Cannabinoid Receptor 1 Agonist. *Curr Med Chem*. doi: 10.2174/0929867326666190906155339. O PDF do artigo 1 está disponível no link: [https://azevedolab.net/resources/Russo\\_de\\_Azevedo\\_Jr\\_Curr\\_Med\\_Chem\\_2020.pdf](https://azevedolab.net/resources/Russo_de_Azevedo_Jr_Curr_Med_Chem_2020.pdf)

### Computational Analysis of Dipyrone Metabolite 4-Aminoantipyrine as a Cannabinoid Receptor 1 Agonist

Silvana Russo <sup>1</sup>, Walter Filgueira de Azevedo Jr <sup>1</sup>

Affiliations + expand

PMID: 31490743 DOI: 10.2174/0929867326666190906155339

#### Abstract

**Background:** Cannabinoid receptor 1 has its crystallographic structure available in complex with agonists and inverse agonists, which paved the way to establish an understanding of the structural basis of interactions with ligands. Dipyrone is a prodrug with analgesic capabilities and which is widely used in some countries. Recently it was shown some evidence of a dipyrone metabolite acting over the Cannabinoid Receptor 1.

**Objective:** Our goal here is to explore the dipyrone metabolite 4-aminoantipyrine as a Cannabinoid Receptor 1 agonist, reviewing dipyrone characteristics, and investigating the structural basis for its interaction with Cannabinoid Receptor 1.

**Method:** We reviewed here recent functional studies related to the dipyrone metabolite focusing on its action as a Cannabinoid Receptor 1 agonist. We also analyzed protein-ligand interactions for this complex obtained through docking simulations against the crystallographic structure of the Cannabinoid Receptor 1.

**Results:** Analysis of the crystallographic structure and docking simulations revealed that most of the interactions present in the docked pose were also present in the crystallographic structure of Cannabinoid Receptor 1 and agonist.

**Conclusion:** Analysis of the complex of 4-aminoantipyrine and Cannabinoid Receptor 1 revealed the pivotal role played by residues Phe 170, Phe 174, Phe 177, Phe 189, Leu 193, Val 196, and Phe 379, besides the conserved hydrogen bond at Ser 383. The mechanistic analysis and the present computational study suggest that the dipyrone metabolite 4-aminoantipyrine interacts with Cannabinoid Receptor 1.

**Keywords:** 4-aminoantipyrine; cannabinoid receptor 1; dipyrone; docking; metamizole; molecular interactions.

Copyright© Bentham Science Publishers; For any queries, please email at [epub@benthamscience.net](mailto:epub@benthamscience.net).



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)