

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE - UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS**

Yasmin Aparecida Boita

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS LIGANTES DO RECEPTOR
5-HT_{1B} POR TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM
MODELO FARMACOFÓRICO 3D: em busca de um
tratamento para dependência à cocaína**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2021

Yasmin Boita

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS LIGANTES DO RECEPTOR 5-HT1B POR TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM MODELO FARMACOFÓRICO 3D: em busca de um tratamento para dependência à cocaína

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Caceres

**Porto Alegre
2021**

Catálogo na Publicação

Boita, Yasmin Aparecida

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS LIGANTES DO RECEPTOR 5-HT1B POR TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM MODELO FARMACOFÓRICO 3D: em busca de um tratamento para dependência à cocaína / Yasmin Aparecida Boita. -- 2021.

53 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2021.

Orientador(a): Rafael Andrade Caceres.

1. 5-HT1B. 2. Cocaína. 3. Modelo Farmacofórico. 4. Docking Molecular. 5. Predição de propriedades ADMETox.
I. Título.



Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biociências

APRESENTAÇÃO PÚBLICA DE MESTRADO

Data: 28/07/2021

Título: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS LIGANTES DO RECEPTOR 5-HT1B POR TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM MODELO FARMACOFÓRICO 3D: em busca de um tratamento para dependência à cocaína

Discente: Yasmin Aparecida Boita

Orientador: Dr. Rafael Andrade Caceres

Banca Examinadora:

Dr. Rodrigo Ligabue Braun (UFCSPA)

Dr. José Fernando Ruggiero Bachega (UFCSPA)

Dra. Scheila de Avila e Silva (UCS)

Dr. Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers (UNIVATES - suplente)

Em sessão pública, a discente apresentou seu trabalho e, de acordo com os pareceres dos membros da banca, foi:

(X) APROVADA, devendo o discente entregar a versão final no prazo máximo de 30 dias.

() REPROVADA.

Porto Alegre, 28 de julho de 2021.

Dr. Rodrigo Ligabue Braun

Dr. José Fernando Ruggiero Bachega

Dra. Scheila de Avila e Silva

Dr. Rafael Andrade Caceres

Yasmin Aparecida Boita

RESUMO

O consumo de cocaína tem aumentado no Brasil e no mundo. A ausência de um tratamento efetivo e evidências de estudos pré-clínicos e clínicos encorajam a investigação de possíveis ligantes do receptor 5-HT1B como alvo molecular para um futuro tratamento para dependência à cocaína. Portanto, a partir de três modelos farmacofóricos 3D baseados nas interações do alvo molecular e a ergotamina, um conhecido agonista desse receptor, utilizando a plataforma Pharmit, obteve-se, em diferentes bibliotecas comercialmente disponíveis um total de 88739 candidatas. Um filtro que seleciona apenas ligantes com características favoráveis a atingirem o SNC foi utilizado por meio da plataforma FAFdrugs, reduzindo para 590 candidatas a serem submetidas às simulações de *docking*. Esta avaliação, que foi realizada tanto pelo software Autodock 4.2 quanto pelo Vina, prediz a energia livre de ligação de cada ligante das bibliotecas analisadas e o receptor 5-HT1B de acordo com um protocolo estabelecido neste estudo. Com o propósito de avaliar a preferência de interação das candidatas que ocuparam as primeiras posições no *ranking* das metodologias propostas, realizou-se a simulação de *docking* destas com outros receptores serotoninérgicos. Além disso, foi avaliada a energia de ligação de dois antagonistas do receptor 5-HT1B com esse alvo, projetando simulações de competição pela interação. Foram analisadas, utilizando o PKCsm as propriedades ADMETox das candidatas com as mais baixas energias de ligação com o receptor 5-HT1B. Com estas análises foi possível verificar que ambas as metodologias de *docking* utilizadas apresentaram resultados equivalentes e que foi possível eleger cinco candidatas a ligantes que apresentam energia de ligação competitivas a da ergotamina, enquanto que os ligantes antagonistas apresentaram energia de ligação significativamente mais alta, indicando a preferência de interação das candidatas estudadas em face dos antagonistas. Também se observou que há maior possibilidade de interação das candidatas eleitas ao receptor 5-HT1B do que aos demais receptores serotoninérgicos testados.

Palavras-chave: Receptor 5-HT1B. Modelo Farmacofórico. Triagem virtual. Dependência à cocaína.

ABSTRACT

Cocaine use has increased in Brazil and worldwide. The absence of an effective treatment and evidence from preclinical and clinical studies encourage the investigation of possible 5-HT_{1B} receptor ligands as a molecular target for a future treatment for cocaine addiction. Therefore, from three 3D pharmacophoric models based on the interactions of the molecular target and ergotamine, a known agonist of this receptor, using the Pharmit platform, a total of 88739 candidates were obtained in different commercially available libraries. A filter that selects only ligands with favorable characteristics to reach the CNS was used through the FAFdrugs platform, reducing to 590 candidates to be submitted to docking simulations. This evaluation, which was performed both by Autodock 4.2 and by Vina software predicts the free energy of binding of each ligand in the analyzed libraries and the 5-HT_{1B} receptor according to a protocol established in this study. With the purpose of evaluating the interaction preference of the candidates that occupied the first positions in the ranking of the proposed methodologies, a simulation of their docking with other serotonergic receptors was carried out. Furthermore, the binding energy of two 5-HT_{1B} receptor antagonists with this target was evaluated, designing simulations of competition for the interaction. Using PKCsm the ADMETox properties of the candidates with the lowest binding energies to the 5-HT_{1B} receptor were analyzed. With these analyzes it was possible to verify that both docking methodologies used presented equivalent results and that it was possible to elect five candidates for ligands that have binding energy competitive to ergotamine, while the antagonist ligands presented binding energy, significantly higher, indicating the interaction preference of the studied candidates over antagonists. It was also observed that there is a greater possibility of interaction of the selected candidates to the 5-HT_{1B} receptor than to the other tested serotonergic receptors.

Keywords: 5-HT_{1B} receptor. Pharmacophoric model. Virtual Screening. Cocaine addiction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Receptor 5-HT1B em representação de fitas evidenciando as sete hélices transmembrana, que estão entre o folheto extracelular, em azul e o folheto citoplasmático, em vermelho, no qual encontram-se outras quatro regiões. 14
- Figura 2** - Estruturas dos receptores serotoninérgicos (5-HT) utilizados para comparação de energia de afinidade com o receptor 5-HT1B. 19
- Figura 3** - Modelo Farmacofórico 3D baseado na molécula da ergotamina e no receptor 5-HT1B. 28
- Figura 4** - Modelo 1 - Modelo Farmacofórico 3D proposto para este estudo, produzidos com base na molécula da ergotamina e no receptor 5-HT1B. 29
- Figura 5** - Modelo 2 - Modelo Farmacofórico 3D proposto para este estudo, produzidos com base na molécula da ergotamina e no receptor 5-HT1B. 30
- Figura 6** - Modelo 3 - Modelo Farmacofórico 3D proposto para este estudo, produzidos com base na molécula da ergotamina e no receptor 5-HT1B. 31
- Figura 7** - Interação do receptor 5-HT1B com a Ergotamina e com as Candidatas 1 e 2. 46
- Figura 8** - Interações do Receptor 5-HT1B com as candidatas 3 a 5. 47

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Identificação dos receptores serotoninérgicos utilizados para comparação com o 5-HT1B. | 19 |
| Tabela 2 - Parâmetros de <i>grid</i> utilizados no Autodock Vina. | 23 |
| Tabela 3 - Composição por biblioteca de origem. | 32 |
| Tabela 4 - <i>Ranking</i> das melhores energias de ligação. | 34 |
| Tabela 5 - Nova identificação das candidatas e seus códigos SMILES. | 35 |
| Tabela 6 - Comparação da energia de ligação estimada entre agonista, candidatas 1 e 2 e antagonistas do receptor 5-HT1B. | 35 |
| Tabela 7 - Simulação de <i>docking</i> entre as candidatas de 1 a 5 e diferentes receptores serotoninérgicos e similaridade sequencial com o receptor 5-HT1B. | 37 |
| Tabela 8 - Resultados AMETox para as candidatas 1 a 5 e Ergotamina. | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS

3D - Tridimensionais

5-HT - 5-Hidroxitriptamina - Serotonina

5-HT1B - 5-Hidroxitriptamina 1B

5-HT2AR - 5-Hidroxitriptamina 2AR

5-HT2B - 5-Hidroxitriptamina 2B

5-HT2C - 5-Hidroxitriptamina 2C

5-HT1D - 5-Hidroxitriptamina 1D

5-HT1A - 5-Hidroxitriptamina 1A

ADMETox - Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade

AGL - Algoritmo Genético Lamarkciano

BFGS - Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno

BLAST - *Basic Local Alignment search tool*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA - Comitê de Ética em uso de Animais

DA - Dopamina

GABA - Ácido Gama-Aminobutírico

hERG - *Human Ether-a-go-go*

MI-GAP - Manual de Intervenções Programa de Ação Mundial em Saúde Mental

OCT2 - Transportador de cátions orgânicos 2

OMS - Organização Mundial da Saúde

PDB - *Protein Data Bank*

RMSD - *Root-mean-square deviation*

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

UNODC - *United Nations Office on Drugs and Crime*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 RELAÇÃO DO RECEPTOR COM A DEPENDÊNCIA À COCAÍNA | 11 |
| 1.2 CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT1B | 13 |
| 2 OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3 METODOLOGIA | 18 |
| 3.1 MATERIAIS UTILIZADOS | 18 |
| 3.2 PROGRAMAS DE VISUALIZAÇÃO E MANIPULAÇÃO | 18 |
| 3.3 MODELO ESTRUTURAL DO RECEPTOR | 18 |
| 3.4 AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE SEQUENCIAL | 19 |
| 3.5 CONSTRUÇÃO DO MODELO FARMACOFÓRICO 3D | 20 |
| 3.6 PREDIÇÃO DE COMPOSTOS QUE ATINGEM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL | 20 |
| 3.7 PROTOCOLO DE SIMULAÇÃO DE DOCAJEM MOLECULAR, TRIAGEM VIRTUAL E <i>CROSS-DOCKING</i> | 21 |
| 3.7.1 <i>AutoDock 4.2</i> | 21 |
| 3.7.2 <i>Autodock Vina</i> | 22 |
| 3.8 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES ADMETOX | 23 |
| 3.9 INTERAÇÃO COM O RECEPTOR | 24 |
| 4 ASPECTOS ÉTICOS | 26 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 5.1 MODELOS FARMACOFÓRICOS | 28 |
| 5.2 TRIAGEM POR FILTRO DE MOLÉCULAS QUE ATINGEM O SNC | 32 |
| 5.3 TRIAGEM VIRTUAL | 32 |
| 5.4 AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE SEQUENCIAL E SIMULAÇÃO DE <i>DOCKING</i> COM OUTROS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS | 36 |
| 5.5 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES ADMETox | 37 |
| 5.5.1 <i>Absorção</i> | 37 |
| 5.5.2 <i>Distribuição</i> | 38 |
| 5.5.3 <i>Metabolismo</i> | 39 |
| 5.5.4 <i>Excreção</i> | 40 |
| 5.5.5 <i>Toxicidade</i> | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 5.6 INTERAÇÃO RECEPTOR 5-HT _{1B} COM A ERGOTAMINA E COM AS CANDIDATAS 1 A 5..... | 44 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 48 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

1 INTRODUÇÃO

O terceiro levantamento nacional sobre uso de drogas na população brasileira, realizado em 2015 com 16.273 voluntários, aponta a cocaína como segunda substância ilícita mais utilizada, sendo indicada como ao menos um uso na vida por 3,1% dos entrevistados. É importante ressaltar que este estudo segregou as formas de consumo entre cocaína em pó e crack ou outras formas fumáveis de cocaína, que representou 0,9% dos relatos de uso de drogas. (BASTOS et al., 2017)

O escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) apontou que em 2018 ao redor do mundo 19 milhões de pessoas utilizaram cocaína, representando 0,4 % da população mundial. Este dado, quando avaliado em determinadas regiões, mostra-se ainda mais alarmante, como na Austrália e Nova Zelândia, países nos quais o índice chega a 2,2 % da população. Além disso, estima-se que a produção de cocaína tenha dobrado de volume desde 2013, chegando a quantidades recordes desde 1998.(UNODOC, 2020)

1.1 RELAÇÃO DO RECEPTOR COM A DEPENDÊNCIA À COCAÍNA

O efeito agudo da cocaína implica, principalmente, no bloqueio da recaptação da dopamina (DA), mas também da serotonina (HT), da epinefrina e norepinefrina nos terminais pré-sinápticos, proporcionando o aumento do tempo de disponibilização destes neurotransmissores na fenda sináptica especialmente nas regiões do sistema límbico. Sistema este que modula as emoções e comportamento. O uso crônico está relacionado ao desenvolvimento de tolerância e dificuldade de abster-se da substância devido ao aparecimento de quadros de fissura, característicos da dependência à cocaína (KATZUNG; TREVOR, 2017; KUMAR et al., 2010). Devido a ação dos psicoestimulantes e ativação do sistema simpático o uso da cocaína provoca alterações em outros sistemas correlacionados, como aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca e respiratória, estado de alerta e aumento da atividade motora (KUMAR et al., 2010).

Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado relação do receptor 5-HT1B com a dependência à cocaína e, portanto, indicam esse como alvo molecular para o desenvolvimento de tratamentos específicos (MATUSKEY, D. et al., 2014;

PENTKOWSKI, N.S. et al., 2012; BAROT SK, FERGUSON SM, NEUMAIER J.F. 2007).

Foi observada, em um estudo utilizando tomografia com emissão de pósitrons específicos para o receptor 5-HT1B e ressonância magnética estrutural, a diminuição da disponibilidade de receptores 5-HT1B em 14 indivíduos dependentes de cocaína, quando analisadas as regiões do hipotálamo, cíngulo anterior e no córtex pré-frontal (MATUSKEY, D. et al., 2014). Entretanto é importante observar que os indivíduos foram submetidos, anteriormente ao estudo, a um período mínimo de 6 dias de abstinência. Portanto acredita-se que esta redução seja devido ao efeito da parada da utilização da substância, caracterizado como abstinência, e não de uso abusivo à cocaína, que pode ocorrer no período de 15 dias a 3 meses após a cessação do uso. (NEISEWANDER J. L et al., 2014)

Estudos pré-clínicos têm abordado a relação do uso da cocaína com os receptores 5-HT1B, sendo estes de similaridade estrutural e de função idênticas, portanto, sendo homólogos e úteis para mimetização desses receptores em humanos (HARTING, P.R. et al., 1996). Acredita-se que, por considerações éticas o estudo do uso da cocaína ocorra em número significativamente maior em animais não-humanos pois sobre estes pode-se ter maior controle da utilização de outras drogas, tempo e frequência de uso, assim como outros fatores que influenciam na caracterização dos sistemas envolvidos no uso da cocaína.

Um estudo pré-clínico, utilizando a microinfusão de vetores virais no núcleo accumbens e área tegmental ventral a fim de aumentar a expressão receptores 5-HT1B, *knockin*, reforça a hipótese de que esta alteração modula o comportamento relacionado ao abuso à cocaína de acordo com a fase da dependência, de uso, abstinência ou recaída. Isto porque durante a fase de autoadministração de cocaína foi apresentado um efeito reforçador do consumo, entretanto após um tempo maior de abstinência, observa-se a diminuição do comportamento de recaída (PENTKOWSKI, N.S. et al., 2012). Estes resultados corroboram com os obtidos por Barot e seu colaboradores (2007), utilizando a mesma técnica de *knockin* especificamente no núcleo accumbens. Neste estudo se verificou a alteração da resposta de acordo com a fase de dependência e tipo de comportamento. O experimento indica que o aumento dos receptores intensifica o processo de gratificação e efeitos negativos relacionados à cocaína. Desta forma conclui que um agonista dos receptores poderia ser utilizado

no processo de dependência à cocaína. Considerando resultados como esses, algumas moléculas agonistas dos receptores 5-HT1B vem sendo propostas e aplicadas em estudos pré-clínicos como o apresentando por Acosta (2005) que propõe que um determinado agonista ainda em fase de desenvolvimento diminui a motivação e procura por cocaína em ratos submetidos a teste de extinção e restabelecimento da autoadministração à cocaína.

Por meio da utilização de ratos *knockout* para o receptor 5-HT1B e avaliando a administração de diferentes concentrações de cocaína, um estudo demonstrou as funções dos receptores 5-HT1B pré-sinápticos tanto como um auto-receptor para inibir a liberação de serotonina no núcleo dorsal da rafe como um heteroreceptor para inibir a liberação de GABA e glutamato no mesencéfalo ventral e no núcleo accumbens, respectivamente (MORIKAWA, H. et al., 2000). Possibilitando a melhor compreensão do comportamento de ansiedade e depressão apresentado em determinadas fases da dependência à cocaína.

Além disso estudos relacionados a comportamentos de impulsividade, que é frequentemente observado em dependentes à cocaína, têm indicado o desenvolvimento de agonistas dos receptores 5-HT1B como potenciais focos de estudo para o desenvolvimento de novas terapias (NAKAZATO, 2019). Com relação ao impacto na neurobiologia e comportamento da ansiedade relacionados ao uso de cocaína, Klein e colaboradores têm sugerido, em seus estudos com modelos animais, a influência de agonistas do receptor 5-HT1B como atenuadores dos efeitos ansiogênicos relacionados ao uso de cocaína em ratos (KLEIN et al., 2017; KLEIN et al., 2019)

Neste contexto acredita-se que a adequada modulação da expressão ou da atividade dos receptores 5-HT1B pode ser uma nova terapia no processo de dependência à cocaína. Portanto pretende-se a partir da utilização de modelos farmacofóricos 3D baseados na interação da ergotamina, identificar moléculas que modulem o receptor 5-HT1B.

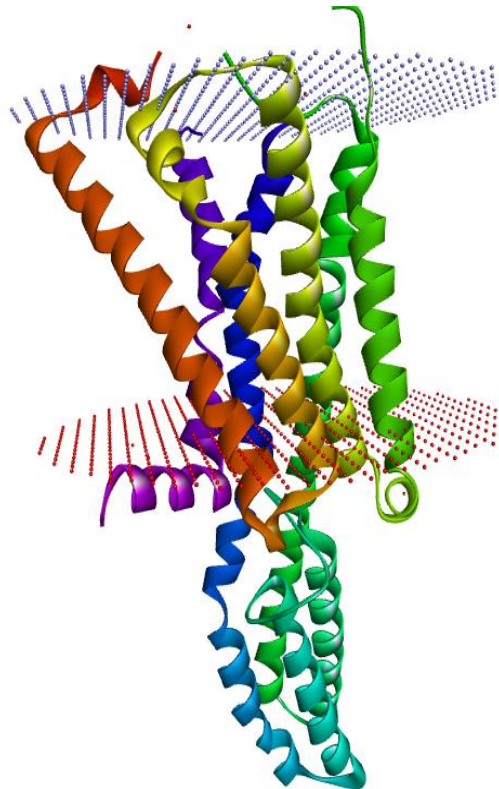
1.2 CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT1B

O receptor 5-HT1B é pertencente à família dos receptores serotoninérgicos, é metabotrópico inibitório acoplado à proteína G. Localizado tanto nos neurônios pré-

sinápticos de serotonina, como auto-receptor quanto como hetero-receptor em neurônios do ácido gama-aminobutírico (GABA) (O'DELL; PARSONS 2004).

Este receptor possui a sua estrutura 3D resolvida, com a ergotamina acoplada, pela técnica de difração de raios X (WANG ET AL., 2013). A cristalografia resolvida com este ligante reporta informações específicas das interações naquela pose do ligante, assim como seus impactos na estrutura da proteína, portanto favorecendo o desenvolvimento de outros ligantes com atividades semelhantes. A ergotamina é um agonista bem estabelecido do receptor 5-HT1B primariamente utilizado para o tratamento sintomático da enxaqueca (WANG ET AL., 2013; SINCLAIR ET AL., 2015). A estrutura do receptor (Figura 1) possui 401 aminoácidos e é composta por sete hélices transmembrana, na qual encontra-se o sítio de interação deste receptor com ergotamina e quatro regiões fora da membrana e sobre as quais ainda não estão elucidadas as atividades (PALCZEWSKI; ORBAN, 2013).

Figura 1 - Receptor 5-HT1B em representação de fitas evidenciando as sete hélices transmembrana, que estão entre o folheto extracelular, em azul e o folheto citoplasmático, em vermelho, no qual encontram-se outras quatro regiões.



Fonte: Autora, 2021, com base no PDB ID 4IAR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar novas moléculas que atuem no receptor 5-HT1B.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Propor três modelos farmacofóricos 3D baseados na interação da ergotamina com o receptor 5-HT1B.

Construir biblioteca de pequenas moléculas que satisfaçam os modelos farmacofóricos 3D obtidos.

Realizar a triagem virtual de pequenas moléculas;

Determinar computacionalmente as propriedades ADMETox das moléculas selecionadas na triagem virtual.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS UTILIZADOS

As simulações requeridas foram realizadas em computador Dell XPS 8700 (4th Generation Intel® Core™ i7-4770 Processor (8MB Cache, 3.4 GHz), 12GB RAM Dual Channel DDR3 1600MHz – 4DIMMs, 1TB 7200 RPM SATA; NVIDIA® GeForce® GTX 645 1.0GB GDDR5 Hard Drive 6.0 Gb/s) utilizando sistema operacional Linux.

3.2 PROGRAMAS DE VISUALIZAÇÃO E MANIPULAÇÃO

Para a adequada compreensão das estruturas a serem utilizadas é necessário que sejam utilizadas ferramentas computacionais para visualização, manipulação das estruturas, análise de dados obtidos e geração produtos. Portanto foram utilizados programas computacionais gráficos como o SwissPdbViewer v.4.1 (GUEx; PEITSCH, 1997), PyMol v.1.7.0.0 (DELANO et al., 2002) e Modeller v. 10.1 (FISER, A; DO, R. K. G; SALI, A. 2000).

3.3 MODELO ESTRUTURAL DO RECEPTOR

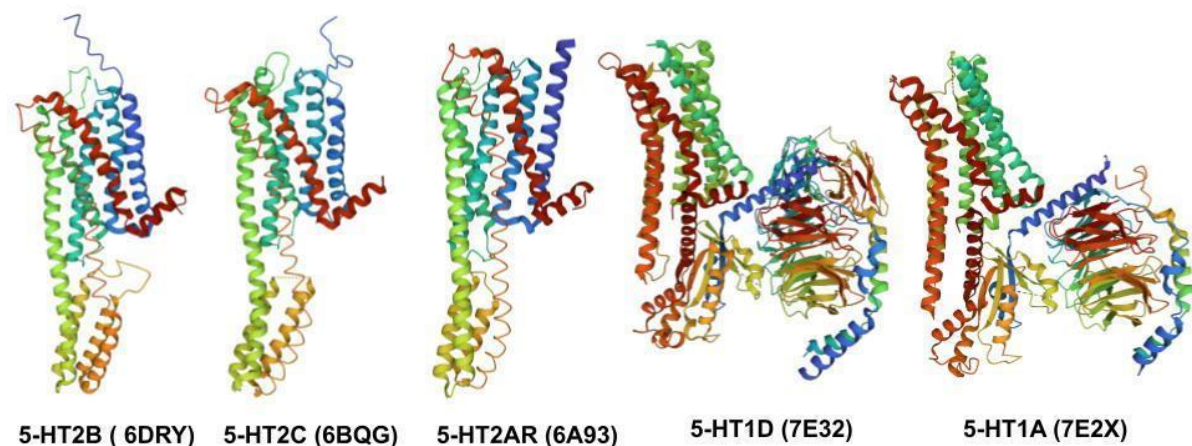
No presente estudo foi utilizado como alvo molecular o receptor 5-HT1B e outras estruturas proteicas oriundas da família dos receptores serotoninérgicos, para comparação de afinidade de ligação das candidatas aos diferentes receptores. Todas as estruturas foram obtidas na base de dados de acesso gratuita chamada *Protein Data Bank* (PDB), disponível em <http://www.rcsb.org> (BERMAN et al., 2000; BERNSTEIN et al., 1978), cujos detalhes estão disponíveis na tabela 1 e as respectivas estruturas moleculares, exceto receptor 5-HT1B previamente apresentado, estão disponíveis na figura 2.

Tabela 1 - Identificação dos receptores serotoninérgicos utilizados para comparação com o 5-HT1B.

| Identificação do receptor | ID PDB | Resolução (Å) | Autor |
|---------------------------|--------|---------------|---------------------|
| 5-HT1B | 4IAR | 2,70 | WANG et al, 2013 |
| 5-HT2AR | 6A93 | 3,00 | KIMURA et al, 2019 |
| 5-HT2C | 6BQG | 3,00 | PENG et al, 2018 |
| 5-HT2B | 6DRY | 2,92 | MCCORVY et al, 2018 |
| 5-HT1D | 7E32 | 2,90 | XU et al, 2021 |
| 5-HT1A | 7E2X | 3,00 | XU et al, 2021 |

Fonte: Autora, 2021.

Figura 2 - Estruturas dos receptores serotoninérgicos (5-HT) utilizados para comparação de energia de afinidade com o receptor 5-HT1B.



Fonte: Autora, 2021.

3.4 AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE SEQUENCIAL

Para verificar a comparabilidade entre as estruturas proteicas da família de receptores serotoninérgicos e para buscar dados para modelar regiões ausentes no alvo molecular utilizou-se a plataforma Basic Local Alignment search tool (BLAST) disponível em < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> > (CAMACHO et al, 2009).

3.5 CONSTRUÇÃO DO MODELO FARMACOFÓRICO 3D

Neste estudo optou-se pelo modelo farmacofórico que é uma abordagem bem estabelecida para pesquisar novas moléculas. Este é um método desenvolvido por Carlson, H. A. e colaboradores (2000) e foi aplicado com sucesso a sistemas como o HIV-1 integrase.

Utilizou-se o programa Pharmit Pipeline para a construção do modelo farmacofórico 3D disponível em <<http://pharmit.csb.pitt.edu/>>. O Pharmit é uma interface *online* para a busca de compostos em bancos de dados (Sunseri & Koes, 2016) utilizando modelos farmacofóricos. Esta ferramenta é utilizada para a construção e refinamento da hipótese farmacofórica direta da estrutura molecular do composto, analisando as suas interações já previamente elucidadas a partir de alguns ligantes, neste caso da ergotamina e do receptor 5-HT_{1B}. Com o propósito de explorar diferentes possibilidades de hipóteses farmacofóricas, alguns destes pontos de interação foram selecionados e três modelos farmacofóricos.

3.6 PREDIÇÃO DE COMPOSTOS QUE ATINGEM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O estudo de um possível tratamento para a dependência a drogas de abuso baseia-se na avaliação de contexto de medicamentos que atinjam o sistema nervoso central (SNC). Deste modo considera-se um importante ponto de partida, visando a otimização do custo computacional, a triagem utilizando o filtro de sistema nervoso central desenvolvido por Jeffrey P & Summerfield S, em 2010 e que está disponibilizado na plataforma FAFdrugs 4 (MITEVA, M. A. et al., 2006).

Os critérios avaliados para aprovação neste filtro de SNC, de acordo com os autores são: Massa molecular entre 135 e 582 Daltons (Da), Coeficiente de partição água -n-octanol (LogP) entre -0,2 e 6,1, aceptores de hidrogênio devem ser em número total menor ou igual a 5 e doadores de hidrogênio em número total menor ou igual a 3, área de superfície polar topológica entre 3,0 e 118,0 Å² (JEFFREY & SUMMERFIELD, 2010)

3.7 PROTOCOLO DE SIMULAÇÃO DE DOCAGEM MOLECULAR, TRIAGEM VIRTUAL E CROSS-DOCKING

A simulação de triagem virtual, neste estudo realizada por Autodock 4.2 e Autodock Vina, é utilizada com o propósito de avaliar e categorizar a interação das moléculas candidatas com o receptor 5-HT1B.

Com a finalidade de avaliar se há especificidade de interação ao receptor 5-HT1B frente aos demais receptores serotoninérgicos, a simulação de *cross-docking* foi realizada entre os ligantes eleitos como melhores candidatos e os receptores serotoninérgicos cuja estrutura, resolvida por cristalografia de raios X ou microscopia eletrônica e com origem em *homo sapiens*, está disponível no PDB conforme descrito na tabela 1. Este *cross-docking* foi realizado apenas utilizando a plataforma Vina. Além disso, a simulação *docking* de também foi realizada com dois antagonistas do receptor 5-HT1B, Isomaltano (NCBI,2021a), e Aripiprazol (NCBI,2021b), e com caráter exploratório.

3.7.1 AutoDock 4.2

Um protocolo de docagem estabelecido foi utilizado, assim como o receptor 5-HT1B ligado a ergotamina para a realização da simulação com a biblioteca de moléculas obtida previamente. Para tanto, os cálculos de docagem molecular foram realizados pelo programa AutoDock v.4.2 (MORRIS et al., 2009). O protocolo de algoritmo genético lamarkciano (AGL), baseado em um modelo evolutivo, foi utilizado para a busca de geometrias otimizadas sendo atribuídas cargas Gasteiger aos átomos dos ligantes da biblioteca e do modelo do receptor. Cada simulação de docagem molecular AGL consistiu em 10 corridas independentes, sendo escolhido 10 000 o número de gerações em cada corrida. O número máximo de avaliações de energia foi fixado em 100 000 000. O elitismo foi fixado em 1, a taxa de mutação em 0,02 e a taxa de *crossover* em 0,80. Os parâmetros de *grid* utilizados foram resolução de 0,375 Å, *grid* 43 X 40 X 37 pontos e com centro delimitado como X: -11,4079964508 Y: -17,3929363851 Z: 20,7727609303.

A triagem virtual segue os mesmos parâmetros do protocolo realizado. Esta resulta em um *ranking* dos compostos organizado com base na energia livre de

ligação. Esta é predita através de um algoritmo que correlaciona energia intermolecular, energia interna, energia torsional e energia não ligada, sendo o seu propósito avaliar o grau de afinidade entre o receptor e o ligante, naquele posicionamento (*pose*) específico que o ligante se encontra, sendo esta de caráter inversamente proporcional, quanto menor for o seu resultado, maior é a tendência a manterem-se em interação.

3.7.2 Autodock Vina

A triagem utilizando a ferramenta Autodock Vina utiliza o algoritmo de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) e possui parametrizações fechadas para a realização do *screening*, permitindo apenas os ajustes inerentes ao *grid* que será utilizado para a triagem, detalhado a tabela 2 para todos os receptores nos quais a metodologia foi aplicada (TROTT, O; OLSON, A. J; 2010).

No caso do *cross-docking* as candidatas mais bem posicionadas no *ranking* foram submetidas a uma simulação de *docking* com as demais estruturas existentes da família dos receptores serotoninérgicos, portanto utilizou-se parâmetros de *grid* que contemplavam a cobertura de toda a estrutura proteica do receptor, conforme consta na tabela 2, uma vez que as informações a respeito da região farmacofórica para cada receptor seria um estudo a parte.

Tabela 2 - Parâmetros de *grid* utilizados no Autodock Vina.

| Receptor | Centro do <i>Grid</i> | | | Espaçamento do <i>Grid</i> | | |
|------------------|-----------------------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|
| | X | Y | Z | X | Y | Z |
| 5HT1B (4IAR) | -11,41 | -17,39 | 207,73 | 15,96 | 14,87 | 14,20 |
| 5HT2C (6BQG) | 38,14 | 14,66 | 35,04 | 123,07 | 85,92 | 122,54 |
| 5HT2B (6DRY) | -28,78 | -15,30 | -12,34 | 76,96 | 64,82 | 121,67 |
| 5HT2AR (6A93) | 42,79 | 0,98 | 39,43 | 110,96 | 54,32 | 105,79 |
| 5-HT1D (7E32) | 105,18 | 89,34 | 82,74 | 126,16 | 116,49 | 115,73 |
| 5-HT1A (7E2X) | 91,79 | 86,64 | 80,40 | 85,76 | 110,77 | 107,55 |

Fonte: Autora, 2021.

Complementarmente foi realizada uma triagem com dois ligantes antagonistas conhecidos para o receptor 5-HT1B, deste modo é possível prever a interação frente a uma situação de competição pelo sítio de ligação. Os ligantes foram simulados utilizando as coordenadas de centro do *grid* X 20,488 Y -17,473 e Z 20,206 e número de pontos X 103,853, Y 55,429 e Z 58,845.

3.8 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES ADMETOX

A partir do *ranking* obtido pela triagem virtual foram selecionados os menores valores de energia livre nas duas metodologias de triagem virtual aplicadas. Estas foram submetidas ao programa pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015), uma plataforma *on line* gratuita a qual foi utilizada como um filtro por meio da análise das propriedades físico-químicas dos ligantes, a fim de avaliar a biodisponibilidade oral de um composto nos estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos, além de auxiliar no processo de predição das propriedades ADMETOx (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) (LESNEY M.S. 2004) das moléculas propostas, assim como comparar os resultados a ergotamina e a cocaína.

3.9 INTERAÇÃO COM O RECEPTOR

A fim de compreender a natureza das possíveis interações entre os resíduos da proteína do receptor 5-HT_{1B} com os átomos da ergotamina e de cada uma das candidatas selecionadas, de modo detalhado, por interações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, utilizou-se o programa LigPlot⁺ v.2.2.4 (LASKOWSKI & SWINDELLS, 2011).

4 ASPECTOS ÉTICOS

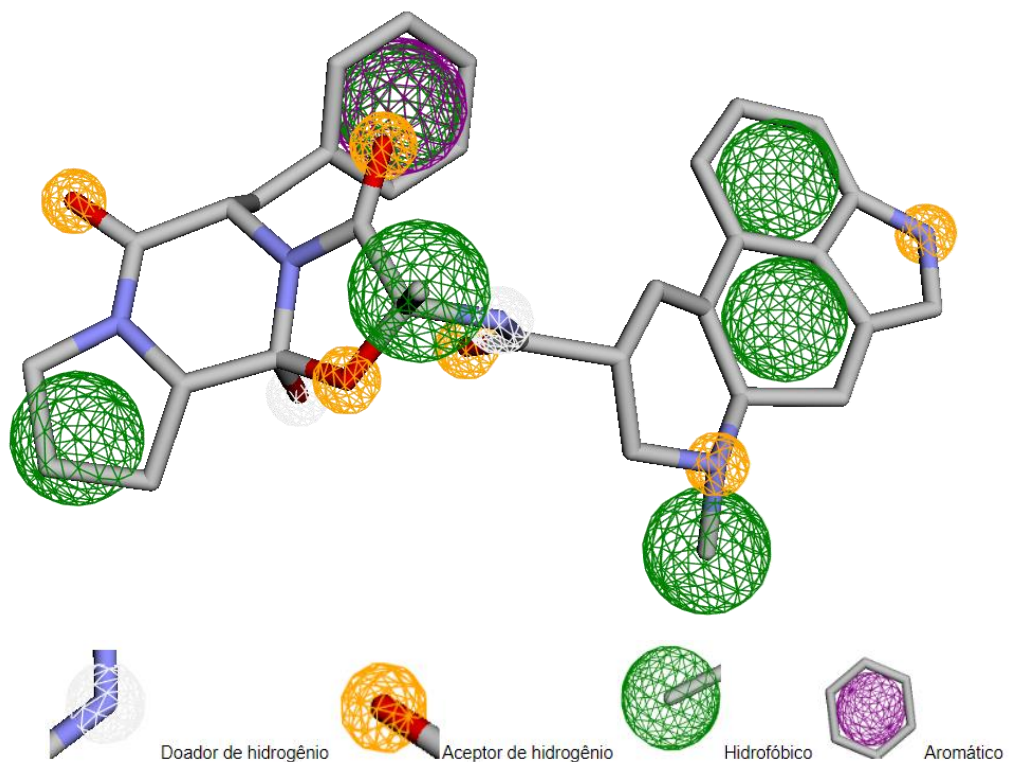
Este trabalho não utilizou recursos provenientes de humanos e suas amostras, deste modo fica dispensada a sua submissão o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-UFCSPA). Também não são utilizados animais ou suas amostras neste projeto, por isso é desnecessário a submissão à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFCSPA). Porém, por ser um projeto desenvolvido completamente por meio de recursos computacionais e a utilização de bancos de dados públicos e nas dependências da Universidade Federal da Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), é necessário a submissão e autorização da Comissão de Pesquisa da UFCSPA (ComPesq).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MODELOS FARMACOFÓRICOS

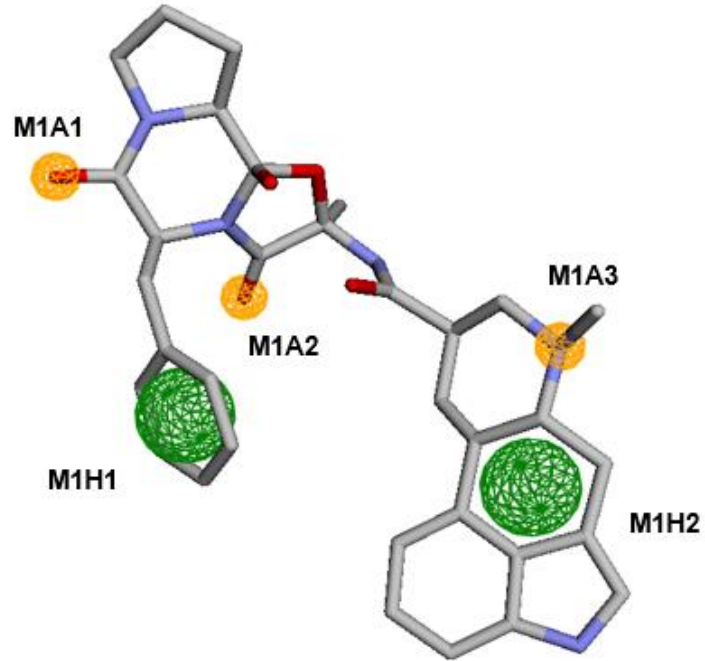
O Pharmit apresentou uma hipótese farmacofórica para as interações entre o receptor 5-HT1B e a ergotamina, figura 3. Com o propósito de explorar diferentes possibilidades de hipóteses farmacofóricas, alguns destes pontos de interação foram selecionados e três modelos farmacofóricos (M1, M2 e M3) foram construídos. Estas hipóteses farmacofóricas, figuras 4-6, têm, juntamente com a sua figura, a descrição de suas coordenadas tridimensionais (X, Y e Z) assim como o raio que limita a área que abrange cada grupamento ou interação. Estão presentes, representados em amarelo a classe de acceptor de Hidrogênio (A), em verde a hidrofóbica (H), em lilás aromático (Ar) e em branco os doadores de hidrogênio (D). Estes três modelos foram submetidos a bancos de dados de moléculas comercialmente disponíveis que foram posteriormente submetidas a triagem virtual.

Figura 3 - Modelo Farmacofórico 3D baseado na molécula da ergotamina e no receptor 5-HT1B.

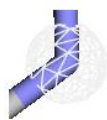


Fonte: Autora 2021.

Figura 4 - Modelo 1 - Modelo Farmacofórico 3D proposto para este estudo, produzidos com base na molécula da ergotamina e no receptor 5-HT1B.



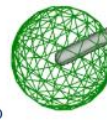
| | X | Y | Z | Raio |
|------|--------|--------|-------|------|
| M1A1 | -17,84 | -14,60 | 20,44 | 0,50 |
| M1H1 | -14,16 | -17,57 | 23,53 | 1,00 |
| M1A2 | -15,15 | -18,88 | 23,53 | 1,00 |
| M1A3 | -7,72 | -18,07 | 19,49 | 0,50 |
| M1H2 | -7,55 | -19,43 | 22,08 | 1,00 |



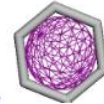
Doador de hidrogênio



Aceptor de hidrogênio



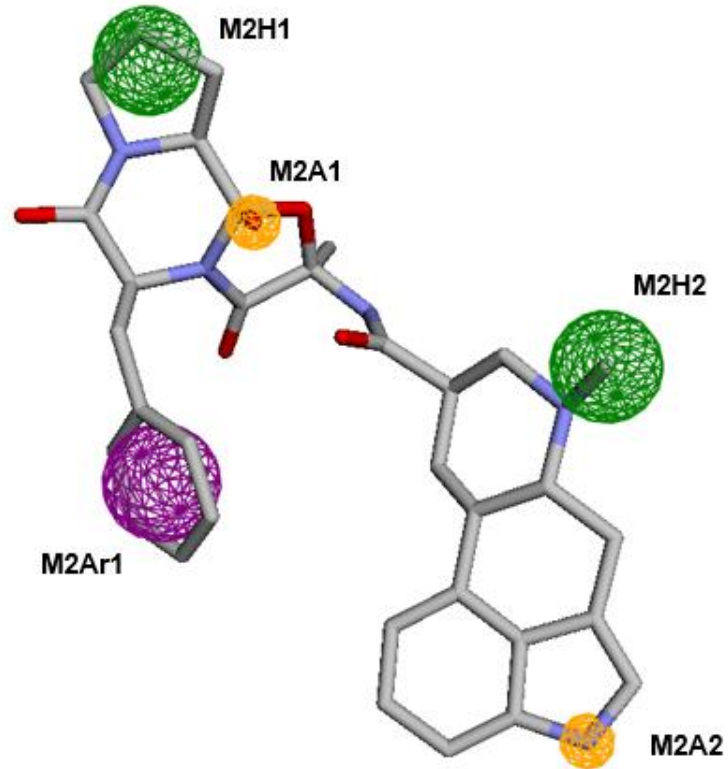
Hidrofóbico



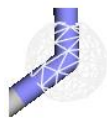
Aromático

Fonte: Autora, 2021.

Figura 5 - Modelo 2 - Modelo Farmacofórico 3D proposto para este estudo, produzidos com base na molécula da ergotamina e no receptor 5-HT1B.



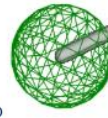
| | X | Y | Z | Raio |
|-------|--------|--------|-------|------|
| M2H1 | -16,15 | -13,23 | 17,37 | 1,00 |
| M2Ar1 | -14,16 | -17,57 | 23,53 | 1,10 |
| M2A1 | -13,50 | -14,90 | 19,17 | 0,50 |
| M2H2 | -6,87 | -16,92 | 19,09 | 1,00 |
| M2A2 | -5,77 | -21,03 | 24,42 | 0,50 |



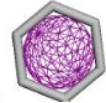
Doador de hidrogênio



Aceptor de hidrogênio



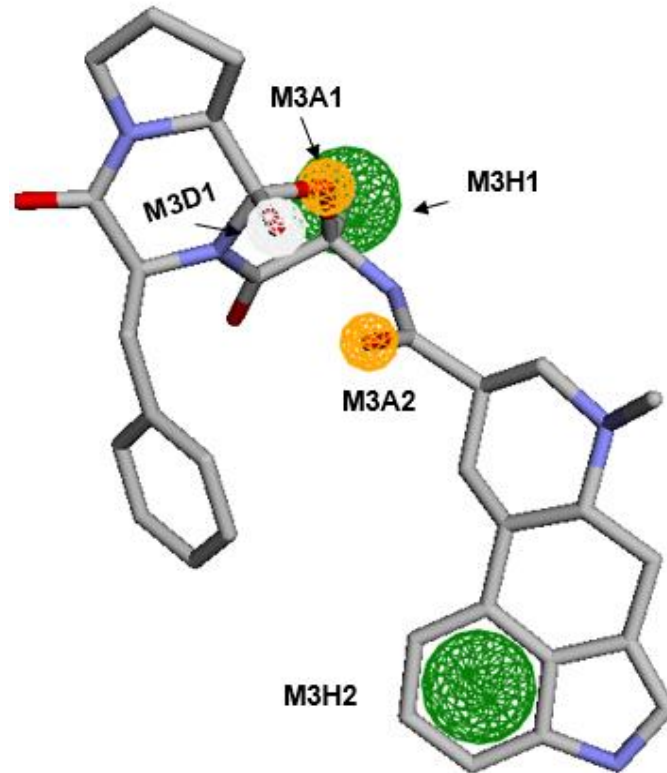
Hidrofóbico



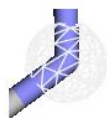
Aromático

Fonte: Autora, 2021.

Figura 6 - Modelo 3 - Modelo Farmacofórico 3D proposto para este estudo, produzidos com base na molécula da ergotamina e no receptor 5-HT1B.



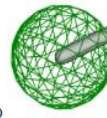
| | X | Y | Z | Raio |
|------|--------|--------|-------|------|
| M3D1 | -13,50 | -14,90 | 19,17 | 0,50 |
| M3A1 | -13,76 | -16,64 | 17,69 | 0,50 |
| M3A2 | -11,84 | -16,86 | 19,97 | 0,50 |
| M3H1 | -14,27 | -18,98 | 17,12 | 1,00 |
| M3H1 | -8,40 | -20,25 | 24,25 | 1,00 |



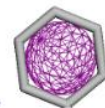
Doador de hidrogênio



Aceptor de hidrogênio



Hidrofóbico



Aromático

Fonte: Autora, 2021.

Os modelos farmacofóricos propostos apresentados nas figuras 4-6 foram submetidos a diferentes bibliotecas de moléculas disponíveis comercialmente. Cada modelo apresentou uma composição final diferente, variando as suas quantidades de 1.193 a 78.511 ligantes, sendo que alguns são encontrados repetidos, ou seja, o

mesmo ligante atende a necessidade de mais de um modelo farmacofórico, conforme disponível na tabela 3.

Tabela 3 - Composição por biblioteca de origem.

| Biblioteca de origem | Modelo Farmacofórico 1 | Modelo Farmacofórico 2 | Modelo Farmacofórico 3 |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| ChEMBL25 | N/A | 230 | N/A |
| Chemdiv | N/A | 99 | 4274 |
| ChemSpace | 2868 | 29 | 15537 |
| Labnetwork | 435 | 68 | 4304 |
| Mcule | 2263 | 187 | 24427 |
| Molport | N/A | 208 | N/A |
| Nciopen | 42 | 8 | 177 |
| Zinc | 3427 | 364 | 29792 |
| Total | 9035 | 1193 | 78511 |

Fonte: Autora, 2021.

5.2 TRIAGEM POR FILTRO DE MOLÉCULAS QUE ATINGEM O SNC

O estudo de um possível tratamento para a dependência a drogas de abuso baseia-se na avaliação de contexto de medicamentos que atinjam o sistema nervoso central (SNC). Neste estudo com uso do FAF-drugs 4 (MITEVA, M. A. et al., 2006), por meio de um filtro de moléculas que são capazes de permear a barreira hematoencefálica e atingir o SNC (JEFFREY & SUMMERFIELD 2010) foi possível reduzir de 88 739 compostos que seriam considerados para estudos posteriores, para apenas 590 moléculas. A nova biblioteca corresponde a 0,66% do conjunto de análise inicial.

5.3 TRIAGEM VIRTUAL

A avaliação de *docking* ocorreu com as mesmas bibliotecas em duas plataformas que estimam, por diferentes metodologias, a energia de ligação entre o receptor 5-HT1B e cada composto presente nas bibliotecas triadas. Para fins de comparação, avaliaram-se as moléculas que obtiveram a energia de ligação mais

baixa resultantes de ambas as metodologias. Ou seja, se algum ligante apresenta menor energia, ou primeira posição, pelo Autodock 4.2, mas se encontra na 20ª posição no Autodock Vina, este é excluído. A partir desta análise elegeram-se as moléculas que compõem o *top 5* de energia de ligação. Observou-se na tabela 4 os resultados de energia de ligação estimada por meio das duas metodologias foram próximos, com variação máxima de 1,15 kcal/mol entre os resultados da candidata 3, que é menor do que o erro padrão da metodologia, registrado como 2–3 kcal/mol para AutoDock4 (MORRIS et al., 2009) e 2,75 kcal/mol na metodologia Vina (TROTT; OLSON, 2010). Deste modo pode-se presumir que, para esse conjunto, ambas as metodologias apresentaram resultados semelhantes. Ainda assim, a ergotamina, utilizada como comparador, possui a mais baixa energia de ligação, destacando-se o resultado obtido pela metodologia Autodock 4.2, mas ainda assim encontram-se dentro dos limites de erro padrão sugerido por Morris e colaboradores.

Os resultados obtidos nesta seção predizem quais os ligantes possuem maior afinidade pelo receptor estudado. Frente ao conjunto inicial, considera-se que a metodologia oportunizou a otimização das opções sugeridas a partir do modelo farmacofórico e assim viabilizando a condução de estudos posteriores.

Tabela 4 - *Ranking* das melhores energias de ligação.

| Identificação proveniente da biblioteca | Energia de ligação Autodock 4.2 (Kcal/mol) | Energia de ligação Vina (Kcal/mol) |
|---|--|------------------------------------|
| Ergotamina | -14,51 | -13,80 |
| MCULE-9353787670_ChemDiv-K937-0762_MolPort-007-952-433_PubChem-4571839_ZINC000002938093 | -11,89 | -11,60 |
| MCULE-1958339433_PubChem-945394_ZINC00543618 | -11,73 | -12,70 |
| MCULE-5959165261_MolPort-002-880-875_PubChem-3740916_ZINC000002576497_ZINC02576497 | -11,55 | -12,70 |
| MCULE-9271493667_CHEMBL2430411_LN00496542_MolPort-002-194-036_PubChem-1260100_ZINC000001072036_ZINC01072036 | -11,58 | -11,90 |
| ZINC000001189057_ZINC01189057_ChemDiv-4477-1464_MCULE-1900979286_MolPort-002-173-117_PubChem-631996 | -11,58 | -12,00 |

Fonte: Autora, 2021.

Conforme consta na tabela 4, as candidatas são apresentadas com a identificação de diferentes bibliotecas, como Mcule, ChemDiv, Pubchem, isso se deve a presença das mesmas depositadas em mais de um local, o que pode ser um agente de confusão no estudo das mesmas. Deste modo uma nova identificação foi atribuída às candidatas avaliadas como *Top 5* com o propósito de facilitar a referência a estas, como pode ser observado na tabela 5, assim como está disponível o respectivo código SMILES, a fim de garantir a rastreabilidade das informações de cada candidata.

Tabela 5 - Nova identificação das candidatas e seus códigos SMILES.

| Nova identificação do ligante | Identificação proveniente da biblioteca | Código SMILES |
|-------------------------------|---|---|
| Candidata 1 | MCULE-9353787670_ChemDiv-K937-0762_MolPort-007-952-433_PubChem-4571839_ZINC000002938093 | <chem>Cc1ccc(cc1C)-n1cc(C(=O)Nc2nc3c(C)cccc3s2)c2cccc2c1=O</chem> |
| Candidata 2 | MCULE-1958339433_PubChem-945394_ZINC00543618 | <chem>Cc1cc2nc(Nc3nc(C)c4CCCCc4n3)nc(C)c2cc1C</chem> |
| Candidata 3 | MCULE-5959165261_MolPort-002-880-875_PubChem-3740916_ZINC000002576497_ZINC02576497 | <chem>Cc1cccc(N2CCN(CC2)c2cc(Sc3ccc4cccc4c3)nc(N)n2)c1C</chem> |
| Candidata 4 | MCULE-9271493667_CHEMBL2430411_LN00496542_MolPort-002-194-036_PubChem-1260100_ZINC000001072036_ZINC01072036 | <chem>Cc1cc(C)c2nc(Nc3nc(C)cc(n3)-c3cccc3)nc(C)c2c1</chem> |
| Candidata 5 | ZINC000001189057_ZINC01189057_ChemDiv-4477-1464_MCULE-1900979286_MolPort-002-173-117_PubChem-631996 | <chem>Cc1cc(nc(Nc2nc(C)c3cc(C)c(C)cc3n2)n1)-c1cccc1</chem> |

Fonte: Autora, 2021.

Com a finalidade de explorar a energia de interação de ligantes antagonistas, realizou-se a simulação de interação do receptor 5-HT1B com dois antagonistas conhecidos Aripiprazol (NCBI,2021a) e Isomaltano (NCBI,2021a) e ambos apresentaram energia de ligação não favorável quando comparada as candidatas e a ergotamina, como disposto na tabela 6. Deste modo, em caso de competição entre estes antagonistas e as candidatas propostas, possivelmente a interação ocorreria com as candidatas propostas.

Tabela 6 - Comparação da energia de ligação estimada entre agonista, candidatas 1 e 2 e antagonistas do receptor 5-HT1B.

| | Energia de ligação estimada Kcal/mol | | | | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | Ergotamina | Candidata 1 | Candidata 2 | Aripiprazol | Isamoltano |
| 5-HT1B (4IAR) | -13,8 | -12,7 | -12,7 | -6,6 | -9,0 |

Fonte: Autora, 2021.

5.4 AVALIAÇÃO DE SIMILARIDADE SEQUENCIAL E SIMULAÇÃO DE *DOCKING* COM OUTROS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

Dada a complexidade do SNC é possível que um ligante, cuja interação com o receptor é simulada de modo exclusivo e direcionado, quando em um meio com outros receptores disponíveis para interação possa não reproduzir os resultados *in silico*. Portanto, com a finalidade de conhecer estas possibilidades realizamos uma simulação com as demais estruturas proteicas da família dos receptores serotoninérgicos, cuja similaridade das sequências de aminoácidos foi analisada. A simulação de *docking* molecular entre as candidatas 1-5 demonstrou que todas elas possuem algum potencial de interação com os receptores serotoninérgicos testados, porém as mais baixas energias de ligação são encontradas nas simulações com o alvo molecular deste estudo, o 5-HT1B, conforme pode ser observado na tabela 6. Neste resultado constata-se que as diferenças de energia de interação avaliadas com o 5-HT1B quando comparadas aos outros receptores são em grande parte, maiores do que o desvio padrão conhecido para esta técnica (MORRIS et al., 2009; TROTT & OLSON, 2010).

A avaliação da similaridade da sequência de aminoácidos dos receptores 5-HT2AR, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT1D e 5-HT1A, estruturas apresentadas na figura 2, comparadas ao receptor 5-HT1B utilizado como alvo molecular neste estudo, demonstrou que todos possuem relevante similaridade de sequência de aminoácidos, conforme tabela 7. Esta avaliação demonstrou que há alta identidade entre as proteínas, pois os valores foram entre 41,06% e 54,77%.

Estes dados demonstram que, nas condições analisadas, as cinco candidatas possuem preferência de interação com o receptor 5-HT1B mesmo quando comparados a receptores com alta similaridade de sequência de aminoácidos.

Tabela 7 - Simulação de *docking* entre as candidatas de 1 a 5 e diferentes receptores serotoninérgicos e similaridade sequencial com o receptor 5-HT1B.

| Identificação | Energia de ligação estimada Kcal/mol | | | | | |
|---|--------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | 5-HT1B (4IAR) | 5-HT2C (6BQG) | 5-HT2B (6DRY) | 5-HT2AR (6A93) | 5-HT1D (7E32) | 5-HT1A (7E2X) |
| Ergotamina | -13,8 | -8,4 | -10,6 | -10,0 | -10,4 | -11,0 |
| Candidata 1 | -11,6 | -10,5 | -10,1 | -10,1 | -9,3 | -9,7 |
| Candidata 2 | -12,7 | -7,7 | -8,9 | -9,1 | -9,0 | -8,6 |
| Candidata 3 | -12,7 | -8,9 | -9,1 | -10,7 | -8,7 | -10,6 |
| Candidata 4 | -11,9 | -7,9 | -8,8 | -10,2 | -7,9 | -8,4 |
| Candidata 5 | -12,0 | -7,6 | -9,2 | -10,4 | -9,2 | -8,9 |
| Percentual de identidade BLAST com 5HT1B (%) | 100,0 | 54,8 | 49,6 | 45,6 | 55,0 | 41,1 |

Fonte: Autora, 2021.

5.5 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES ADMETox

A ferramenta pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) foi utilizada para prever características ADMETox das candidatas e auxiliar na condução de estudos *in vitro* posteriores. Neste estudo percebeu-se, conforme os dados disponíveis na tabela 8, considerável homogeneidade nos resultados das cinco candidatas avaliadas. Paralelamente à análise das candidatas, avaliou-se a ergotamina e a cocaína, com o propósito de discutir os resultados com ligantes com ação conhecida no receptor 5-HT1B e no SNC.

5.5.1 Absorção

Alguns pontos merecem ser destacados nas análises relacionadas à absorção. A glicoproteína P que é um transportador de efluxo de fármacos e agentes xenobióticos presente no fígado, rins, cérebro e trato gastrointestinal, assim como em células tumorais. Neste contexto, a atividade desta glicoproteína pode alterar a ação de um fármaco no SNC. Portanto, a presença de moléculas que sejam inibidoras dessa glicoproteína pode impactar no processo de distribuição das mesmas e

precisam ser consideradas em estudos posteriores (URQUHART; KIM 2009). Em nosso conjunto, todas as moléculas são inibidoras da glicoproteína P isoformas I e II, diferente da ergotamina, que não apresenta o mesmo resultado para a isoforma II e da cocaína, que não apresenta esta característica. Na análise das candidatas como possíveis substratos para glicoproteína P, apenas a candidata 4 não apresenta esta atividade. Esta característica pode indicar que a candidata tenha maior sucesso na permanência no SNC, assim como a cocaína. Além disso, todas as candidatas também apresentaram resultados satisfatórios na análise de predição de permeabilidade através das células CaCo2. Este é um método *in vitro* que utiliza células de adenocarcinoma de cólon humano e o seu resultado auxilia a prever o comportamento de permeabilidade da molécula no intestino. Considera-se alta permeabilidade resultados com valores para o coeficiente de permeabilidade aparente $\log P_{app}$ maiores do que 0,90. Do mesmo modo, as candidatas apresentaram alta predição para permeabilidade intestinal humana (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

5.5.2 Distribuição

O volume de distribuição prediz o volume necessário para conter a quantidade de fármaco absorvido no corpo para que esta seja equivalente à concentração do fármaco no plasma em equilíbrio. Deste modo, quanto maior a fração de fármaco nos órgãos e tecidos, maior é o volume de distribuição (GOLAN, 2009). Nesta análise todas as candidatas apresentaram baixo volume de distribuição. Pode-se considerar um volume baixo quando $\log V_{Dss}$ menor que -0,15 e alto quando $\log V_{Dss}$ maior que 0,45 (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

No contexto do desenvolvimento de um possível medicamento que atue no SNC outros dois fatores têm especial relevância: a permeabilidade à barreira hematoencefálica (BHE) e a permeabilidade no SNC. Idealmente resultados maiores do que 0,30 levariam a moléculas que facilmente estariam distribuídas pela BHE e resultados menores do que -1,00 apresentariam dificuldades para tal distribuição. Do mesmo modo que resultados de $\log PS$ maior que -2 indicam maior possibilidade de penetrar no SNC e $\log PS$ menor que -3 indicam ausência desta característica (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Todas as candidatas analisadas possuem resultados

favoráveis para a permeabilidade a BHE, em especial as candidatas 2 e 5 que apresentam resultados maiores do que 0,30. O resultado de logPS corrobora com o resultado para todas as candidatas. Os resultados obtidos para a ergotamina, utilizada como referência e da cocaína, que tem ação no SNC conhecida, não foram tão favoráveis como os das candidatas. Sendo assim, acredita-se que o desempenho destas candidatas a futuros medicamentos não apresentem dificuldades de distribuição para o alvo molecular no SNC.

5.5.3 *Metabolismo*

O metabolismo de xenobióticos é um processo de biotransformação destas moléculas no organismo humano em outras menos complexas e que sejam mais facilmente depuradas. De acordo com as características iniciais destas, são necessários alguns processos que são realizados por diferentes complexos enzimáticos presentes no organismo. Um importante complexo enzimático abordado em nosso estudo é o citocromo P-450 (CYP), uma grande família de hemeoxigenases responsável pela biotransformação de compostos lipofílicos em compostos mais hidrofílicos que possam ser mais facilmente eliminadas pelo corpo humano (BARREIRO; FRAGA, 2015). A superfamília da CYP é subdividida em famílias, subfamílias, isoenzimas, neste estudo foram analisados os possíveis substratos da CYP2D6 e CYP3A4 e possíveis inibidores das CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP2D6. Observou-se que todas as candidatas e a ergotamina são substratos da CYP3A4, assim como todas são inibidoras das CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, diferente da ergotamina.

A CYP3A4 é um importante complexo enzimático responsável pelo metabolismo de xenobióticos tanto hepático quanto intestinal, sendo responsável por 50% do metabolismo oxidativo de fármacos (GOLAN, 2009). Deste modo é um importante apontamento de interação medicamentosa com outras moléculas que sejam metabolizadas por esta CYP. Neste contexto a principal interação que deve ser foco dos estudos posteriores é com a cocaína, que também pode ser metabolizada por esta isoenzima (KATZUNG; TREVOR, 2017). Estudos apontam que a CYP3A4 participa da biotransformação de praticamente todos metabolitos primários ou, em maior parte, secundários da cocaína, inclusive daqueles gerados pelo consumo

concomitante da cocaína e álcool. Ainda que outras enzimas, como a carboxilesterase tipos 1 e 2 por exemplo, tenham maior destaque neste processo, esta interação deve ser considerada (VALENTE, et al., 2012). Dentre as possibilidades de interações medicamentosas, deve-se salientar o uso concomitante de benzodiazepínicos, classe que também é majoritariamente metabolizada pela CYP3A4 (KATZUNG; TREVOR, 2017).

Dentre as possíveis inibições das CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 é relevante ressaltar a inibição da CYP2C19. A quantidade de fármacos conhecidos que tem o seu metabolismo alterado por esta atividade não é expressiva, no entanto alguns antidepressivos tricíclicos, o Diazepam, entre outros medicamentos que possivelmente sejam administrados em pacientes em tratamento para a dependência à cocaína, são metabolizados por esta CYP. Portanto, destaca-se a relevância da avaliação desta interação para a exclusão deste viés em casos de futuros estudos clínicos (KATZUNG; TREVOR, 2017).

5.5.4 Excreção

A predição de *clearance total*, que soma a depuração renal e hepática da molécula, apresentada como Log (mL/min/Kg). Esta avaliação, além de predizer a proporção de eliminação de determinada substância do organismo, pode auxiliar a predizer informações que resultam no tempo de meia-vida destas moléculas e deve ser utilizado nos estudos futuros. Entre os resultados não foi encontrada homogeneidade.

Nenhuma das candidatas, assim como a Ergotamina apresentam características para serem substratos do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2), que são responsáveis por facilitar a passagem da molécula do sangue para os túbulos renais (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

5.5.5 Toxicidade

O teste de AMES é um método utilizado para avaliar um potencial mutagênico de compostos usando bactérias (KLAASSEN; WATKINS, 2015). Seu resultado positivo indica que a molécula é mutagênica e pode atuar como carcinogênica (PIRES;

BLUNDELL; ASCHER, 2015). Observou-se que apenas a candidata 3 e a ergotamina apresentaram resultado positivo que demanda atenção para os estudos posteriores.

A dose máxima tolerada em humanos é um importante preditor pois auxilia no delineamento de estudos complementares. Os resultados são apresentados em log mg/Kg/dia, sendo considerada uma dose máxima baixa com valores menores do que 0,477 mg/Kg/dia e elevado quando maior do que esse valor (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Nesta análise observou-se que as moléculas 2, 3 e 4 possuem um valor baixo e as demais um valor um pouco maior. Em contrapartida a Ergotamina apresentou um resultado de -1.161 mg/Kg/dia, e a cocaína, um resultado de -0,144 mg/Kg/dia, expressivamente mais baixo do que as demais, sugerindo que ambas possuem um potencial tóxico maiores do que as candidatas em doses menores.

A predição de compostos inibidores dos canais de potássio codificados pelo gene hERG (human Ether-a-go-go) I e II é de extrema importância toxicológica pois estes são potentes causadores de síndrome de QT longo causando arritmias cardíacas. Este efeito, especialmente em pacientes em tratamento da dependência à cocaína, que podem apresentar um estado geral de saúde fragilizado, é de grande relevância. Neste estudo todas as candidatas são inibidoras de hERG II, resultado que reforça a importância desta avaliação *in silico* e confirmação desta informação *in vitro*, uma vez que se trata de um resultado que impacta na segurança destas candidatas como medicamento. Embora este indicador seja um ponto de atenção, muitos dos medicamentos comercialmente disponíveis apresentam-se seguros, mesmo com resultados semelhantes aos obtidos nesta análise (MARTINS, 2015).

As análises de LD50 em ratos e toxicidade em Minnow, dose letal para 50% dos animais submetidos ao teste LOAEL (do inglês *Lowest observed adverse effect level*), menor dose que resulta em efeito adverso observado, são análises que devem ser consideradas ao desenhar futuros estudos pré-clínicos, promovendo o uso racional de modelos animais e fornecendo maior assertividade nas análises. Da mesma maneira, a análise de toxicidade ao protozoário *T.pyriformis*, indica um potencial de toxicidade para todas as candidatas e a ergotamina analisadas neste estudo. Este resultado de segurança possui relevância no desenho e condução dos próximos estudos, porém não é exclusivo ou determinante para a sua condução.

Todas as candidatas, a ergotamina e a cocaína apresentaram um potencial hepatotóxico. Este dado, embora relevante para a necessidade de estudos posteriores

e a longo prazo, com acompanhamento do impacto do tratamento nas enzimas e marcadores de dano hepático, deve ser considerado com cautela, uma vez que um fármaco já aprovado e considerado seguro, a ergotamina, também apresenta este resultado. Ao mesmo tempo, nenhuma destas candidatas apresentou potência de sensibilização cutânea.

Tabela 8 - Resultados AMETox para as candidatas 1 a 5 e Ergotamina.

| Propriedade | Análise | Unidade | Ergotamina | Candidata 1 | Candidata 2 | Candidata 3 | Candidata 4 | Candidata 5 | Cocaína |
|--------------|--|----------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|
| Absorção | Solubilidade | (log mol/L) | -4,679 | -4,869 | -4,137 | -5,935 | -3,744 | -3,886 | -2,517 |
| Absorção | Caco2 permeabilidade | (log Papp 10-6 cm/s) | 0,931 | 1,060 | 1,333 | 1,175 | 1,092 | 1,277 | 1,292 |
| Absorção | Absorção intestinal Humana | (% absorvida) | 100 | 95 | 94 | 94 | 95 | 95 | 95 |
| Absorção | Permeabilidade na pele | (log Kp) | -2,874 | -2,736 | -2,806 | -2,781 | -2,737 | -2,744 | -2,675 |
| Absorção | Substrato P-glicoproteína | (sim/não) | sim | sim | sim | sim | não | sim | não |
| Absorção | P-glicoproteína inibidor I | (sim/não) | sim | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| Absorção | P-glicoproteína inibidor II | (sim/não) | não | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| Distribuição | VDss (humana) | (log L/kg) | 0,164 | -0,094 | 0,268 | 0,292 | 0,282 | 0,156 | 0,405 |
| Distribuição | Fração Não Ligada(humana) | (Fu) | 0,268 | 0,219 | 0,088 | 0,069 | 0,216 | 0,201 | 0,404 |
| Distribuição | BHE Permeabilidade | (log BB) | -0,684 | 0,193 | 0,344 | 0,201 | 0,263 | 0,529 | 0,152 |
| Distribuição | SNC Permeabilidade | (log PS) | -3,118 | -1,367 | -1,768 | -1,503 | -1,744 | -1,644 | -2,893 |
| Metabolismo | CYP2D6 Substrato | (sim/não) | não | não | não | não | não | não | não |
| Metabolismo | CYP3A4 Substrato | (sim/não) | sim | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| Metabolismo | CYP1A2 inibidor | (sim/não) | não | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| Metabolismo | CYP2C19 inibidor | (sim/não) | não | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| Metabolismo | CYP2C9 inibidor | (sim/não) | não | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| Metabolismo | CYP2D6 inibidor | (sim/não) | não | não | não | não | não | não | não |
| Metabolismo | CYP3A4 inibidor | (sim/não) | não | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| Excreção | Total Clearance | (log ml/min/kg) | 0,273 | -0,190 | 0,932 | -0,133 | 0,517 | 0,494 | 0,762 |
| Excreção | Renal OCT2 substrato | (sim/não) | não | não | não | não | não | não | não |
| Toxicidade | AMES toxicidade | (sim/não) | sim | não | não | sim | não | não | não |
| Toxicidade | Dose máxima tolerada (humanos) | (log mg/kg/dia) | -1,161 | 0,681 | 0,030 | 0,245 | 0,401 | 0,563 | -0,144 |
| Toxicidade | hERG I inibidor | (sim/não) | não | não | não | não | não | não | não |
| Toxicidade | hERG II inibidor | (sim/não) | não | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| Toxicidade | Toxicidade oral aguda em ratos (LD50) | (mol/kg) | 2,544 | 3,005 | 2,437 | 2,812 | 3,042 | 2,950 | 2,284 |
| Toxicidade | Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL) | (log mg/kg/dia) | 1,514 | 0,606 | 1,698 | 1,338 | 1,296 | 1,252 | 2,101 |
| Toxicidade | Hepatotoxicidade | (sim/não) | sim | sim | sim | sim | sim | sim | sim |
| Toxicidade | Sensibilização da pele | (sim/não) | não | não | não | não | não | não | não |
| Toxicidade | <i>T. Pyriformis</i> toxicity | (log ug/L) | 0,286 | 0,286 | 0,398 | 0,308 | 0,294 | 0,291 | 0,283 |
| Toxicidade | Toxicidade em Minnow | (log mM) | 2,074 | -0,881 | -1,688 | -0,539 | -0,344 | -3,054 | 1,735 |

Fonte: Autora, 2021.

5.6 INTERAÇÃO RECEPTOR 5-HT1B COM A ERGOTAMINA E COM AS CANDIDATAS 1 A 5

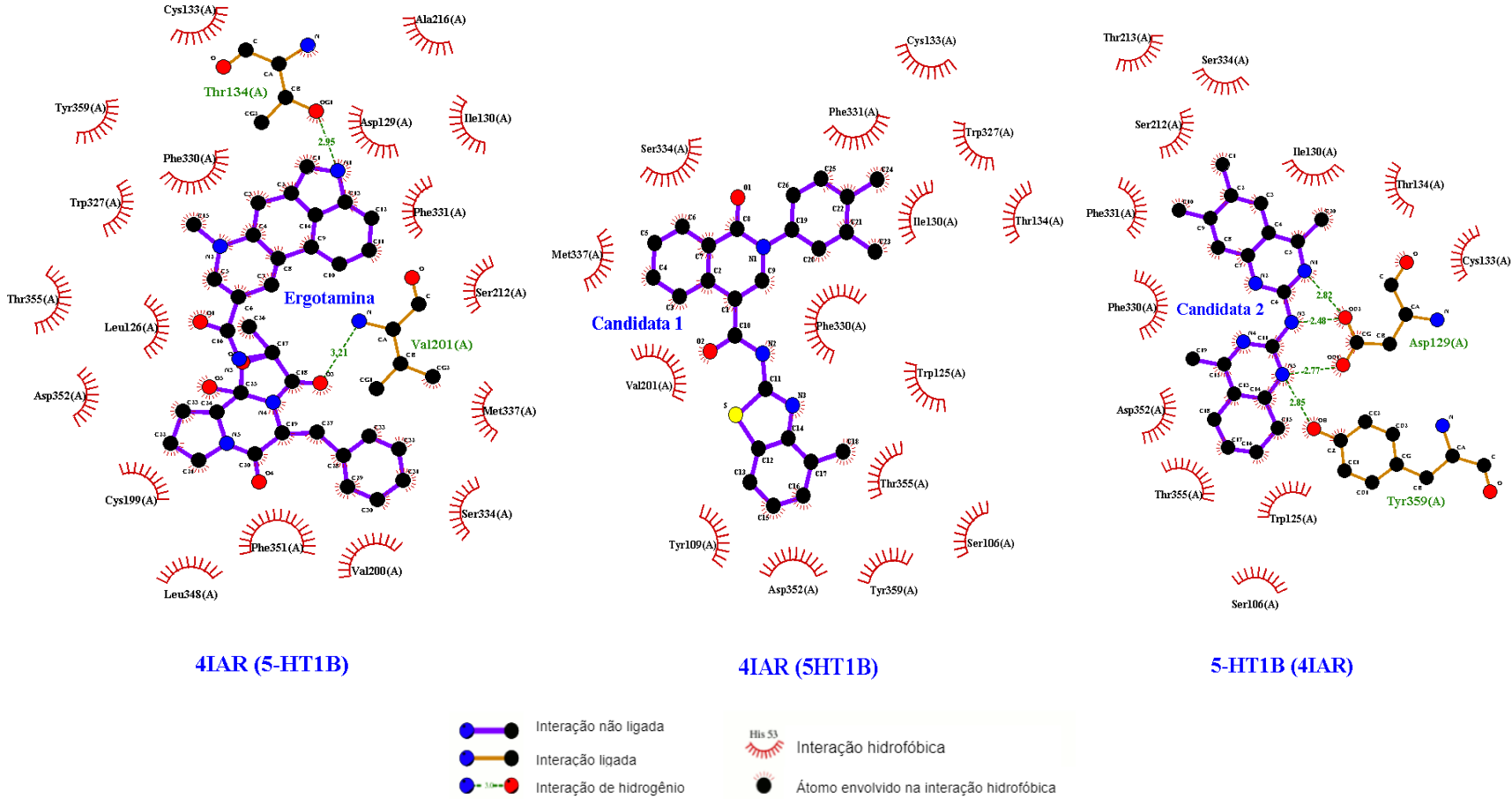
A avaliação das interações dos ligantes com os resíduos de aminoácidos do receptor 5-HT1B foi determinado pelo programa LigPlot+ v.2.2.4. Esta ferramenta identifica as interações dos ligantes com o receptor, demonstrando as interações de hidrogênio e as interações de Van der Waals, por meio de interações hidrofóbicas (LASKOWSKI & SWINDELLS, 2011).

Como pode-se observar na figura 7, a ergotamina tem as suas interações com o receptor 5-HT1B apresentadas. Esta possui um ponto ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido treonina com uma distância de 2,95 Å, resíduo que também está presente com interações hidrofóbicas com as candidatas 2, 4 e 5. Outro ponto de ligação de hidrogênio, mas com o resíduo de aminoácido Valina, com distância de 3,21 Å, pode ser observado. Este resíduo, também está presente nas interações com as candidatas 1, 3, 4 e 5, sugerindo interações hidrofóbicas. No modelo apresentado para a ergotamina também estão presentes diversas interações hidrofóbicas. Nesta mesma figura encontra-se a candidata 1 na qual devem ser destacadas as diversas interações hidrofóbicas, dentre elas uma interação entre o hidrogênio 02 e o aminoácido Valina. Ao lado, a candidata 2 está sendo apresentada com uma região com algumas interações importantes, com três interações de hidrogênio com o Aspartato, com distâncias de 2,48 Å, 2,42 Å, 2,77 Å, respectivamente. Nesta mesma região, um dos nitrogênios que proporciona a interação hidrofóbica citada anteriormente, também apresenta interação com um resíduo de Tirosina com 2,85 Å de distância.

A candidata 3, apresentada na figura 8, realiza uma interação de hidrogênio com um resíduo de aminoácido de Treonina, com distância de 2,95 Å e outra interação entre um oxigênio e um resíduo de aminoácido Valina com distância de 3,21 Å. Nesta mesma imagem, a candidata 4 é apresentada com diversas interações hidrofóbicas, entre elas uma interação do nitrogênio 1 com a Tirosina, com distância 3,05 Å de e do nitrogênio 2 com o Aspartato, com distância de 3,22 Å. Por último temos a candidata 5 apresentando uma interação entre o seu nitrogênio 2 e um aspartato, com distância de 3,23 Å, e do nitrogênio 3 com a Tirosina, com distância de 3,02 Å, além de diversas interações hidrofóbicas.

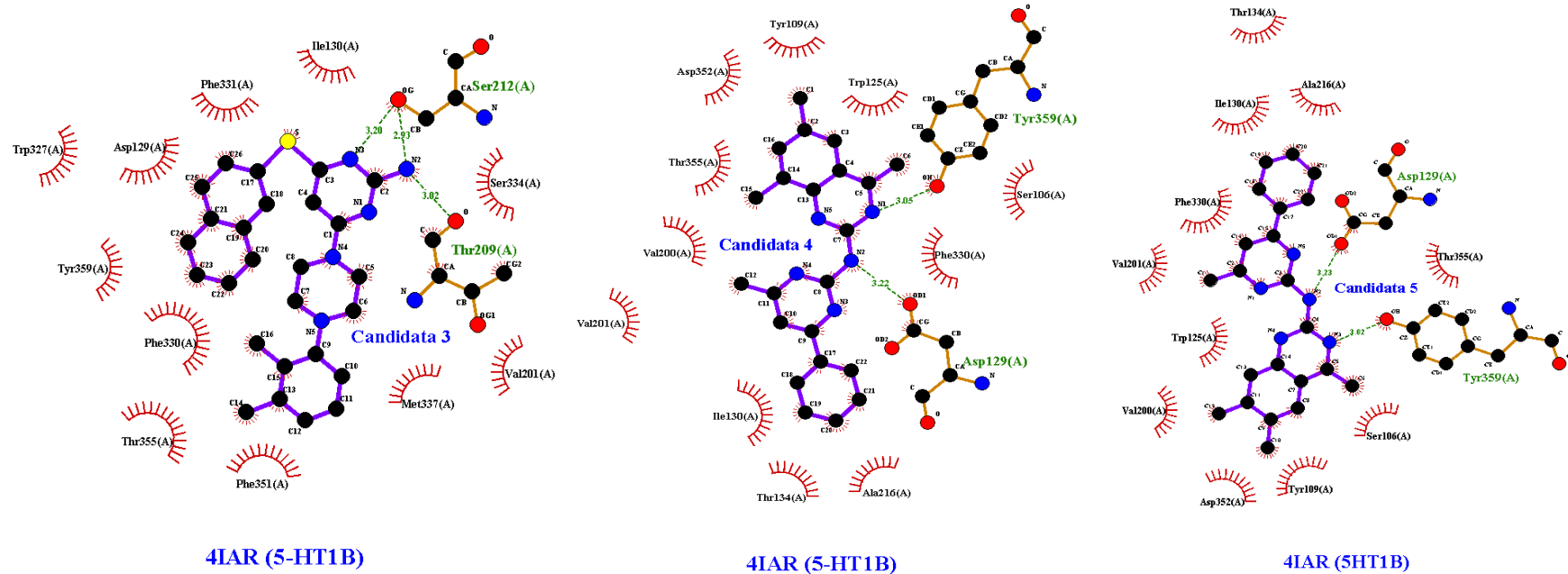
Observou-se que as candidatas 2, 4 e 5 apresentam ligações de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Aspartato na posição 129. Do mesmo modo, estas candidatas apresentam ligações de hidrogênio com o resíduo de Tirosina na posição 359. Estes resíduos também se encontram no modelo de interações apresentado para as demais candidatas, mas com a sugestão de interações hidrofóbicas. Isto pode indicar uma região da proteína com maior afinidade de interações como as analisadas, possibilitando estudos posteriores com foco nestas posições dos resíduos de aminoácidos.

Figura 7 - Interação do receptor 5-HT1B com a Ergotamina e com as Candidatas 1 e 2.



Fonte: Autora, 2021.

Figura 8 - Interações do Receptor 5-HT1B com as candidatas 3 a 5.



-  Interação não ligada
-  Interação ligada
-  Interação de hidrogênio
-  Interação hidrofóbica
-  Átomo envolvido na interação hidrofóbica

Fonte: Autora, 2021.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos farmacofóricos propostos possibilitaram uma grande quantidade de ligantes a serem analisados, atendendo satisfatoriamente o seu propósito como ferramenta para geração de biblioteca de compostos com características similares.

O filtro de predição de acesso ao SNC demonstrou eficiente seleção de possíveis candidatas a ligantes do receptor 5-HT1B, posteriormente reiterados por meio dos resultados da análise do perfil ADMETox.

A predição de *docking* com Autodock 4.2 e Vina apresentaram *ranking* de energia de interação equiparável e próximas a da Ergotamina. Os resultados de *docking* com os receptores serotoninérgicos não-alvo sugerem a preferência de interação das candidatas com o receptor alvo, o 5-HT1B. A energia de ligação dos antagonistas do receptor 5-HT1B demonstra menor afinidade do que as candidatas apresentadas neste estudo, sugerindo a preferência de interação das candidatas em detrimento das antagonistas.

Os resultados ADMETox sugerem que as candidatas têm potencial de atingir o SNC de modo eficiente, de acordo com os valores de referência das metodologias e também ao serem comparadas com a cocaína e com a Ergotamina, substâncias que tem ação sobre o receptor estudado. Além disso, as candidatas apresentam um perfil moderado de segurança nas análises de perfil toxicidade, dado que também foi comparado às informações de um fármaco comercialmente disponível, portanto considerado seguro, e para uma substância de abuso, a cocaína. Estes dados devem ser considerados em estudos posteriores em testes *in vitro* e *in vivo*.

A análise das possíveis interações das candidatas com os resíduos de aminoácidos do 5-HT1B foram capazes de sugerir uma região com potencial ação dos ligantes para estudos futuros.

As candidatas apresentaram um perfil homogêneo, não oportunizando preferência pela condução de estudos com uma ou outra candidata. Sugere-se que estudos de dinâmica molecular e relação estrutura-atividade sejam realizados para fortalecer os dados apresentados em relação à atividade das candidatas propostas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, J.I. **Stimulation of 5-HT_{1B} receptors decreases cocaine- and sucrose-seeking behavior.** *Pharmacol Biochem Behav* .2005
- BAROT S.K.; FERGUSON, S.M.; NEUMAIER, J.F. **5-HT(1B) receptors in nucleus accumbens efferents enhance both rewarding and aversive effects of cocaine.** *European Journal of Neuroscience* 2007
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2015
- BASTOS, M. et al., (Org.). **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, 2017
- BERMAN, H. M. et al., **The Protein Data Bank.** *Nucleic Acids Research*, v. 28, p. 235-242, Oct. 2000.
- BERNSTEIN, F.C. et al., **The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures.** *Archives of Biochemistry and Biophysic*, v.185, n. 2, p. 584-591, Jan. 1978
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B.C. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman.** 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012
- CAMACHO, C. et al., TL. **BLAST+: architecture and applications.** *BMC Bioinformatics*. 2009 Dec 15;10:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421. PMID: 20003500; PMCID: PMC2803857.
- CARLSON, H. A.; et al., **Developing a dynamic pharmacophore model for HIV-1 integrase.** *J. Med. Chem.* 2000.
- DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System.** DeLano Scientific; San Carlos, CA, EUA: 2002.
- FISER, A. ; Do, R.K. & Sali A. **Modeling of loops in protein structures,** *Protein Science* 9. 1753-1773, 2000.
- GOLAN, DAVID E. (Ed.) et al., **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 952 p. ISBN 9788527715201. 2009
- GUEx, N.; PEITSCH, M. C. **SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.** *Electrophoresis*, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 1997
- HARTING, P. R. et al., **Alignment of receptor nomenclature with the human genome: classification of the 5-HT_{1B} and 5HT_{1D} receptor subtypes.** *TiPS March* Vol. 17. 1996

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K.. **VMD: visual molecular dynamics**. Journal of Molecular Graphics, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996

JEFFREY, P.; SUMMERFIELD, S. **Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery**. Neurobiol Disease. 37(1):33-7 2010

KATZUNG, B. G. TREVOR, A. J (org). **Farmacologia Básica e Clínica - 13.ED**. Porto Alegre: Artmed. 2017

KIMURA, K.T., et al., **Structures of the 5-HT_{2A} receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine**. (2019) Nat Struct Mol Biol 26: 121-128. DOI: 10.1038/s41594-018-0180-z. 2019

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J.B. (Ed.). Casarett & Doull's **Essentials of toxicology**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill. Livro eletrônico. ISBN 9780071847087 2015

KLEIN, A.K, et al., **Activation of 5-HT_{1B} receptors in the Lateral Habenula attenuates the anxiogenic effects of cocaine**. Behav Brain Res. 2019 Jan 14;357-358:1-8. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.014. Epub 2018 Apr 13. PMID: 29660439; PMCID: PMC6186203. 2019

KLEIN, A.K, et al., **Attenuation of the anxiogenic effects of cocaine by 5-HT_{1B} autoreceptor stimulation in the bed nucleus of the stria terminalis of rats**. Psychopharmacology (Berl). 2017 Feb;234(3):485-495. doi: 10.1007/s00213-016-4479-3. Epub 2016 Nov 25. PMID: 27888284; PMCID: PMC5226880. 2017

KUMAR, V. et al., **Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. **LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery**. J Chem Inf Model. 2011 Oct 24;51(10):2778-86. doi: 10.1021/ci200227u. Epub Oct 5. 2011

LESNEY, M. S. **The chemistry of ADMET. Today's chemist at work**, , jan, 26-30, 2004

MARTINS, J. M., et al., **Medicamentos que podem induzir prolongamento do intervalo QT utilizados por idosos em domicílio**. Rev Ciênc Farm Básica Apl.36(2):297-305 ISSN 1808-4532. 2015

MATUSKEY, D; et al., **Reductions in Brain 5-HT_{1B} Receptor Availability in Primarily Cocaine-Dependent Humans**. Society of Biological Psychiatry 2014

MCCORVY, J.D., et al., **Structural determinants of 5-HT_{2B} receptor activation and biased agonism**. (2018) Nat Struct Mol Biol 25: 787-796. DOI: 10.1038/s41594-018-0116-7. 2018

MITEVA, M. A. et al., **FAF-drugs: free adme/tox filtering of compound collections**. Nucleic Acids Research, v. 34, n. 2, p. 738-744, Jul. 2006

MORIKAWA, H. et al., **Regulation of Central Synaptic Transmission by 5-HT1B Autoand Heteroreceptors**. Molecular pharmacology Vol. 58, No. 6 The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000

MORRIS, G. M. et al., **Autodock4 and AutodockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility**. Journal of computational chemistry, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256> 2009

NAKAZATO, T. **Dual-mode dopamine increases mediated by 5-HT1B and 5-HT2C receptors inhibition, inducing impulsive behavior in trained rats**. <https://doi.org/10.1007/s00221-019-05611-1> Experimental Brain Research (2019) 237:2573–2584 2019

National Center for Biotechnology Information (2021a). **PubChem Compound Summary for CID 127403, Isamoltane**. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isamoltane> Acesso em 18 jun, 2021

National Center for Biotechnology Information (2021b). **PubChem Compound Summary for CID 60795, Aripiprazole**. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aripiprazole> Acesso em 18 jun, 2021

NEISEWANDER J. L., CHEUNG, T.H.C; PENTKOWSKI, N. S. **Dopamine D3 and 5-HT1B receptor dysregulation as a result of psychostimulant intake and forced abstinence: Implications for medications development**. Neuropharmacology. 2014

O'DELL L. E.; PARSONS, L. H. **Serotonin 1B Receptors in the Ventral Tegmental Area Modulate Cocaine-Induced Increases in Nucleus Accumbens Dopamine Levels**. the journal of pharmacology and experimental therapeutics Vol. 311, No. 2 2004

OMS MI-GAP 2010. Organização Mundial da Saúde - **Manual de Intervenções Programa de Ação Mundial em Saúde Mental para transtornos mentais, neurológicos e por uso de álcool e outras drogas na rede de atenção básica à saúde**. 2010

PENG, Y., et al., **5-HT2C Receptor Structures Reveal the Structural Basis of GPCR Polypharmacology**. Cell 172. February 8, 2018 ^a 2018 Elsevier Inc 2018

PENTKOWSKI N. S., **Protracted Withdrawal from Cocaine Self-Administration Flips the Switch on 5-HT1B Receptor Modulation of Cocaine Abuse-Related Behaviors**. Society of Biological Psychiatry. 2012

PALCZEWSKI, K & ORBAN, T. **From Atomic Structures to Neuronal Functions of G Protein–Coupled Receptors** Annual Review of Neuroscience. 36:139–64. 2013

PIRES D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B., **pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures**. J. Med. Chem. Ed. 58, 4066–4072 2015

SINCLAIR, A. J. et al., **Headache management: pharmacological approaches** Practical Neurology Vol.15(6). 2015

SUNSERI J, KOES DR. **Pharmit: interactive exploration of chemical space.** Nucleic Acids Res. 2016 Jul 8;44(W1):W442-8. doi: 10.1093/nar/gkw287. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27095195; PMCID: PMC4987880. 2016

TROTT, O.; OLSON, A. J. **Autodock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading.** Journal of Computational Chemistry, v. 31, n. 2. 2010

TRUCHON, J.; BAYLY., C. I. **Evaluating Virtual Screening Methods: Good and Bad Metrics for the “Early Recognition” Problem.** J. Chem. Inf. Model. 2007, 47, 2, 488-508 2007

URQUHART B.L, KIM R.B. **Blood–brain barrier transporters and response to CNS-active drugs.** Eur J Clin Pharmacol. Nov;65(11):1063-70. doi:10.1007/s00228-009-714-8. 2009

United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report.** Viena 2020

VALENTE M.J. et al., **Chromatographic methodologies for analysis of cocaine and its metabolites in biological matrices in: Salih B., Çelikbıçak Ö., Gas Chromatophy – Biochemicals, Narcotics and Essential Oils.** InTECH, Croácia, 2012, cap. 8, pp. 163-194.

WANG, C. et al., **Structural Basis for Molecular Recognition at Serotonin Receptors.** Science. 340(6132): 610–614. doi:10.1126/science.1232807. 2013

XU, P., et al., **Structural insights into the lipid and ligand regulation of serotonin receptors.** (2021) Nature 592: 469-473. DOI: 10.1038/s41586-021-03376-8. 2021