

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

**TRIAGEM E SELEÇÃO, IN SILICO, DE POTENCIAIS MODULADORES DO
RECEPTOR HUMANO GABA(A)**

Aline Nogueira Cardoso

Coordenador:
Nilson Nicolau Junior

Uberlândia
Junho/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

**TRIAGEM E SELEÇÃO, IN SILICO, DE POTENCIAIS MODULADORES DO
RECEPTOR HUMANO GABA(A)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito para a aprovação na disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II do Curso
de Biotecnologia - Bacharelado da
Universidade Federal de Uberlândia sob a
orientação do Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior.

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __ / __ / __

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia

Junho/2022

RESUMO:

Essa pesquisa teve como base o problema que são os transtornos de ansiedade, que hoje chegam a atingir um terço da população global e que, embora apresente tais dados alarmantes, ainda não são doenças bem compreendidas pela ciência. De modo que tanto o diagnóstico, quanto o tratamento farmacológico desses transtornos são dificultados. Nesse sentido, buscou-se, por meio de uma abordagem computacional, descobrir drogas com potencial para modular um dos receptores mais importantes do sistema nervoso central, o GABA(A), e que possam apresentar menos efeitos colaterais que os medicamentos convencionais já aprovados. Em suma, por meio de dois modelos farmacofóricos baseados no alinhamento de ligantes, realizou-se a triagem em três bancos de dados diferentes, a ancoragem molecular de 1500 moléculas e por fim foram selecionados os 3 melhores compostos de acordo com todas as análises. Além disso, foi gerado um modelo 3D de proteína para o subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$, para comparar a interação dos melhores ligantes entre dois subtipos do receptor. Assim, o objetivo de buscar potenciais drogas moduladoras do receptor GABA(A) foi concluído e podemos dizer que os compostos selecionados têm um potencial de serem drogas ansiolíticas e não sedativas, mas, em ambos os casos, as análises in vivo e in vitro são essenciais para que essas hipóteses sejam validadas de fato.

Palavras-chave: ansiedade, ancoragem, benzodiazepínico, farmacóforos, bioinformática.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Farmacologia no tratamento dos transtornos de ansiedade	5
1.2. Modelagem de farmacóforos	8
1.3. Ancoragem molecular.....	9
1.4. Justificativa.....	10
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Geração do modelo farmacofórico baseado nos ligantes	12
3.2. Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes	12
3.3. Triagem virtual em banco de dados de compostos.....	13
3.4. Modelagem, Ancoragem Molecular e Avaliação	13
3.5. Análise de Propriedades tóxicas in silico	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Construção do modelo farmacofórico baseado no alinhamento de ligantes	14
4.2. Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes	16
4.3. Triagem virtual	17
4.4. Ancoragem molecular e avaliação.....	17
4.5. Análise da toxicidade <i>in silico</i>	20
4.6. Geração de diagramas da interação 2D proteína-ligante	21
5. CONCLUSÃO	24
6. BIBLIOGRAFIA	25

1. INTRODUÇÃO

1.1. Farmacologia no tratamento dos transtornos de ansiedade

De maneira geral, a ansiedade em si pode ser definida como sendo o estado físico e mental que decorre da antecipação de ameaças subjetivas e futuras. Juntamente com o medo, ela é um mecanismo de defesa natural e inerente ao ser humano, porém, quando ambos são apresentados de forma persistente, exagerada ou desproporcional ao estímulo, tornam-se patológicos. Nesse sentido, o conjunto de quadros clínicos conhecidos como transtornos ansiosos podem ser diagnosticados de acordo com as definições mais atuais descritas no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais ou DSM-5™ (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), e possuem uma grande variedade sintomática, incluindo fobias, preocupação excessiva, evasão social, distúrbios no sono e sintomas físicos relacionados como dores de cabeça, náusea e vômito (CASTILLO, ANA REGINA GL et al., 2000).

Os transtornos de ansiedade englobam desde patologias caracterizadas por surtos de medo ou desconforto intenso como a síndrome do pânico até condições de ansiedade excessiva e persistente por períodos longos de tempo como o transtorno de ansiedade generalizado. Entretanto, devido à complexidade do circuito cerebral, os mesmos transtornos podem ter origens de mecanismos biológicos diferentes. Desse modo, diversas abordagens farmacológicas para o tratamento dos transtornos ansiosos surgiram, utilizando-se e tendo como foco diferentes sistemas (RANG; DALE, 2016).

Um dos sistemas mais investigados atualmente é o sistema serotoninérgico, que foi a base para o descobrimento de duas classes de medicamentos: os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs) e os inibidores seletivos da recaptção de serotonina e da noradrenalina (ISRSNs). Porém, esses fármacos têm uma característica marcante em comum: todos eles só apresentam efeitos benéficos no paciente após um longo período de tempo de uso, além de aumentar o risco de efeitos colaterais nas primeiras semanas de uso, o que pode reduzir a adesão do paciente ao tratamento (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017) (KENT; MATHEW; GORMAN, 2002).

Nesse sentido, para complementar o tratamento farmacológico com ISRSs ou ISRSNs, é comum que os benzodiazepínicos sejam utilizados para controlar a ansiedade antecipatória e alívio dos sintomas durante o período de latência (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017). Os benzodiazepínicos, por sua vez, foram descobertos e desenvolvidos como fármacos

de efeito imediato e são amplamente prescritos até hoje como ansiolíticos, relaxantes, anticonvulsivantes e sedativos. Essa classe de drogas tem como alvo o sistema gabaérgico, tendo o Diazepam como um dos seus representantes mais relevantes na clínica, que foi introduzido na década de 60 e em 1975 já atingia um pico de 62 milhões de doses prescritas (Institute Of Medicine, 1979) (TALLMAN et al., 1980).

Os benzodiazepínicos são potencializadores do receptor endógeno GABA(A) (Fig. 1), uma proteína multimérica que funciona como um canal de íons cloreto. Ou seja, quando o seu ligante endógeno, o ácido gama-aminobutírico (GABA) se liga em seu sítio de ligação, o canal passa a permitir a entrada de íons negativos para dentro da membrana celular do neurônio, causando uma hiperpolarização que impossibilita a condução do impulso nervoso. Nesse sentido, o GABA(A) é o principal receptor inibitório do sistema nervoso central e é um dos receptores mais abundantes dentro do mesmo.

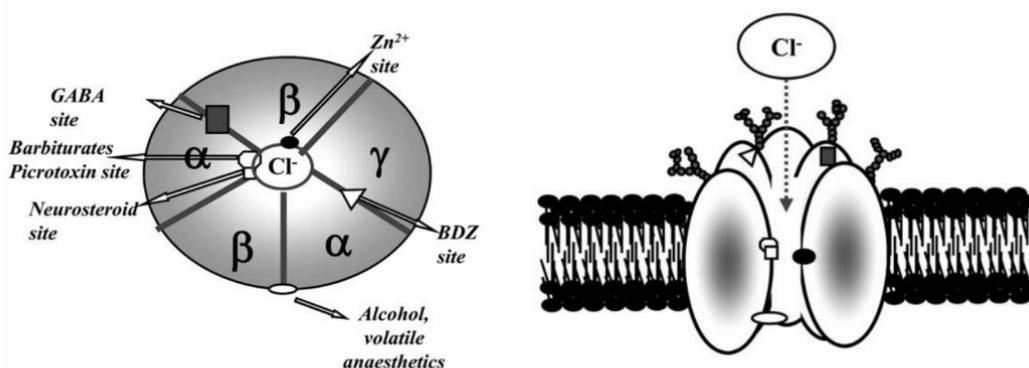


Figura 1 - Esquema do receptor GABA(A); na imagem da esquerda estão representados os sítios de ligação e as cinco subunidades e na segunda imagem está representado o canal de íons inserido na membrana celular. Fonte: DA SETTIMO et al., 2007

Visto tudo isso, é importante citar também que o GABA(A) é formado por cinco subunidades, e todas elas possuem isoformas; proteínas codificadas por genes diferentes ou que passaram por algum processo de transcrição alternativo. Diferentes combinações dessas isoformas formam diferentes arranjos pentaméricos, que em outras palavras são os diferentes subtipos desse mesmo receptor. Além disso, como é possível observar na imagem (Fig. 1), o GABA(A) é uma proteína grande, apresentando diversos sítios de ligação, porém, este estudo

tem um foco especial em drogas que se ligem ao sítio dos benzodiazepínicos, que, como explicado anteriormente, são fármacos de grande importância na clínica.

Entretanto, é de conhecimento comum que a sedação, o comprometimento cognitivo e o desenvolvimento de dependência são efeitos indesejáveis que estão associados ao uso dos benzodiazepínicos e que, por muitos anos, aumentou a busca por novos alvos em detrimento do desenvolvimento dos mesmos (MÖHLER, H., 2006). Porém, graças ao avanço das tecnologias genéticas de DNA recombinante, uma nova abordagem envolvendo o sistema gabaérgico foi descoberta: surgiram evidências de que a modulação positiva de diferentes subtipos do receptor GABA(A) produz efeitos clínicos diferentes. A modulação dos subtipos $\alpha 2\beta\gamma 2$ e $\alpha 3\beta\gamma 2$, por exemplo, está relacionada ao efeito ansiolítico dessas drogas (Tabela 1) (LOW et al., 2000). Em outras palavras, os diferentes efeitos dos benzodiazepínicos foram separados em termos moleculares (MÖHLER, Hanns, 2011) (DA SETTIMO et al., 2007).

Composição de subunidades	Distribuição no encéfalo	Efeitos farmacológicos
$\alpha 1\beta\gamma 2$	Córtex Interneurônios do hipocampo Tálamo Cerebelo	Sedativo Amnésico Anticonvulsivante
$\alpha 2\beta\gamma 2$ $\alpha 3\beta\gamma 2$	Bulbo olfatório Hipocampo Amígdala Corpo estriado Medula espinal	Ansiolítico Anticonvulsivante
$\alpha 5\beta\gamma 2$	Hipotálamo Neurônios colinérgicos e monoaminérgicos	Déficit de memória e cognição

Tabela 1. Relação entre os subtipos, sua distribuição no encéfalo e efeitos farmacológicos. Fonte: DA SETTIMO et al., 2007.

Com base nisso, surgiu um novo tipo de drogas não sedativas com efeitos ansiolíticos e que se ligam ao sítio dos benzodiazepínicos surgiu. Sabe-se, entretanto, que existe uma grande

semelhança estrutural entre os diversos subtipos de GABA(A), que leva à uma dificuldade de se encontrar ligantes realmente seletivos a somente um subtipo (CLAYTON, 2007). Por isso, essas novas drogas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de modular positivamente os subtipos $\alpha 2\beta\gamma 2$ e $\alpha 3\beta\gamma 2$ ao mesmo tempo em que antagonizam ou não apresentam eficácia quando ligadas ao subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ (MÖHLER, 2011).

Apesar de que essas drogas foram descritas apenas em testes pré-clínicos e clínicos, a maioria delas cumpriu com a sua premissa e, de fato, mostraram efeitos ansiolíticos in-vivo sem produzir sedação. Um deles, o composto L-838417, forneceu evidências de que a modulação seletiva de $\alpha 2$ e $\alpha 3$, além de produzir efeito ansiolítico e evitar a sedação in vivo, também apresentou um potencial de abuso menor em relação aos benzodiazepínicos convencionais (ROWLETT et al., 2005). A maioria dessas drogas não são aprovadas para uso em humanos devido a vários outros fatores, como a toxicidade in vivo, mas compõem uma base importante para o estudo dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de transtornos de ansiedade.

Por conseguinte, utilizando-se da similaridade estrutural dessas drogas por meio de ferramentas computacionais como a modelagem de farmacóforos e ancoragem molecular, é possível realizar uma busca em bancos de dados por compostos semelhantes que também podem ser potenciais ligantes do receptor GABA(A) com o potencial de terem maior seletividade para o subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$ e, conseqüentemente, menos efeitos colaterais do que os benzodiazepínicos já aprovados.

1.2. Modelagem de farmacóforos

O primeiro e mais simples conceito de farmacóforo existente foi introduzido por Paul Ehrlich (1906) como uma estrutura molecular que carrega as características essenciais responsáveis pela atividade biológica de uma droga. Desde então, esse conceito sofreu inúmeras mudanças e melhorias ao mesmo passo em que inspirou o desenvolvimento de diversos algoritmos para sua aplicação. Nesse sentido e, subsequente ao grande avanço tecnológico de um século de pesquisa, hoje uma extensa gama de softwares e bancos de dados virtuais já existem, tornando a modelagem de farmacóforos uma técnica de descobrimento de drogas (CADD) muito bem estabelecida e suportada (MARKT; SCHUSTER; LANGER, 2011).

Segundo a sua definição oficial mais recente, por Wermuth et al (1998), um farmacóforo é uma coleção de características estéricas e eletrônicas necessárias para garantir interações

supramoleculares ótimas com um certo alvo biológico, ativando ou bloqueando sua resposta biológica. As características mencionadas, em específico, são grupos carregados positiva e negativamente, doadores de hidrogênio, aceptores de hidrogênio, e regiões hidrofóbicas. O modelo de farmacóforo é puramente derivado desse conceito, sendo uma representação teórica dessas características comuns e respectivas das moléculas alvo (LEACH et al., 2010).

Em razão de tudo isso, o modelo pode ser obtido por meio de dois métodos diferentes, um que é baseado na estrutura e o outro no ligante, que devem ser escolhidos de acordo com a disponibilidade de informações sobre a estrutura 3D da molécula alvo. O método baseado em estrutura consiste no estudo da estrutura 3D das moléculas, podendo ser derivado somente da sua macromolécula alvo ou do complexo macromolécula-ligante. Porém, esse método é limitado pela não existência da estrutura 3D do complexo macromolécula-ligante, que é obtida experimentalmente. Nesse último caso, a análise pode ser feita exclusivamente com base na estrutura da macromolécula alvo (MARKT; SCHUSTER; LANGER, 2011).

Já o método baseado no ligante se utiliza das informações obtidas de um único ligante ou de um conjunto de ligantes relacionados, sem considerar a estrutura da molécula alvo. Nesse sentido, o programa vai realizar uma análise das características químicas comuns entre os ligantes, ou criar um modelo baseado em apenas um ligante molde (MARKT; SCHUSTER; LANGER, 2011). O PharmaGist, por exemplo, é um webservice que utiliza de um conjunto de ligantes para fazer um alinhamento e dessa forma determinar os pontos farmacofóricos. Em seguida, o algoritmo gera uma lista de modelos com suas respectivas pontuações (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008).

1.3. Ancoragem molecular

Introduzida por KUNTZ (1982) e colaboradores, a ancoragem molecular é uma metodologia bem estabelecida e amplamente utilizada no design de fármacos. A técnica se baseia na ideia de que o reconhecimento molecular entre as moléculas pode ser representado por meio de modelos tridimensionais tanto do ligante quanto do alvo. Nesse sentido, a ancoragem, tradicionalmente, prevê o modo de ligação de um determinado composto (fármacos) com um alvo, que são macromoléculas (DNA/RNA, peptídeos).

A ancoragem molecular é uma das abordagens mais comuns usadas para triagem virtual e que vai testar todos os ligantes de interesse que foram filtrados e obtidos por meio de outros

métodos. De maneira simplificada, o algoritmo vai simular o posicionamento dos ligantes dentro de seu respectivo sítio de ligação, buscando testar essa interação por meio de métodos computacionais e com o objetivo de obter os compostos com maior atividade biológica em potencial. O sucesso dessa técnica é bem documentado e sua contribuição na indústria farmacêutica já rendeu a aprovação de inúmeros medicamentos, porém ela só pode ser utilizada quando a estrutura do alvo é conhecida, seja por cristalografia de raios-X ou predita por modelagem de homologia (JORGENSEN, 2004).

Essa técnica é responsável por elucidar, basicamente, duas questões fundamentais com relação aos modos de interação entre duas moléculas: Qual a conformação da interação formada entre as mesmas e qual é a orientação de um ligante em relação ao seu alvo. Para isso, o algoritmo deve consistir de duas etapas: realizar uma busca conformacional que envolva todos os graus de liberdade do ligante (translacional, rotacional e conformacional) e uma função de pontuação que classifique as prováveis posições espaciais para um composto ou vários provenientes de uma grande biblioteca (ROGNAN, 2011).

1.4. Justificativa

Os transtornos de ansiedade, de fato, causam um grande prejuízo na vida pessoal e social do indivíduo e chegam a atingir um terço da população global, são, desse modo, os mais comuns dentro do amplo espectro de transtornos mentais (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). Ademais, têm uma relação comprovada com o aumento das taxas de suicídio, fato que torna imediata a necessidade de melhores diagnósticos e tratamentos para esse tipo de doença (SAREEN et al., 2005).

Do ponto de vista científico, entretanto, a falta de compreensão dos aspectos bioquímicos e fisiológicos que envolvem essas patologias torna o estabelecimento de medidas efetivas contra os transtornos de ansiedade, e também contra outras doenças mentais no geral, um dos problemas mais desafiadores da biomedicina atual. A base biológica para as alterações psiquiátricas não é totalmente conhecida, pois o sistema nervoso central é extremamente complexo, passando por diversos processos adaptativos de longo prazo e dificultando ainda mais o seu estudo e o subsequente desenvolvimento de drogas (RANG; DALE, 2016).

Portanto, a descoberta de drogas voltadas para a modulação dos diversos subtipos do receptor GABA(A), especialmente daqueles que estão relacionados aos transtornos de ansiedade, pode elucidar dúvidas importantes com relação aos mecanismos biológicos que

causam essas doenças, além de que diferentes compostos podem ter o potencial de modular mais de um subtipo de maneiras distintas entre si. Nesse sentido, utilizando-se de bancos de dados disponíveis e de métodos computacionais para o descobrimento de fármacos, este projeto visa propor novas moléculas para estudos de desenvolvimento de drogas ansiolíticas não sedativas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Buscar potenciais moduladores do receptor endógeno humano GABA(A), subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ e subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$, por meio da construção de um modelo farmacofórico baseado em um conjunto de ligantes, triagem virtual, ancoragem molecular e modelagem molecular por homologia.

2.2. Objetivos Específicos

- Construir um modelo farmacofórico baseado no alinhamento de ligantes;
- Realizar uma busca farmacofórica por meio de triagem virtual em bibliotecas de confôrmeros de pequenos ligantes;
- Avaliar as potenciais propriedades tóxicas, *in silico*, dos compostos selecionados.
- Construir um modelo de proteína para o subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$ por meio de modelagem molecular.
- Estudar a interação receptor-ligante, entre os dois subtipos diferentes de GABA(A) e os compostos selecionados na triagem virtual, por meio da técnica de ancoragem molecular;
- Analisar os resultados da ancoragem molecular por meio de funções de pontuação e convergência dos compostos na interação entre os dois subtipos de GABA(A).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Geração do modelo farmacofórico baseado nos ligantes

Nessa primeira etapa, todas as estruturas 3D de interesse, que foram retiradas do banco de dados de química PubChem (KIM et al., 2021), foram submetidas no webservice Pharmagist (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008). Os modelos gerados pelo Pharmagist são detectados por alinhamento flexível múltiplo dos ligantes submetidos, onde a flexibilidade dos ligantes é tratada explicitamente e de maneira determinística no processo de alinhamento. Dessa forma, o algoritmo gera uma lista de resultados respectivos aos melhores alinhamentos que foram obtidos a partir dos dados de entrada.

3.2. Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes

Para a geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes, três bibliotecas virtuais foram usadas: o NuBBEDB, um banco de dados do Núcleo de Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais da Universidade Estadual Paulista, a biblioteca de Druglike do ZINC15 (IRWIN et al., 2012) e o CNS_MPO, um banco de dados da Chembridge Corporation, San Diego, Califórnia.

O NuBBEDB é um banco de dados virtual que contém, atualmente, 2.223 metabólitos secundários e compostos derivados da biodiversidade brasileira, além de informações botânicas, químicas, farmacológicas e toxicológicas sobre os mesmos. O webservice conta com uma ferramenta de filtragem que considera algumas características das moléculas como massa molecular e número de violações da regra de Lipinski, porém, por se tratar de um banco relativamente pequeno em questão de número de moléculas, essa ferramenta não foi utilizada e todas as moléculas do banco foram compactadas e baixadas, prosseguindo para a fase de triagem virtual (VALLI et al., 2005) (PILON et al., 2005).

Semelhantemente, o CNS_MPO, representa um subconjunto de compostos com maior probabilidade de atravessar a Barreira hematoencefálica (BHE) e que foram cuidadosamente selecionados com base em uma abordagem de otimização multiparamétrica (Wager TT et al., 2016). O banco em questão foi escolhido justamente por alinhar com o objetivo deste trabalho, que é a descoberta de ligantes específicos para um receptor endógeno encontrado somente dentro do sistema nervoso central. Por último, o mais relevante em questão de quantidade de

compostos incluídos, o banco de dados do ZINC15, que contém um total de 750 milhões de moléculas. No entanto, nesse caso, foi usada somente uma biblioteca específica dentro desse banco que é uma seleção de compostos do tipo Druglike e que contém 12.244.362 de moléculas.

3.3. Triagem virtual em banco de dados de compostos

Vista como uma tecnologia complementar a triagem de alto desempenho (HTS), a triagem virtual é um método que vem ganhando relevância graças aos sucessos recentes na predição de novos ligantes e, em muitos casos, apresentando altas taxas de acertos. Tendo como base o rastreamento computacional de ligantes em grandes bibliotecas de compostos químicos, a técnica surgiu com a ideia de reduzir significativamente o número de compostos usados na triagem e desta forma, diminuir os custos do processo de descobrimento de drogas (LYNE, 2002).

Neste estudo, a triagem virtual foi realizada pelo programa ROCS e consiste em utilizar o modelo farmacofórico, baseado em forma ou pelo alinhamento de ligantes, para a sobreposição de moléculas advindas de bancos de dados de confôrmeros. O ROCS é uma técnica rápida e realiza a triagem virtual a uma taxa de 600-800 confôrmeros por segundo. Além disso, para facilitar a compreensão exata, interpretação e comparação da triagem virtual, o ROCS contém métodos de validação estatística dos resultados alcançados na triagem. A pontuação gerada pelo programa, chamada de Tanimotocombo, avalia o quanto as moléculas triadas se encaixaram no modelo e gera uma lista com as 500 moléculas de melhor pontuação em ordem decrescente.

3.4. Modelagem, Ancoragem Molecular e Avaliação

Para realizar a técnica de ancoragem molecular, o programa GOLD (JONES et al., 1997) foi utilizado. Esse programa, como sistema de posicionamento, utiliza um algoritmo genético para calcular a ancoragem flexível entre as proteínas e os ligantes; o algoritmo busca soluções por meio de ancoragem gerando múltiplas cópias de modelos flexíveis do ligante no sítio ativo da proteína alvo (receptor), em outras palavras, ele explora toda a flexibilidade conformacional do ligante com a flexibilidade parcial da proteína. Já o algoritmo de pontuação e ranqueamento utilizado foi o CHEMPLP.

Um obstáculo, entretanto, foi a falta da estrutura 3D de um dos subtipos do receptor GABA(A), o $\alpha 2\beta\gamma 2$. Por isso, o SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018) foi utilizado para gerar o modelo 3D do segundo subtipo por meio de modelagem molecular por homologia. O SWISS-MODEL é hoje o servidor de modelagem mais amplamente utilizado publicamente e consiste no alinhamento de sequências de aminoácidos similares: uma da proteína alvo e outra de uma proteína modelo que é selecionada no início do processo.

3.5. Análise de Propriedades tóxicas in silico

Por fim, foi realizada a análise das propriedades biológicas dos compostos selecionados por meio da plataforma virtual pkCSM - pharmacokinetics (Douglas E. V. Pires) que faz uma predição das características ADMET (Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) de compostos de acordo com um sistema de “signatures” baseado em gráficos, esses que codificam padrões de distância entre átomos e são usados para representar a molécula pequena e para treinar modelos preditivos. Esta etapa foi fundamental para comprovar ou não se os potenciais inibidores apresentam os parâmetros adequados para a seleção de drogas visando a administração no organismo humano.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção do modelo farmacofórico baseado no alinhamento de ligantes

O Pharmagist realizou os alinhamentos a partir dos dados de entrada, ou seja, do conjunto de sete moléculas semelhantes que, de acordo com a bibliografia de referência (MÖHLER, Hanns, 2011), são moduladores de GABA(A) no sítio dos benzodiazepínicos e podem ser acessadas dentro do PubChem por meio dos seguintes CIDs: 9908378 (SL-651498), 216456 (Ocinaplon), 16747643 (NS-11394), 9865233 (TPA-023B), 11277418 (ELB-139), 9908880 (L-838417) e 9908684 (TPA-023). Após a submissão no webserver, o método buscou alinhar todos os ligantes em diferentes combinações e variando também o número de moléculas, buscando os pontos farmacofóricos em comum. Dessa forma, o algoritmo listou e ordenou, de acordo com um sistema de pontuação, os melhores modelos gerados.

Tabela 2. Moléculas que foram alinhadas em cada um dos modelos e seus respectivos PubChem IDs.

Modelo 1	Modelo 2
9908378 (SL-651498)	16747643 (NS-11394)
216456 (Ocinaplon)	9865233 (TPA-023B)
16747643 (NS-11394)	9908684 (TPA-023)
9865233 (TPA-023B)	-

Fonte: autoria própria

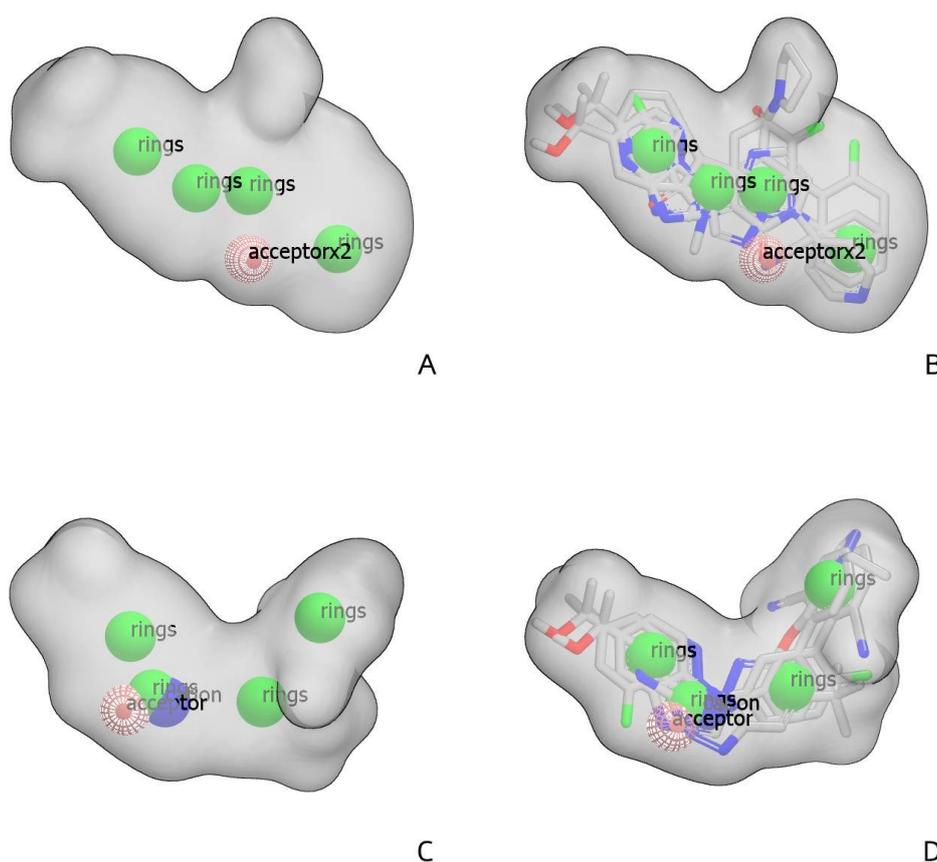


Figura 2. Imagens do Modelo 1 com somente com os seus pontos farmacofóricos: quatro anéis e um aceitor (A) e contendo os quatro ligantes que foram alinhados (B). Imagens do Modelo 2 com somente com os seus pontos farmacofóricos: quatro anéis, um aceitor e um cátion (C) e contendo os três ligantes que foram alinhados (D). Fonte: autoria própria

Entretanto, para a triagem virtual, apenas um modelo é necessário, dessa forma, o modelo 2 foi escolhido como vai ser explicado na etapa de triagem virtual. Além disso, em estudos anteriores envolvendo as moléculas TPA-023 e TPA-023B (presentes no modelo 2), foi observado que ambas sustentaram um efeito ansiolítico em pacientes sem produzir sedação. Essas drogas funcionam com base no agonismo parcial de $\alpha_2\beta\gamma_2$ e $\alpha_3\beta\gamma_2$ e eliminação da eficácia em $\alpha_1\beta\gamma_2$ e seu desenvolvimento foi interrompido devido a toxicidade pré-clínica (ATAACK; KOHUT, 2008). Nesse sentido, a semelhança entre essas duas moléculas é outro ponto positivo do modelo 2, pois mostra que o alinhamento foi coerente.

4.2. Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes

Todos os três bancos escolhidos foram submetidos a uma filtragem mais robusta, passando pelo programa FILTER do OMEGA 2.5.1.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS et al., 2010) e, logo após, pelo QUACPAC 1.6.3.1, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (<http://www.eyesopen.com>). O FILTER faz uma seleção de compostos combinando cálculos de propriedades físicas e o conhecimento de grupos funcionais. Dessa forma, ele foi usado para remover compostos indesejáveis, como moléculas com funções tóxicas, com baixa biodisponibilidade oral, com alta probabilidade de formar ligações covalentes com o alvo proteico e de compostos com probabilidade de interferência no ensaio experimental. Já o QUACPAC foi utilizado com o intuito de gerar compostos com cargas precisas ou pelo menos representadas de forma consistente. Para tanto, o QUACPAC enumera o pKa e os tautômeros de cada composto, a fim de obter os estados de protonação corretos.

Por fim, todos os compostos resultantes dessa filtragem foram submetidos ao programa OMEGA, que gera bancos de dados de multi-confôrmeros bioativos de compostos com alta velocidade e confiabilidade. Essa última etapa de geração de confôrmeros é um passo essencial para a triagem virtual que tem como base os modelos farmacofóricos, pois estes dependem de conformações bioativas para alcançar resultados satisfatórios.

4.3. Triagem virtual

Nesta etapa, os dois modelos farmacofóricos gerados na etapa anterior, foram utilizados para a triagem virtual contra o banco CNS_MPO, por meio do programa vROCS. Dessa forma, as 500 melhores moléculas, que foram listadas pelo programa em ordem decrescente e de acordo com o sistema de pontuação, foram obtidas para cada um dos modelos, totalizando 1000 moléculas triadas. O método para ranqueamento das moléculas teve como base a pontuação chamada de TanimotoCombo, que avalia o quanto o ligante se encaixa em um modelo farmacofórico, tanto em estrutura quanto nos pontos de interação.

Para determinar qual dos dois modelos (Modelo 1 e Modelo 2) seguiriam para as próximas fases, utilizamos a lógica de que, por ser um banco de dados mais específico para drogas que conseguem atravessar a barreira hemato encefálica, o modelo que conseguisse a molécula de melhor pontuação no TanimotoCombo na triagem contra o banco CNS_MPO seria selecionado. A melhor molécula da triagem obtida para o Modelo 1 teve uma pontuação de 0.87, pelo TanimotoCombo, enquanto a melhor molécula obtida para o Modelo 2 teve uma pontuação de 1.003. Dessa forma, o Modelo 2, contendo os três ligantes alinhados, foi selecionado e seguiu para a triagem contra os outros dois bancos de dados: ZINC15 e NuBBEDB, totalizando 1500 moléculas triadas resultantes da triagem virtual contra este mesmo modelo.

4.4. Ancoragem molecular e avaliação

Para a Ancoragem Molecular, a estrutura 3D de dois subtipos diferentes do receptor GABA(A) foram utilizadas. O primeiro subtipo ($\alpha 1\beta\gamma 2$), teve a estrutura cristalográfica do seu complexo macromolécula-ligante extraída diretamente de um banco de dados de proteínas, o RSCB PDB (rcsb.org)(BERMAN et al., 2000) juntamente com o composto Diazepam ligado no sítio dos benzodiazepínicos e podendo ser encontrada dentro do PDB pelo código 6x3x (KIM et al., 2020). O segundo subtipo ($\alpha 2\beta\gamma 2$), que por sua vez contém a subunidade de interesse, foi obtido por modelagem molecular por homologia.

O receptor GABA-A é uma proteína multimérica, dessa forma, as sequências de aminoácidos de cada subunidade foram retiradas do Uniprot e têm os seguintes números de

identificação: p47869, p47870 e p18507, que são as subunidades $\alpha 2$, β e $\gamma 2$, respectivamente. A proteína modelo (Template) utilizada pode ser encontrada pelo código 6DW0 no PDB (PHULERA, 2018). Logo em seguida, para obter as coordenadas do sítio de ligação, foi feita uma sobreposição das estruturas dos dois subtipos no programa Chimera 1.14 (PETTERSEN et al., 2004), transferindo o ligante (Diazepam) da sua estrutura de origem para o modelo de proteína 3D obtido no SWISS MODEL.

Dessa forma, duas proteínas alvo diferentes foram utilizadas para a ancoragem molecular. O subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ foi utilizado para a ancoragem contra as 1500 melhores moléculas ranqueadas e respectivas aos três bancos de dados (CNS_MPO, Druglike do ZINC e NuBBEDB). As ancoragens foram feitas por meio do programa GOLD e pontuadas segundo o algoritmo CHEMPLP. As 5 moléculas de cada banco de dados com melhor pontuação CHEMPLP com redundância, ou seja, cujo resultado apresentou mais de um conformero por ligante, foram selecionadas para a etapa seguinte (Tabelas 4, 5 e 6). Já o subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$, que foi obtido por modelagem molecular, foi utilizado na ancoragem somente contra a melhor molécula de cada banco de dados, ou seja, três moléculas que foram selecionadas na próxima etapa de avaliação, para que, posteriormente, os esquemas de interação 2D fossem gerados (Tabela 3).

Tabela 3. Pontuação das três melhores moléculas de cada banco na ancoragem contra o receptor GABA(A) subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ e $\alpha 2\beta\gamma 2$ comparadas.

Banco	Código do Ligante	CHEMPLP ($\alpha 1\beta\gamma 2$)	CHEMPLP ($\alpha 2\beta\gamma 2$)
NuBBEDB	2162	91.72	88.09
CNS_MPO	252521	105.92	74.02
Druglike	57998629	101.71	75.32

Fonte: autoria própria

Os valores de CHEMPLP na ancoragem contra o receptor GABA(A) subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ variaram de 85.66 até 105.92, sendo que os melhores resultados, como esperado, foram do banco de dados CNS_MPO (Tabela 4). Já na ancoragem contra o subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$, os valores variaram de 74.02 até 88.09, ou seja, houve uma diminuição relativamente significativa da pontuação, exceto no caso do ligante de código 2162 do NuBBEDB.

Tabela 4. Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados CNS_MPO contra o receptor GABA(A) subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$.

Ranking	Código do Ligante	CHEMPLP
1.	252521	105.92
2.	198169	103.56
3.	275759	102.27
4.	280262	102.26
5.	437571	103.27

Fonte: autoria própria

Tabela 5. Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados Druglike do ZINC contra o receptor GABA(A) subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$

Ranking	Código do Ligante	CHEMPLP
1.	19659841	105.37
2.	21617982	103.37
3.	2080418	102.42
4.	71865156	102.32
5.	57998629	101.71

Fonte: autoria própria

Tabela 6. Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados NuBBEDB contra o receptor GABA(A) subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$.

Ranking	Código do Ligante	CHEMPLP
1.	2162	91.72
2.	2166	89.95
3.	566	89.35
4.	1862	86.84
5.	492	85.66

Fonte: autoria própria

4.5. Análise da toxicidade *in silico*

Por fim, as 15 melhores moléculas originadas da ancoragem molecular foram submetidas ao webserver pkCSM para que uma análise da toxicidade fosse realizada. Nesta etapa, o melhor ligante de cada banco foi escolhido com base nos scores obtidos, evidenciando o resultado de características que causam toxicidade elevada em humanos como compostos mutagênicos, hepatotóxicos e inibidores dos canais de sódio hERG I e II. A inibição destes canais é um parâmetro muito importante pois está associada à síndrome do QT longo (SQTL), na qual ocorre uma alteração da repolarização ventricular que aumenta a vulnerabilidade para o desenvolvimento de taquiarritmias ventriculares e morte súbita, trata-se, portanto, de uma desordem da condução elétrica do miocárdio que pode ter origem ou ser adquirida devido ao uso de medicações (MAIOR et al., 2011).

Os resultados dessa análise estão nas Tabelas dos ANEXOS A, B e C e a interpretação de cada item dessas tabelas está disponível em (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/theory>). Embora apresentando pontuações menores pelo CHEMPLP, os compostos do banco de dados NuBBEDB se destacaram, pois nenhum deles foram preditos como mutagênicos, hepatotóxicos ou inibidores dos canais de sódio, além de terem uma máxima dose tolerada razoável. Mas, neste estudo, selecionamos apenas uma molécula, da qual teve os melhores resultados de acordo com todas as análises que foi o composto 2162. Além deste, selecionamos o composto 57998629 do banco Druglike do ZINC e o composto 252521 do banco CNS_MPO. Desta forma, todos os três ligantes foram encaminhados para a próxima fase.

4.6. Geração de diagramas da interação 2D proteína-ligante

Para a geração de diagramas da interação 2D dos ligantes selecionados com a proteína alvo, o receptor GABA-A em seus dois subtipos, utilizou-se o programa LigPlot+. Nos diagramas (Figuras 3, 4 e 5) é possível visualizar os ligantes (roxo) de cada banco interagindo com o sítio ativo da proteína alvo, incluindo seus dois subtipos ($\alpha 1\beta\gamma 2$ e $\alpha 2\beta\gamma 2$). As formas circulares em preto representam os átomos de carbono, as verdes o cloro e o flúor, as vermelhas o oxigênio e as azuis o nitrogênio. As formas vermelho-tijolo representam resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas, ao passo que as linhas tracejadas verdes representam ligações de hidrogênio.

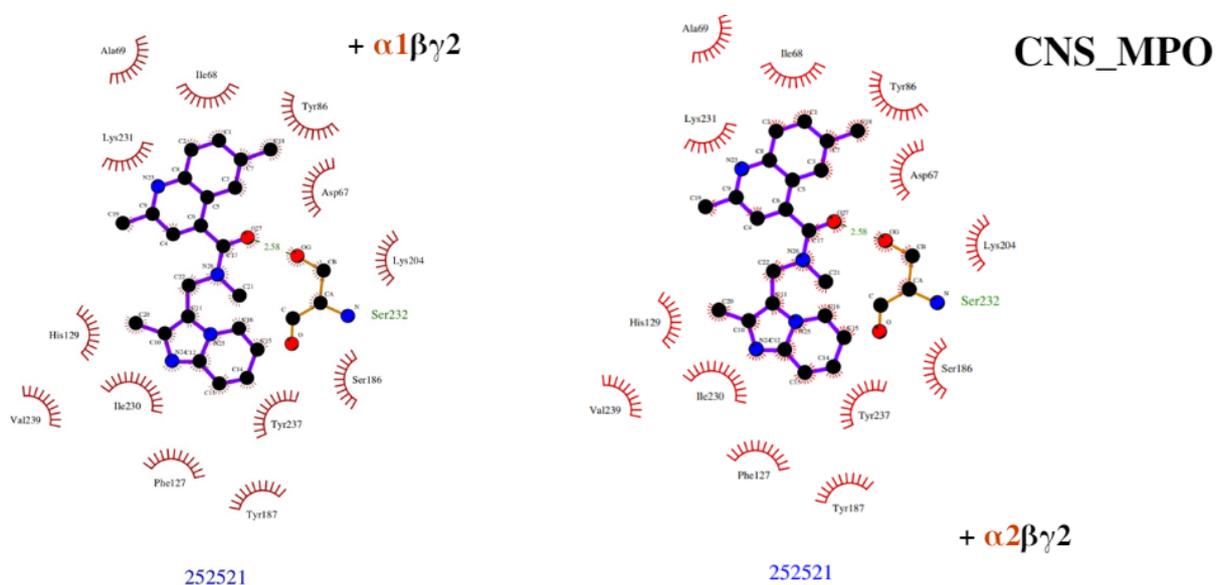


Figura 3. Interação entre o ligante escolhido do banco CNS_MPO com o receptor GABA-A, subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ (esquema da esquerda) e $\alpha 2\beta\gamma 2$ (esquema da direita). As linhas tracejadas verdes indicam a ligação de hidrogênio entre o ligante e o resíduo de Serina 232. Fonte: autoria própria.

Neste trabalho e, em teoria, dois tipos de compostos seriam interessantes de se obter como resultado: ligantes com afinidade similar em diferentes subtipos, mas que retenha sua eficácia somente em receptores $\alpha 2\beta\gamma 2$, ao mesmo tempo em que antagoniza outros subtipos, ou ligantes absolutamente seletivos para receptores contendo a subunidade $\alpha 2$. Entretanto, devido à grande similaridade estrutural entre os diversos subtipos (CLAYTON, 2007), o primeiro tipo mencionado tem maior probabilidade de existir. O L-838417, um composto que têm afinidade

semelhante para diferentes subtipos, mas que é um antagonista de subtipos contendo $\alpha 1$ e agonista parcial de $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$, é um exemplo real que ilustra essa característica (MCKERNAN, 2000).

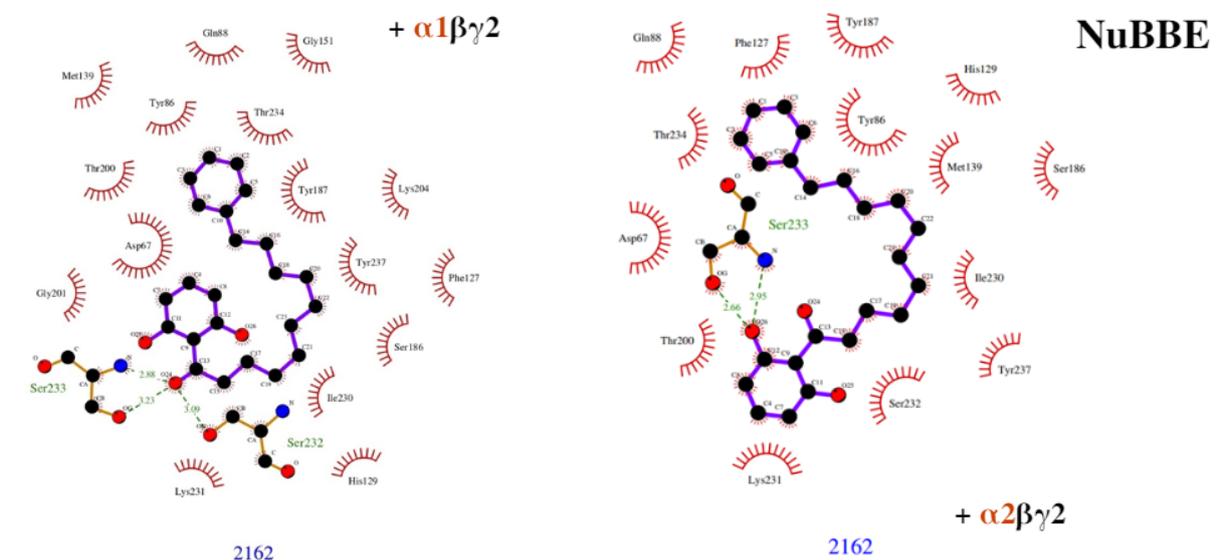


Figura 4. Interação entre o ligante escolhido do banco NuBBEDB com o receptor GABA-A, subtipo $\alpha 1\beta 2$ (esquema da esquerda) e $\alpha 1\beta 2$ (esquema da direita). As linhas tracejadas verdes indicam as três ligações de hidrogênio entre o ligante e o resíduo de Serina 233. Fonte: autoria própria.

Nesse sentido, o ligante que mais se destacou foi o do NuBBEDB, realizando três ligações de hidrogênio com os resíduos de serina do subtipo $\alpha 1\beta 2$ e duas ligações de hidrogênio com o resíduo de serina do subtipo $\alpha 2\beta 2$ (Fig. 4). Além disso, as pontuações de CHEMPLP para as suas duas ancoragens foram semelhantes: 88.09 contra o subtipo $\alpha 2\beta 2$ e 91.72 contra o subtipo $\alpha 1\beta 2$ (Tabela 3.). Esse resultado mostra que o composto tem maior potencial de interagir com o alvo de forma semelhante e com maior estabilidade para ambos os subtipos ao mesmo tempo.

Já os ligantes originados do banco CNS_MPO (Fig. 3) e Druglike do ZINC (Fig. 5) apresentaram uma e duas ligações de hidrogênio, respectivamente. Esses dois bancos obtiveram moléculas de pontuações maiores pelo CHEMPLP, apesar do fato que estabeleceram menos ligações de hidrogênio, que são mais fortes, interagindo mais por meio de ligações mais fracas (hidrofóbicas), por isso também apresentam uma interação relativamente estável com o alvo,

embora tenham apresentado resultados discrepantes entre os dois subtipos e, principalmente no subtipo de interesse, o que é indesejável (Tabela 3).

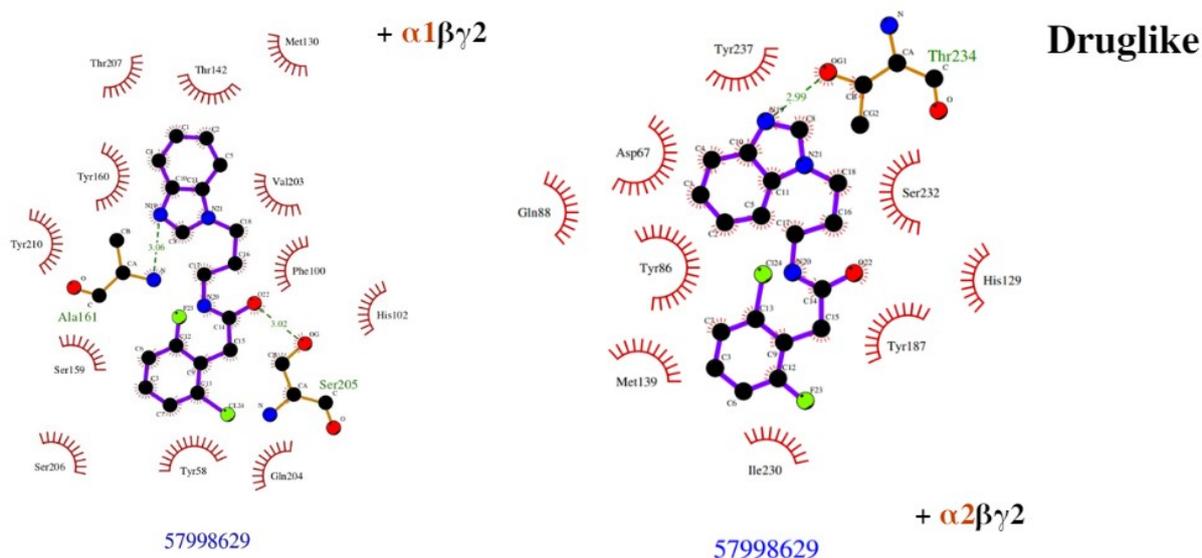


Figura 5. Interação entre o ligante escolhido do banco Druglike do ZINC com o receptor GABA-A, subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ (esquema da esquerda) e $\alpha 2\beta\gamma 2$ (esquema da direita). As linhas tracejadas verdes indicam as duas ligações de hidrogênio entre o ligante e os resíduos de Serina 205 e Alanina 161. Fonte: autoria própria.

Outro bom candidato resultante foi o composto do banco Druglike do ZINC15, que teve uma das maiores pontuações pelo CHEMPLP (Tabela 5) e interage de formas diferentes com relação aos dois subtipos (Fig. 5). No subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ o ligante formou pontes de hidrogênio com os resíduos de serina e alanina, enquanto no subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$ o mesmo formou ligações de hidrogênio com a treonina. Entretanto, as suas pontuações na ancoragem foram significativamente diferentes (Tabela 3), o que pode desfavorecer a interação entre este ligante e o subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$, que obteve a menor pontuação. Do ponto de vista deste estudo, isso é indesejável, pois aumenta as chances de interação entre esse composto e o subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ em detrimento da sua interação com o subtipo de interesse.

5. CONCLUSÃO

Ao longo de todo o período de realização deste estudo e, por meio do modelo farmacofórico que foi gerado a partir do alinhamento de diferentes ligantes, diversos procedimentos computacionais foram realizados com sucesso. Em primeiro lugar, foi feita a triagem virtual em três bancos de dados, que foram previamente preparados, e as 1500 melhores moléculas resultantes foram selecionadas para passar pela técnica de ancoragem molecular, para que pudéssemos analisar a interação entre o receptor GABA(A) e seus potenciais ligantes. Após essas análises, as cinco melhores moléculas de cada um dos bancos de dados foram selecionadas.

Em segundo lugar, foi realizada a análise *in silico* das possíveis propriedades tóxicas, visando filtrar compostos tóxicos e, novamente, fazer uma seleção das melhores moléculas. Ao final das análises, somente uma molécula de cada banco foi selecionada, obtendo-se como resultado os compostos de código 252521 do CNS_MPO, 2162 do NuBBEDB e 57998629 do ZINC. Entretanto as moléculas do CNS_MPO e da biblioteca Druglike apresentaram toxicidade mais elevada do que os ligantes do NuBBE.

Por fim, a estrutura 3D do subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$ estava disponível e foi extraída do PDB e, utilizando-se de técnicas de modelagem molecular, a estrutura 3D do segundo subtipo de interesse ($\alpha 2\beta\gamma 2$) também foi obtida com sucesso. Dessa forma, a ancoragem molecular foi realizada novamente para que os esquemas 2D de interação das três melhores moléculas fossem gerados e comparados entre si, totalizando seis esquemas (três para cada subtipo). A molécula de código 2162 se destacou entre as demais por apresentar a pontuação mais alta dos ligantes do NuBBE, um resultado da ancoragem mais consistente entre os dois subtipos e também um menor potencial de ter toxicidade.

O ligante do banco CNS_MPO também se destaca, já que faz parte de um banco composto de moléculas com maior probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Mas, infelizmente, a pontuação deste ligante no subtipo de interesse foi bem menor do que no subtipo $\alpha 1\beta\gamma 2$. Além disso, os seus resultados da análise de toxicidade não foram tão satisfatórios como os dos ligantes do NuBBE, assim como os resultados do composto da biblioteca Druglike do ZINC15.

Pode-se observar, por meio de uma comparação entre os esquemas de interação 2D, que, apesar da grande semelhança estrutural entre os dois subtipos, todas as moléculas interagiram

com os dois alvos com estabilidade, mas com modos de interação e pontuações diferentes, confirmando a hipótese inicial de que o sítio de ligação dos benzodiazepínicos difere entre os dois subtipos do receptor GABA(A) e, conseqüentemente, novas drogas podem modular esse mesmo receptor de maneiras distintas. Portanto, todas as três moléculas selecionadas possuem o potencial de modular positivamente o subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$. Embora o composto de código 2162 tenha se destacado pelo mesmo motivo.

Uma outra abordagem alternativa no âmbito deste estudo seria realizar todo o procedimento de triagem virtual, ancoragem e análise in silico de toxicidade utilizando um modelo farmacofórico baseado em forma, uma vez que a estrutura 3D do subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$ foi obtida durante o desenvolvimento deste trabalho. Embora a modelagem molecular não seja um método de estudo de estruturas moleculares tão preciso quanto a cristalografia de raio X, ainda seria de grande utilidade, visto que a estrutura 3D do subtipo de interesse ainda não está disponível em nenhum banco de dados. Mas, claramente, uma cristalografia de raio X do subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$, de preferência ligado a um ligante seletivo como o L-838417, se faz necessária e seria de grande importância para o desenvolvimento desse tipo de drogas.

Por fim, vale lembrar que este trabalho tinha como objetivo buscar potenciais drogas moduladoras do receptor GABA(A), tendo em mente as descobertas mais recentes sobre as diferenças genéticas e de função biológica dos diferentes subtipos do mesmo (MÖHLER, H. 2011). Podemos dizer que esse objetivo foi concluído, porém, as análises in vitro e in vivo são necessárias para que essas moléculas sejam de fato validadas como potenciais drogas moduladoras. Além disso, somente com essas análises é possível testar se, de fato, os ligantes apresentam algum tipo de seletividade para receptores do subtipo $\alpha 2\beta\gamma 2$, também, se têm o potencial para se tornarem fármacos ansiolíticos não sedativos.

6. BIBLIOGRAFIA

ATAACK, John R. **GABAA Receptor Subtype-Selective Efficacy: TPA023, an $\alpha 2/\alpha 3$ Selective Non-sedating Anxiolytic and $\alpha 5$ IA, an $\alpha 5$ Selective Cognition Enhancer.** *CNS neuroscience & therapeutics*, v. 14, n. 1, p. 25-35, 2008.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. **Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century.** *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 17, n. 3, p. 327–335, 2015.

CASTILLO, Ana Regina GL et al. **Transtornos de ansiedade.** *Brazilian Journal of*

Psychiatry [online]. 2000, v. 22, suppl 2 [Acessado 26 Dezembro 2021] , pp. 20-23.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-44462000000600006>>. Epub 24 Jan 2001.
ISSN 1809-452X.

CLAYTON, Terry et al. **An updated unified pharmacophore model of the benzodiazepine binding site on γ -aminobutyric acid receptors: correlation with comparative models.** Current medicinal chemistry, v. 14, n. 26, p. 2755-2775, 2007.

DA SETTIMO, F. et al. **GABAA/Bz Receptor Subtypes as Targets for Selective Drugs.** Current Medicinal Chemistry, v. 14, n. 25, p. 2680–2701, 2007.

HAWKINS, P. C. D. et al. **Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and cambridge structural database.** Journal of Chemical Information and Modeling, v. 50, n. 4, p. 572–584, 2010.

H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) **The Protein Data Bank Nucleic Acids Research**, 28: 235-242.

JONES, G. et al. **Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking.** Journal of molecular biology, v. 267, n. 3, p. 727-48, 5 abr. 1997.

JORGENSEN, W. L. **The Many Roles of Computation in Drug Discovery.** Science, v. 303, n. 5665, p. 1813–1818, 2004.

KENT, J. M.; MATHEW, S. J.; GORMAN, J. M. **Molecular targets in the treatment of anxiety.** Biological Psychiatry, v. 52, n. 10, p. 1008–1030, 2002.

KIEFER, Florian et al. **The SWISS-MODEL Repository and associated resources.** Nucleic acids research, v. 37, n. suppl_1, p. D387-D392, 2009.

KIM, Jeong Joo et al. **Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines.** Nature, v. 585, n. 7824, p. 303-308, 2020.

KIM, Sunghwan, et al. **PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces.** Nucleic acids research, v. 49, n. D1, p. 1388–D1395, 2021

KOHUT, Stephen J.; ATOR, Nancy A. **Novel discriminative stimulus effects of TPA023B, subtype-selective γ -aminobutyric-acid/benzodiazepine modulator: Comparisons with zolpidem, lorazepam, and TPA023.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 90, n. 1, p. 65-73, 2008.

KUNTZ, Irwin D. et al. **A geometric approach to macromolecule-ligand interactions.** Journal of molecular biology, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982.

LEACH, A. R. et al. **Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 53, n. 2, p. 539–558, 2010.

LOW, K. et al. **Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety.** Science, v. 290, n. 5489, p. 131–134, 2000.

LYNE, Paul D. **Structure-based virtual screening: an overview.** Drug discovery today, v. 7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.

MARKT, P.; SCHUSTER, D.; LANGER, T. **Pharmacophore Models for Virtual Screening.** [S.l: s.n.], 2011.

- MAIOR, Alex Souto et al. **Canais iônicos de potássio associados à síndrome do QT longo adquirido.** *Rev Bras Cardiol*, v. 24, n. 1, p. 42-51, 2011.
- MCKERNAN, R. M. et al. **Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABAA receptor $\alpha 1$ subtype.** *Nature neuroscience*, v. 3, n. 6, p. 587-592, 2000.
- MÖHLER, H. **The rise of a new GABA pharmacology.** *Neuropharmacology*, v. 60, n. 7–8, p. 1042–1049, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.020>>.
- PETTERSEN, ERIC F. et al. **UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis.** *Journal of computational chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- PHULERA, Swastik et al. **Cryo-EM structure of the benzodiazepine-sensitive $\alpha 1\beta 1\gamma 2S$ tri-heteromeric GABAA receptor in complex with GABA.** *Elife*, v. 7, p. e39383, 2018.
- RANG, H.P; DALE, M.M. **Farmacologia.** 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2016.
- ROWLETT, J. K. et al. **Different GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepine-like drugs in primates.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 3, p. 915–920, 2005.
- SAREEN, J. et al. **Anxiety Disorders and Risk for Suicidal Ideation and Suicide Attempts.** *Archives of General Psychiatry*, v. 62, n. 11, p. 1249, 2005.
- SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. **PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection.** *Nucleic acids research*, v. 36, n. Web Server issue, p. 223–228, 2008.
- TALLMAN, J. F. et al. **Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines.** *Science*, v. 207, n. 4428, p. 274–281, 1980.
- UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.** *Nucleic acids research*, v. 49, n. D1, p. D480-D489, 2021.
- VALLI, M.; DOS SANTOS, R.N.; FIGUEIRA, L.D.; NAKAJIMA, C.H.; ANDRICOPULO, A.D.; BOLZANI, V.S. **Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil.** *Journal of Natural Products*, 76(3), 439-444, 2013.
- WATERHOUSE, A. et al. T. **SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes.** *Nucleic Acids Res.* 46, W296-W303 (2018).

ANEXOS

ANEXO A – ANÁLISE DE TOXICIDADE DOS LIGANTES DO CNS_MPO

Código do ligante	198169	252521	275759	280262	437571
MOL_WEIGHT	344,418	358,445	353,491	385,471	381,314
LOGP	3,39202	4,07996	4,4593	3,758	1,0912
#ROTATABLE_BONDS	4	3	6	6	3
#ACCEPTORS	4	4	4	5	7
#DONORS	0	0	0	0	1
SURFACE_AREA	151,474	157,839	151,649	168,943	149,024
AMES toxicity	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Max. tolerated dose (human)	0,166	0,633	-0,061	-0,114	0,244
hERG I inhibitor	No	No	No	Yes	No
hERG II inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2,803	2,551	2,296	2,466	2,319
Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	0,721	1,036	1,034	0,946	0,871
Hepatotoxicity	Yes	No	Yes	No	Yes
Skin Sensitisation	No	No	No	No	No
<i>T.Pyriformis</i> toxicity	0,285	0,285	0,285	0,285	0,285
Minnow toxicity	-0,574	1,182	-1,623	-1,249	-0,245

ANEXO B - ANÁLISE DE TOXICIDADE DOS LIGANTES DO NUBBE

Código do ligante	492	556	1862	2162	2166
MOL_WEIGHT	581,061	314,381	328,452	354,49	396,527
LOGP	5,91529	2,6297	4,4103	6,0341	6,2538
#ROTATABLE_BONDS	10	7	10	12	13
#ACCEPTORS	7	4	3	3	4
#DONORS	0	2	1	2	1
SURFACE_AREA	243,856	135,965	144,794	156,253	173,464
AMES toxicity	No	No	No	No	No
Max. tolerated dose (human)	0,588	0,744	0,787	0,656	0,273
hERG I inhibitor	No	No	No	No	No
hERG II inhibitor	No	No	Yes	Yes	Yes
Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	3,092	2,019	1,956	1,813	1,556
Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	1,635	2,099	1,794	2,785	1,839
Hepatotoxicity	No	No	No	No	No
Skin Sensitisation	No	No	No	No	No
<i>T.Pyriformis</i> toxicity	0,292	0,985	0,86	0,46	0,405
Minnow toxicity	-2,971	0,416	-1,647	-1,97	-4,268

ANEXO C - ANÁLISE DE TOXICIDADE DOS LIGANTES DA BIBLIOTECA DE DRUGLIKE DO ZINC15

Código do ligante	19659841	21617982	42080418	57998629	71865156
MOL_WEIGHT	375,394	376,46	319,408	345,805	375,444
LOGP	5,2054	4,80784	4,45252	4,4181	5,12454
#ROTATABLE_BONDS	6	6	5	6	6
#ACCEPTORS	3	4	3	3	4
#DONORS	1	2	1	1	1
SURFACE_AREA	154,55	163,467	141,047	143,792	154,142
AMES toxicity	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Max. tolerated dose (human)	0,665	0,072	0,309	0,019	0,048
hERG I inhibitor	Yes	No	Yes	No	No
hERG II inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2,721	2,67	2,607	2,386	2,753
Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)	1,276	2,465	0,95	1,216	0,664
Hepatotoxicity	Yes	Yes	Yes	No	No
Skin Sensitisation	No	No	No	No	No
<i>T.Pyriformis</i> toxicity	0,285	0,285	0,285	0,285	0,285
Minnow toxicity	-0,386	-1,506	-1,774	-2,018	-0,505