

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual de potenciais antagonistas do receptor 2 do fator de liberação de
corticotrofina.

Pedro Augusto Villela Januário

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia – MG

Março de 2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual de potenciais antagonistas do receptor 2 do fator de liberação de corticotrofina.

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

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

Rute Magalhães Brito.

Uberlândia – MG

Março de 2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual de potenciais antagonistas do receptor 2 do fator de liberação de
corticotrofina.

Pedro Augusto Villela
Januário

Aprovado pela Banca Examinadora em: 20/03/2026 Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca
Examinadora

Uberlândia, 20 de março de 2026

Dedico este trabalho à minha mãe, pelo apoio e suporte absoluto.

“Há mais coisas entre o céu e a terra,
Horácio, do que sonha a sua filosofia.” -
Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Gladis, por, desde sempre, me mostrar o caminho do conhecimento e por estimular a minha curiosidade, nada poderia ter sido mais especial do que isso. Também sou grato pelo seu suporte incondicional e absoluto ao longo de toda a minha vida, sem ele, esta jornada teria sido impossível.

Agradeço as minhas tias Gleize e Gisleine, por serem estas mulheres profundamente admiráveis e por todo o apoio, carinho e cuidado que tiveram comigo. À minha avó, que sempre esteve do meu lado, mesmo se eu estivesse errado. Também à toda minha família que, incondicionalmente, sempre me apoiaram.

À todas as amigas incríveis que fiz ao longo desse tempo em Uberlândia. Muito obrigado pelas incontáveis risadas, pelos momentos de carinho e preocupação, pelas festas e conselhos, pelas conversas divertidíssimas e profundas, pelo total apoio e confiança e até pelos puxões de orelha. Obrigado por toda a honestidade e sinceridade que tiveram comigo, sem cada um de vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior pela orientação. Muito obrigado paciência e todos os ensinamentos que, com certeza, foram fundamentais no meu crescimento.

A todos do LAMMOL, pelo acolhimento, amizade, ensinamentos e crucial auxílio com este trabalho.

A todos os incríveis professores com quem tive a sorte de ser aluno, obrigado por me apresentarem universos que eu jamais imaginaria existir.

Por fim, à Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Biotecnologia por possibilitarem a minha formação acadêmica e a realização deste projeto.

Em suma, agradeço todos aqueles que me ajudaram neste trabalho e ao longo da minha graduação. Sem estes encontros e afetos, esse caminho teria sido muito mais tortuoso.

RESUMO

A ansiedade é uma resposta fisiológica essencial para a adaptação e sobrevivência dos animais, porém, quando excessiva e persistente, pode evoluir para transtornos de ansiedade, condições altamente prevalentes e associadas a impactos significativos na saúde pública. Nesse contexto, destaca-se o fator de liberação de corticotrofina (CRF), um hormônio, envolvido no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), e neuropeptídeo, que, quando superexpresso, tem direta relação com respostas a estímulos adversos. Com isto, o CRF relaciona-se com a patogênese da ansiedade, fato que o torna um potencial alvo farmacêutico, em especial, por meio de seus receptores. Dentre eles, está o receptor do tipo dois (CRF2R), um receptor acoplado a proteína G ainda pouco estudado e com resultados conflitantes quanto à sua função na biologia da ansiedade. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar potenciais antagonistas do CRF2R por meio de abordagens computacionais de *drug design*. Inicialmente, utilizando a estrutura do receptor (PDB id: 2JND) cristalografada e acoplada ao antagonista astressina, foi construído o modelo farmacofórico baseado nas principais interações do complexo receptor-ligante. Em seguida, três bancos de dados de pequenas moléculas foram escolhidos e filtrados (pelos *softwares* FILTER e QUACPAC), o NuBBE, o CNS-MPO e o Natural Products. Após isto, os compostos foram submetidos à triagem, seguida pelo *docking* molecular, por meio do *software* MOE. Com a molécula mais bem ranqueada no *docking* de cada um dos banco de dados, foi realizada a Dinâmica molecular (DM), por meio do *software* GROMACS, juntamente da astressina e da proteína em estado apo. Por fim, foi realizada a predição farmacocinética e de toxicidade dos três ligantes por meio do site pkCSM. A qualidade da interação entre a molécula testada e o receptor alvo foi avaliada por meio das seguintes medições: RMSD, RMSF, número de ligações de hidrogênio e análise da energia de ligação. Os resultados indicam que, apesar das moléculas apresentaram alguma toxicidade predita, elas também apresentaram um potencial positivo de interagirem com a proteína, em especial a Molport-029-885-470. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para aprofundar a compreensão dessas moléculas e avaliar seu potencial farmacêutico como antagonistas do CRF2R.

Palavras-chave: *drug design*; ansiedade; dinâmica molecular; bioinformática.

ABSTRACT

Anxiety is an essential physiological response for the adaptation and survival of animals; however, when excessive and persistent, it may develop into anxiety disorders, conditions that are highly prevalent and associated with significant impacts on public health. In this context, the corticotropin-releasing factor (CRF) stands out. CRF is both a hormone involved in the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and a neuropeptide whose overexpression is directly associated with responses to adverse stimuli. Consequently, CRF is involved in the pathogenesis of anxiety, making it a potential pharmacological target, particularly through its receptors. Among them is the corticotropin-releasing factor receptor type 2 (CRF2R), a G protein–coupled receptor that remains poorly studied and for which conflicting results exist regarding its role in the biology of anxiety. Therefore, the present study aimed to identify potential antagonists of CRF2R through computational drug design approaches. Initially, using the receptor structure (PDB ID: 2JND), crystallized in complex with the antagonist astressin, a pharmacophore model was constructed based on the main interactions of the receptor–ligand complex. Subsequently, the following three small-molecule's databases were selected and filtered using the FILTER and QUACPAC software tools: NuBBE, CNS-MPO, and Natural Products. The resulting compounds were then subjected to virtual screening followed by molecular docking using the MOE software. For the top-ranked molecule from each database, molecular dynamics (MD) simulations were performed using the GROMACS software, together with astressin and the receptor in its apo state. Finally, pharmacokinetic and toxicity predictions for the three selected ligands were carried out using the pkCSM platform. The quality of the interaction between each tested molecule and the target receptor was evaluated using the following metrics: RMSD, RMSF, number of hydrogen bonds, and binding energy analysis. The results indicate that, although the molecules showed some predicted toxicity, they also demonstrated potential to interact with the protein, particularly the compound MolPort-029-885-470. Therefore, further studies are required to better characterize these molecules and evaluate their pharmacological potential as CRF2R antagonists.

Key-words: *drug design*; Anxiety; Molecular dynamics; Bioinformatics.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico.
BHE	Barreira hematoencefálica.
CRF	Fator de liberação de corticotrofina.
CRFR1R	Receptor 1 do fator de liberação de corticotrofina.
CRFR2R	Receptor 2 do fator de liberação de corticotrofina.
DL50	Dose Letal Mediana.
DM	Dinâmica molecular.
GPCR	Receptor Acoplado à Proteína G.
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal.
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada.
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos.
MMPBSA	Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area
MOE	<i>Molecular Operating Environment.</i>
oCRF	Fator de liberação de corticotrofina ovino.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
P13-K	fosfoinosítideo 3 quinase.
PDB	<i>Protein Data Bank.</i>
PKA	Proteína Quinase A.
PKC	Proteína Quinase C.
UCN	Urocortina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constante de inibição farmacológica de alguns antagonistas de CRFRs.

Tabela 2 - Resultado do *docking* molecular.

Tabela 3 - Resultado da predição farmacocinética e toxicológica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama da via bioquímica intracelular ativada após a ligação dos antagonistas dos receptores de CRF.

Figura 2 – Estrutura química geral de antagonistas de CRFRs não peptídicos.

Figura 3 – Imagem de cristalografia do CRF2R acoplado ao antagonista astressina.

Figura 4 – Modelo farmacofórico construído.

Figura 5 – Predição 2D da interface proteína-ligante.

Figura 6 – Resultado comparado da análise RMSD.

Figura 7 – Resultado comparado da análise RMSF.

Figura 8 – Resultado da predição do número de ligações de hidrogênio.

Figura 9 – Resultados comparados da análise de energia de ligação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ansiedade	1
1.2. Receptores de CRF e seus ligantes.....	2
1.3. Descobrimientos de fármacos	6
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivos gerais	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Obtenção da proteína alvo.....	8
3.2. Preparação do banco de dados	9
3.3. Triagem e <i>Docking</i> molecular.....	9
3.4. Dinâmica molecular.....	10
3.5. Predição das Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1. Obtenção da proteína alvo.....	10
4.2. Criação do modelo farmacofórico.....	11
4.3. Preparação dos bancos de dados	12
4.4. Triagem virtual e <i>docking</i> molecular	13
4.5. Dinâmica molecular.....	14
4.5.1. RMSD	15
4.5.2. RMSF	16
4.5.3. Ligações de hidrogênio	17
4.5.4. Energia de ligação	19
4.6. PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS	20
5. CONCLUSÃO	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade

A ansiedade pode ser descrita como a apreensão gerada pela expectativa em relação a um evento, não necessariamente negativo, sendo, até determinada intensidade, saudável (Lent, 2010). Evolutivamente, este é um mecanismo fisiológico necessário para a sobrevivência das espécies, auxiliando-as na evitação de perigos. Entretanto, desde a Grécia Antiga, com os relatos de Hipócrates (460 a.C.–370 a.C.), considerado o pai da medicina, há descrições de possíveis manifestações de ansiedade patológica (Crocq, 2015). Atualmente, estes casos são caracterizados pelo excesso e persistência do sentimento por longos períodos acarretando o desenvolvimento de transtornos de ansiedade. Esse termo engloba diversas condições clínicas que impactam negativamente a qualidade de vida do paciente, como agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada e fobias etc. (American Psychiatric Association, 2013).

Fatores estressores ambientais, sejam eles crônicos ou agudos, na vida dos indivíduos, em especial na infância e adolescência (dado o ainda estado de subdesenvolvimento do sistema nervoso central), como abusos infantis, situação de vulnerabilidade social, abuso de drogas, estresses relacionados ao trabalho etc. e, juntamente de fatores gênicos do indivíduo, como histórico parental de doenças mentais, características comportamentais e de personalidade e eventos recentes da vida, são os principais fatores de risco para os transtornos de ansiedade, influenciando fortemente no surgimento destes transtornos na vida adulta (Faravelli *et al.*, 2012; Moreno-Peral *et al.*, 2014; Zimmermann *et al.*, 2020).

Um mecanismo importante ativado perante estímulos estressores e ansiogênicos é a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que se inicia na percepção de um estímulo estressor pelo sistema límbico que acarreta a ativação do hipotálamo para secretar o fator liberador de corticotrofina (CRF), que estimulará a glândula hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no sangue e que, por fim, irá estimular a produção de cortisol pelas glândulas adrenais (Faravelli *et al.*, 2012). Um estado crônico de hiperestimulação adrenal, situação comum em pessoas com desordens de ansiedade, gera uma elevada e constante concentração de cortisol sendo secretado, acarretando os principais efeitos fisiológicos danosos da ansiedade

(Faravelli *et al.*, 2012). Esta alteração pode prejudicar o sistema imunológico, aumentar pressão arterial e ser fator de risco para outras condições psiquiátricas (Ramamoorthy; Cidlowski, 2016). Além destes, transtornos de ansiedade também podem prejudicar a atenção, a tomada de decisão, a performance em esportes, o aprendizado, potencialmente promover o consumo de álcool etc. (Nechita; Nechita; Motorga, 2018).

No último Relatório de Saúde Mental da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022) foi estimado que 374 milhões de pessoas no mundo sofrem com algum transtorno de ansiedade, sendo 50% mais prevalente em mulheres que homens e com a previsão de, até 2030, as doenças psiquiátricas possam gerar um custo de 6 trilhões de dólares para os cofres de todos os países. Desta forma, se torna evidente os danos à sociedade e ao enfermo trazidos pelos transtornos de ansiedade, sendo fundamental a procura por tratamentos eficazes desta condição.

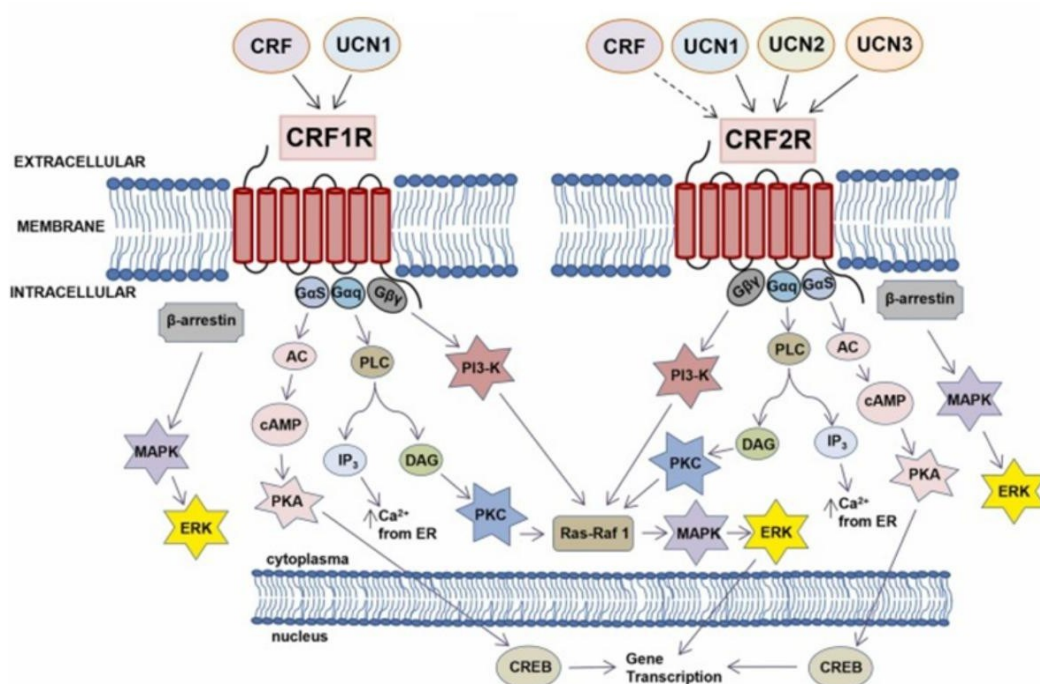
1.2. Receptores de CRF e seus ligantes

O CRF é um neuropeptídeo composto por 41 aminoácidos, caracterizado pela primeira vez em 1981 como um hormônio hipotalâmico que estimularia, primariamente, a secreção ACTH pela glândula hipófise (Vale *et al.*). Após isto, foi evidenciado a função do CRF para além do eixo HHA, nas respostas à estímulos aversivos, quando a sua administração em regiões encefálicas produziu efeitos semelhantes aos de resposta ao estresse, sendo observado, por consequência, que o seu excesso está relacionado com a patogênese da ansiedade (Hupalo *et al.*, 2019). Para além do CRF, os peptídeos urocortina (UCN), UCN II e UCN III também se ligam aos receptores de CRF e estão presentes em regiões encefálicas relacionadas à neurobiologia da ansiedade (Hauger *et al.*, 2006).

Os ligantes dos CRFRs se ligam, primariamente, a dois receptores acoplados a proteínas G (GPCRs): o CRF1R e o CRF2R. Ambos estão presentes em regiões do cérebro relacionadas à regulação emocional, como a amígdala, o tronco cerebral, o córtex cingulado e o hipocampo, por exemplo. Entretanto, o CRF2R também ocorre em outros tecidos para além do nervoso, possuindo uma afinidade menor ao CRF (Rana *et al.*, 2022). Com a ligação do neuropeptídeo aos receptores, as seguintes vias bioquímicas são desencadeadas: da proteína quinase A (PKA), da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e da fosfoinositídeo 3 quinase (PI3-K), como mostrado

pela figura 1, pelas proteínas $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ e $G_{\beta\gamma}$ respectivamente, aumentando, desta forma, os níveis de CREB e o influxo de cálcio intracelular (Domin; Śmiałowska, 2024). Como consequência, os resultados e o padrão destas sinalizações variam conforme o tecido em que o receptor é expresso, mas sendo predominantemente excitatório em neurônios (Vasconcelos *et al.*, 2020).

Figura 1 – Diagrama da via bioquímica intracelular ativada após a ligação dos antagonistas dos receptores de CRF.



O diagrama mostra a cascata bioquímica desencadeada pela ligação do CRF tanto ao CRF1R quanto ao CRF2R. Ambos os receptores são acoplados a proteínas $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ e $G_{\beta\gamma}$, que ativam a via da PKA, da PKC e da P13-K, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Domin; Śmiałowska, 2024

Enquanto há maior quantidade de estudos acerca do CRF1R e sua relação direta com a ansiedade e reação à estímulos aversivos, existem poucos e conflitantes dados sobre o CRF2R, e sua potencial atividade ansiogênica ou de regulação após o estímulo estressor. (Vasconcelos *et al.*, 2020). Foi encontrado que a atuação do receptor 2 de fator de liberação de corticotrofina na ansiedade pode ser dupla, a depender da região encefálica em que a proteína é expressa, de quando o animal é testado e do seu contexto genético e ambiental (Reul, 2002). Em um contexto agudo de estresse, respostas ansiogênicas podem ser mediadas pelo CRF2R (a partir das UCNs ou CRF) em regiões como núcleo lateral septal intermediário, amígdala e

núcleo leito da estria *terminalis*, porém, ele também está associado à fase de recuperação do estresse sofrido, reduzindo os níveis de ansiedade com o passar das horas (Reul, 2002).

Considerando a relevância do CRF na biologia da ansiedade, estudos farmacológicos *in vivo* foram conduzidos com o foco no hormônio. Neles, foi descoberto uma atividade ansiolítica de bloqueadores dos receptores de CRF, como o α -helical-CRF(9-41). A partir destes dados, outros antagonistas (peptídicos e não peptídicos) mais potentes passaram a ser desenvolvidos, com o intuito de serem utilizados em investigações experimentais e, potencialmente, em terapias farmacológicas. Dentre esses compostos, destaca-se, em especial, a astressina (Gilligan; Robertson; Zaczek, 2000).

A astressina, tal qual outros antagonistas peptídicos, foi criada a partir de uma série de alterações na estrutura do CRF ovino (oCRF), se iniciando com a depleção dos primeiros 8 resíduos do terminal-amino do hormônio. A partir desta molécula criada, o chamado oCRF (9-41), houve uma série de outras mudanças na sequência de aminoácidos original com o intuito de elevar a capacidade do peptídeo de antagonizar os receptores de CRF. Estas mudanças sequenciais geraram outros antagonistas peptídicos sintéticos (como o α -helical-CRF(9-41), o [Nle21,38] h/rCRF(12-41), o [D-Phe12,Nle21,38] h/rCRF(12-41), etc.), sendo um deles (como é mostrado na tabela 1), a astressina. (Liapakis *et al.*, 2011). A partir disto, no início dos estudos envolvendo a astressina como um novo antagonista de receptores de CRF, Spina e colaboradores administraram o peptídeo em ratos submetidos ao teste de derrota social em que foi possível atenuar os comportamentos do tipo ansioso promovidos por este modelo, evidenciando assim, a partir deste resultado, um potencial mecanismo relevante no tratamento farmacológico da ansiedade (2000).

Tabela 1. Constante de inibição farmacológica de alguns antagonistas de CRFRs.

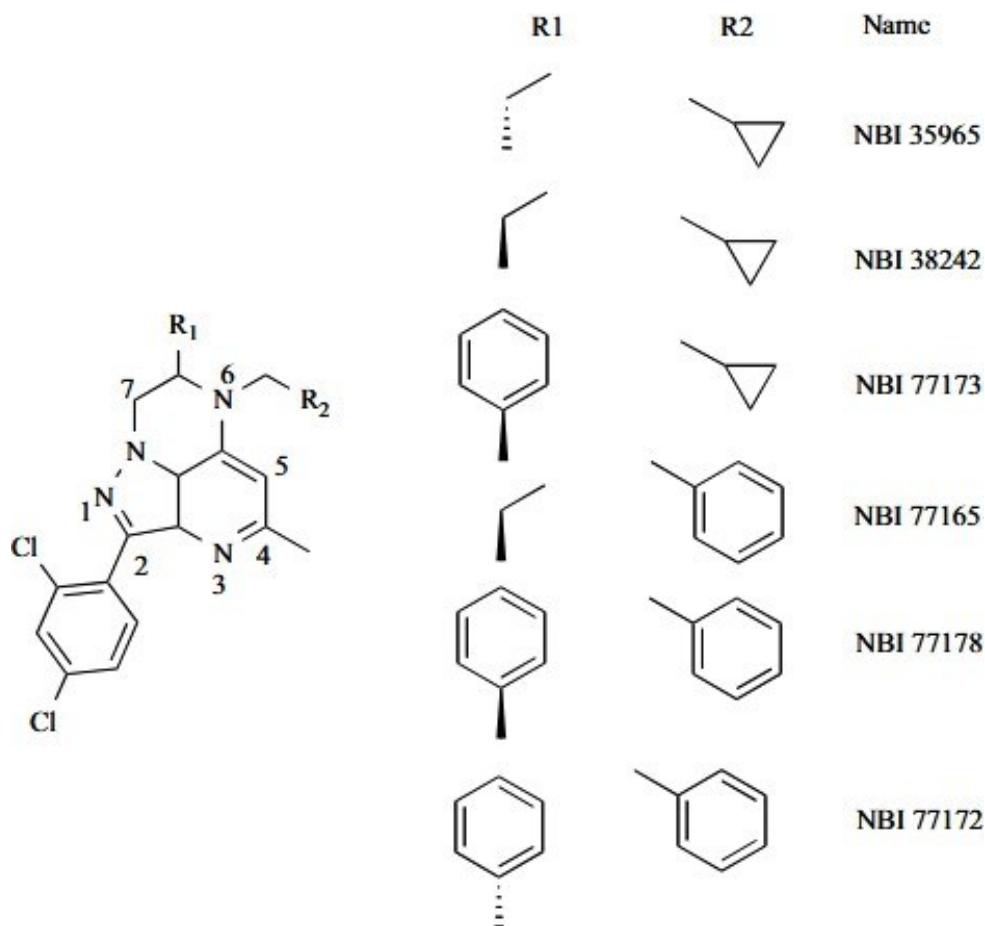
Ligante	Constante de inibição (K _i) (nM)	
	CRF1 α	CRF2 α
h/rCRF	1.9	30.7
oCRF	1.2	184.6
α -helical CRF (9-41)	23.7	96.2
Astressina	15.4	1.5

Fonte: adaptado de Liapakis *et al.*, 2011

Para além dos ligantes peptídicos, também foram desenvolvidas pequenas moléculas capazes de antagonizar estes receptores, como NBI 35965, NBI 38242, NBI 77173, etc. Essas moléculas, como ilustrado na figura 2, possuem um anel heterocíclico central contendo um átomo de nitrogênio, um grupo lipofílico na porção superior da estrutura e, na porção inferior, um grupo arila ou um anel heteroarila. Para maior afinidade pelo receptor, observa-se a importância de um substituinte em posição orto no anel inferior; em alguns casos, a estrutura também pode apresentar um centro acíclico contendo um átomo de nitrogênio (Rivier; Rivier, 2014).

Considerando que os peptídeos, de forma geral, não atravessam a BHE, isso representa um obstáculo significativo para o uso desses ligantes, como a stressina, como futuras possibilidades farmacêuticas no tratamento da ansiedade. A partir disto, estas pequenas moléculas se tornam mais interessantes, dado a maior possibilidade de atravessarem a BHE. Dessa forma, desde a primeira descrição do CRF, seus receptores têm sido considerados potenciais alvos farmacológicos para o tratamento da ansiedade (Rivier; Rivier, 2014).

Figura 2 – Estrutura química geral de antagonistas de CRFRs não peptídicos.



Estrutura química geral de antagonistas não peptídicos de CRF2R, em que “R” significa radical.

Fonte: Liapakis *et al.*, 2011

1.3. Descobrimientos de fármacos

O processo de descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos continua sendo muito complexo e custoso para a indústria, que em 2019, gastou mais de 83 bilhões de dólares para tal finalidade (“Research and Development in the Pharmaceutical Industry | Congressional Budget Office”, 2021). Neste contexto, se torna essencial a utilização de métodos mais práticos, rápidos e baratos para o descobrimento de novos compostos farmacêuticos, como, por exemplo, a triagem *in silico* (Sadybekov; Katritch, 2023).

Uma das estratégias empregadas na triagem virtual consiste no chamado farmacóforo ou modelo farmacofórico, que, por definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), consiste em um modelo abstrato, que representa as características físico-químicas necessárias que quaisquer moléculas precisam

possuir para garantir uma interação com um determinado alvo biológico (1998). A construção de um modelo farmacofórico é uma estratégia bastante utilizada em protocolos de descobrimento de fármacos e outras pesquisas *in silico*, podendo ser incorporada na filtragem pré-*docking*, no *docking* em si, utilizando o modelo como parâmetro ou restrição de ligação das moléculas, e na filtragem pós-*docking*. O primeiro é particularmente interessante por economizar a utilização de CPU, visto que os bancos de dados são reduzidos após esta primeira filtragem e o *docking* é feito com menos moléculas (Caporuscio; Tafi, 2011).

O *docking* molecular é um método de modelagem de fármacos *in silico* já muito utilizado com o objetivo de prever as interações e possíveis ligações entre as moléculas, ao predizer a conformação do ligante (moléculas pequenas) e sua posição no sítio de ligação de uma proteína (Stanzione; Giangreco; Cole, 2021). Desta forma, com a utilização de uma estratégia de filtragem baseada na estrutura 3D da proteína, em combinação com as devidas análises destes ligantes, é possível encontrar compostos *lead-like* de forma prática e mais barata (Brogi, 2019).

Outra estratégia comumente utilizada no descobrimento de fármacos é a dinâmica molecular (DM), que se baseia na simulação, em nível atômico, da conformação espacial de uma biomolécula em um sistema (envolta por água, com um ligante etc.) dada pela força que os átomos exercem entre si, em um período e em condições (como temperatura, estado de protonação, presença de outras moléculas pressão etc.) pré-estabelecidas. Para isto, são utilizados campos de força, modelos matemáticos que calculam e regem e descrevem as interações intermoleculares feitas na simulação a partir de cálculos semiempíricos. Desta forma, a DM se torna particularmente útil para compreender a mobilidade de biomoléculas, avaliar a precisão de uma estrutura modelada, predizer a ligação de ligantes em alvos, quantificar a ligação de ligantes em alvos biológicos, refinar estes ligantes e identificar sítios de ligação, sendo, portanto, uma abordagem relevante no processo de descobrimento de fármacos (Hollingsworth; Dror, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Buscar potenciais antagonistas ao receptor 2 do fator de liberação de corticotrofina a partir da estrutura tridimensional do receptor, construção de um modelo farmacofórico, triagem, *docking* e dinâmica molecular.

2.2. Objetivos específicos

- Construir um modelo farmacofórico baseado no receptor, utilizando a interface de interação com o CRF2R astressina como base.
- Realizar a triagem de três bancos de dados distintos, de pequenas moléculas orgânicas, a partir do modelo farmacofórico.
- Realizar o *docking* molecular a partir das moléculas triadas.
- Analisar a estabilidade da interação entre as moléculas selecionadas com o receptor a partir da dinâmica molecular.
- Avaliar as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das moléculas mais bem ranqueadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção da proteína alvo

A partir do banco de dados de proteínas PDB (*Protein Data Bank*) (Berman *et al.*, 2000), foi obtida a estrutura tridimensional extracelular do receptor 2 de CRF de *Mus musculus* (PDB id: 2JND) complexada com seu antagonista, mais especificamente, o peptídeo astressina (Grace *et al.*, 2007).

Baseado na estrutura do complexo CRF-Astressina, foi construído, por meio do software *Molecular Operating Environment* (MOE) (Chemical Computing Group ULC), o modelo farmacofórico, a partir das seguintes 6 regiões, do alvo, fundamentais para interação entre o antagonista e o receptor, descritas por Grace e colaboradores: Ile-67, Cys-84, Val-113, Tyr-115, Cys-118 e Glu-86 (2007). Este modelo é importante para a triagem dos bancos de dados, pois ele serve como uma referência para as moléculas, a partir da capacidade (ou não) destas em realizar interações com o receptor semelhantes ao antagonista original na mesma interface de interação.

3.2. Preparação do banco de dados

Para o processo de prospecção, foram escolhidos três bancos de dados de compostos. O primeiro, o NuBBe, é brasileiro, pertencente a Universidade Estadual Paulista (Unesp), que contém moléculas originárias de produtos naturais da flora brasileira (Vali, *et al.* 2013; Pilon, *et al.* 2017). O segundo, o CNS-MPO da empresa Chembridge Corporation [2026] contém moléculas que possuem capacidade predita de atravessarem a barreira hematoencefálica (BHE), e o terceiro, o Natural Products (NP) da empresa Molport [2026], contendo moléculas obtidas de produtos naturais ou com características de produtos naturais.

Após a escolha dos bancos de dados a serem utilizados, eles foram tratados, por meio de dois *softwares*: O primeiro, FILTER do OMEGA 2.5.1.4 (*OpenEye Scientific Software*, Santa Fe, NM), que filtra moléculas potencialmente tóxicas ou que poderiam interferir com experimentos futuros. O segundo, QUACPAC 1.6.3.1 (*OpenEye Scientific Software*, Santa Fe, NM), que visa obter cargas precisas e adequadas ao potencial hidrogeniônico do sangue tendo como base o pKa e os tautômeros de cada composto. Após a adequação dos bancos de dados, foram gerados os confôrmeros das moléculas.

3.3. Triagem e *Docking* molecular

A partir do modelo farmacofórico produzido com base nas interações do antagonista com o receptor, os bancos de dados filtrados foram triados separadamente, também pelo software MOE, de forma *full match*, ou seja, a molécula precisaria interagir em todos os 6 pontos farmacofóricos estabelecidos pelo modelo.

Antes da realização do *docking*, com auxílio do software MOE, o ligante foi preparado, processo este que remove as moléculas de água da estrutura e o estado de protonação é ajustado. Após isto, as moléculas triadas passaram pelo processo de *docking* molecular, também no MOE, para predizer e ranquear a ligação dos compostos ao CRF2R. Para isto, os seguintes parâmetros foram utilizados: o posicionamento do 1º *docking* foi usado o modelo farmacofórico, usando o escore London dG e o refinamento escolhido foi o encaixe induzido, utilizando o escore GBVI/WSA dG.

3.4. Dinâmica molecular

A molécula, de cada um dos três bancos de dados que apresentou o melhor potencial de ligação ao receptor predito pelo *docking* molecular foi selecionada para a realização da dinâmica molecular (DM), que tem objetivo de simular a interface de interação da proteína com as moléculas escolhidas e melhor predizer as interações entre as duas. Além das três moléculas, a astressina e o receptor sem ligantes (estado apo), foram simulados na DM para poder haver uma melhor comparação entre os resultados.

Para isto, primeiramente, a topologia dos ligantes foi gerada usando o servidor SwissParam (Zoete *et al.*, 2011). A realização da DM aconteceu no *software* GROMACS (Abraham *et al.*, 2015), sendo utilizado o campo de força CHARMM27 (Brooks *et al.*, 2009), o modelo de água TIP3P e um tempo de 100 nanossegundos em condições normais de temperatura e pressão como parâmetros para a realização da DM (300 K e 1 atm), dentro de uma caixa, formada ao redor da proteína, preenchida por água e íons.

A avaliação dos resultados da DM, a fim de analisar a flutuação posicional de cada átomo proteico, foi feita a partir do GROMACS e os seguintes mecanismos foram utilizados: o desvio quadrático médio desvio quadrático médio (RMSD), a flutuação quadrática média (RMSF) e o número de ligações de hidrogênio. Para além disso, a energia de ligação entre o ligante e o domínio de ligação por meio da ferramenta gmx_MMPBSA (Valdés-Tresanco *et al.*, 2021).

3.5. Predição das Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas

Após a DM, foi realizada a predição farmacocinética e toxicológica das moléculas, em que os seguintes parâmetros foram preditos, a partir do site PKCSM (Pires; Blundell; Ascher, 2015): solubilidade em água, permeabilidade da BHE, hepatotoxicidade, DL50 em ratos, dose máxima tolerada em humanos, inibição de hERG e toxicidade AMES.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção da proteína alvo

Há uma baixa disponibilidade de estruturas do CRF2R depositadas no PDB, nesse contexto, a única cristalografia complexada com um antagonista encontrada

foi a id: 2JND (imagem 3), que corresponde ao domínio extracelular do ligante proveniente de *Mus musculus*, em complexo com a astressina. Visto que a sequência da proteína possui apenas 7,8% de diferença em relação ao CRF2R humano, estas características não inviabilizam sua utilização para a prospecção de um possível novo antagonistas, porém serão necessários ensaios clínicos adicionais para a validação destas predições.

Figura 3 – Imagem de cristalografia do CRF2R acoplado ao antagonista astressina.



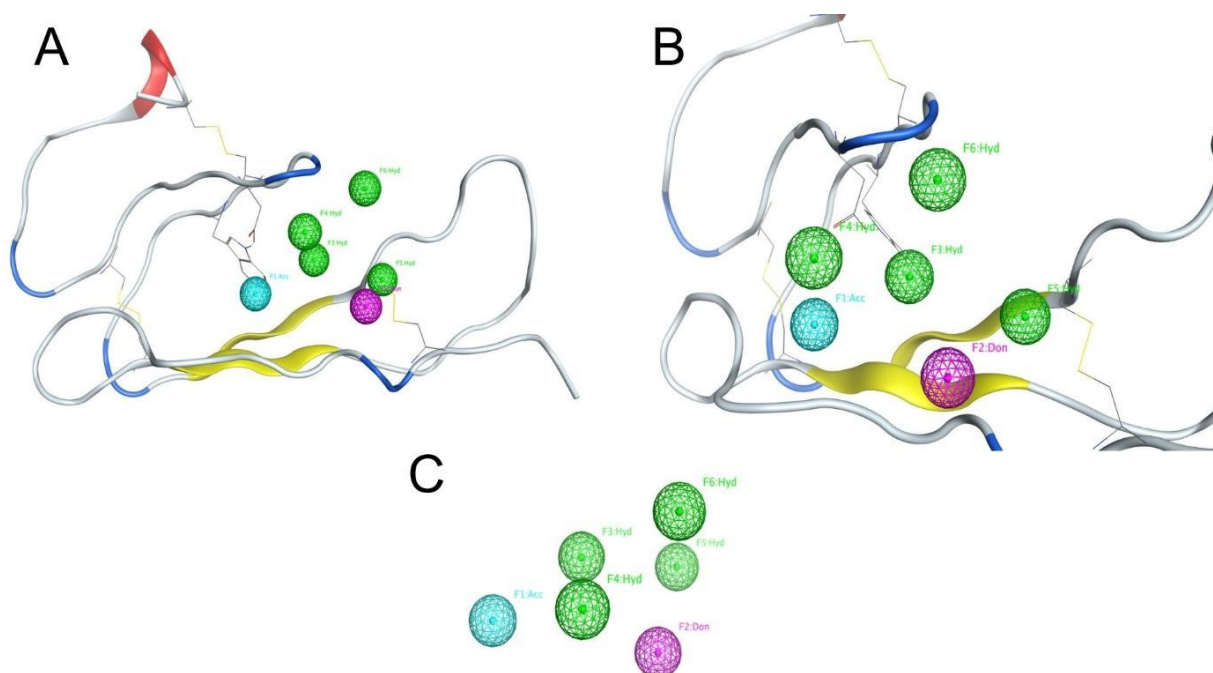
Imagem de cristalografia do receptor do fator de liberação de corticotrofina 2 (em azul) acoplado ao ligante peptídico astressina (em laranja).

Fonte: Grace et al. 2007

4.2. Criação do modelo farmacofórico

A partir de 6 interações principais entre a astressina (Grace *et al.* 2007) e o CRF2R seguintes: Ile-67, Cys-84, Val-113, Tyr-115, Cys-118 e Glu-86, foi montado o modelo farmacofórico (imagem 4).

Figura 4 – Modelo farmacofórico construído.



Modelo farmacofórico construído a partir de 6 pontos importantes (Ile-67, Cys-84, Val-113, Tyr-115, Cys-118 e Glu-86) para a interação entre a proteína e o ligante base (astressina), junto da proteína (A e B) e sozinho (C). As esferas verdes correspondem a interações hidrofóbicas, a azul àceptor de ligação de hidrogênio e roxo à doador de ligação de hidrogênio

Fonte: autoria própria (2025)

4.3. Preparação dos bancos de dados

A preparação dos bancos de dados, realizada pelos programas OMEGA e QUAPAC, foram fundamentais em, respectivamente, filtrar moléculas potencialmente tóxicas ou que afetariam o curso da pesquisa e gerar os tautômeros de cada composto. Após isto, a geração de confôrmeros, também pelo *software* OMEGA, é de extrema importância para os passos seguintes, visto que a triagem virtual depende de conformações bioativas das moléculas para gerar resultados adequados.

A seleção dos bancos de dados foi feita com base nas diferentes características das moléculas contidas neles. O CNS-MPO contém compostos que possuem um maior potencial de atravessar a BHE, fundamental, pois o alvo se encontra no SNC. O NuBBE foi selecionado por reunir uma alta diversidade de moléculas naturais, principalmente provenientes do Brasil, que possuem uma vasta variedade de estruturas e conformações geradas naturalmente. Já o NP, um grande banco de dados que inclui tanto moléculas sintetizadas com características naturais,

quanto moléculas inteiramente provenientes da natureza, sendo de maior facilidade aquisitiva. A partir disto, a integração dos três bancos resultou na triagem de, aproximadamente, 900000 pequenas moléculas.

4.4. Triagem virtual e *docking* molecular

A triagem *full-match*, feita no MOE, foi baseada no modelo farmacofórico construído, ou seja, as moléculas dos bancos de dados precisaram, necessariamente, interagir com as regiões farmacofóricas já pré-determinadas pelo modelo. Com este pré-requisito, 55 moléculas passaram pela filtragem (hits), seguindo para a etapa do *docking* molecular.

O *docking* molecular também foi realizado no MOE, utilizando o método farmacofórico como posicionamento, sendo o escore London dG e o refinamento feito pelo método de encaixe induzido, com o escore GBVI/WSA dG. A partir disto, o software gerou um ranking (S) comparativo, em que, quanto menor o valor, maior a capacidade predita da molécula interagir com a proteína alvo.

Após o *docking*, foi escolhido a molécula com o menor valor do escore S de cada um dos bancos de dados, sendo selecionadas as seguintes moléculas, em ordem de melhor colocação no ranking: Molport-029-885-470, SC-95778429 e NuBBE-1055, dos bancos de dados, NP, CNS-MPO e NuBBE, respectivamente (ver tabela 2).

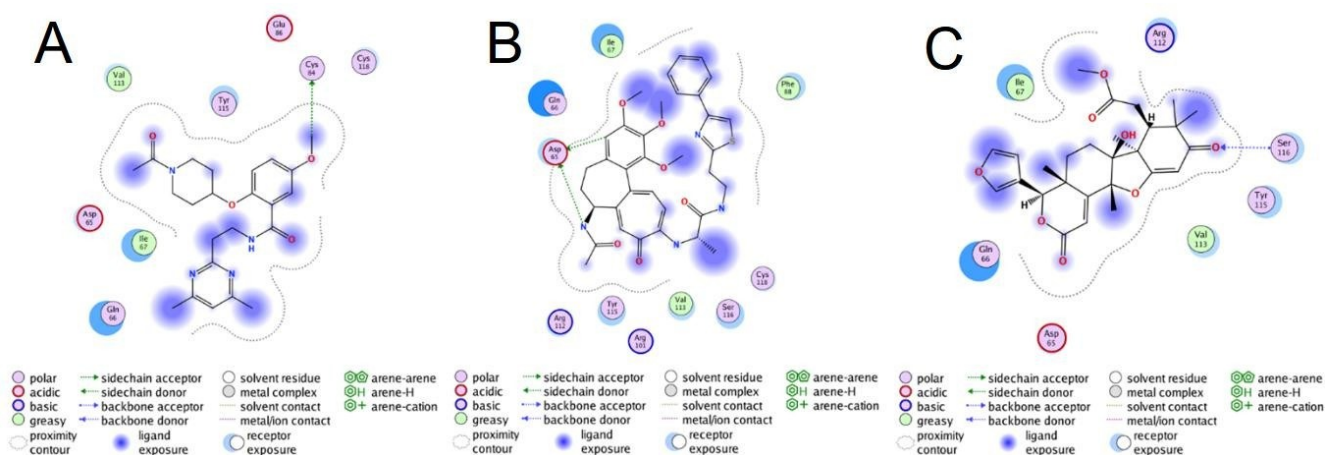
Tabela 2. Resultado do *docking* molecular.

Moléculas	S escore	Banco de dados
Molport-029-885-470	- 6,1382	Natural Products
SC-95778429	- 5,5497	CNS-MPO
NuBBE-1055	- 4,3082	NuBBE

Fonte: autoria própria (2025)

Para além do escore, o software MOE também produz predições 2D das interações feitas pelas moléculas com os resíduos de aminoácidos do receptor, sendo possível visualizar o carácter delas, bem como a exposição da molécula, ou seja, a região dela que não está envolta pela proteína.

Figura 5 – Predição 2D da interface proteína-ligante.



Predição 2D da interação entre: (A) SC-95778429 (B) Molport-029-885-470 e (C) NuBBE-1055 com o ligante, em que os círculos azuis representam a exposição do ligante, as setas entre resíduos e átomos da molécula indicam ligações de hidrogênio, as linhas tracejada mostram a proteína, os aminoácidos verdes possuem características apolares e os rosa polares.

Fonte: autoria própria (2025)

É possível notar, com base na figura 5, A, B e C, que as três moléculas, quando complexadas com a proteína, possuem uma grande região de exposição (círculos azuis nas extremidades dos compostos), o que pode significar uma pior interação com a proteína. Além disto, de forma geral, existem mais resíduos polares importantes na interface molécula-proteína. Com a Molport-029-885-470 (B), existem duas ligações de hidrogênio (setas verdes e azuis), já com as outras duas moléculas (A e C), existe apenas uma ligação de hidrogênio feita pela molécula.

De acordo com Grace e colaboradores (2007), os principais resíduos do receptor na interação com a astressina são: Ile-67, Cys-84, Val-113, Tyr-115, e Cys-118 por ligações hidrofóbicas, mas também, Phe-88 realizando ligações de hidrogênio, Glu-86 por ponte de sal e Ile-91 também por interações hidrofóbicas. Assim, é possível observar a interação dos resíduos 113, 115 e 67 com todas as três moléculas, indicando um papel crucial destes aminoácidos na interação do tipo antagonista deste receptor. Além disto, também se nota o resíduo 118, havendo interação do mesmo com SC-95778429 (A) e com a Molport-029-885-470 (B).

4.5. Dinâmica molecular

Além da molécula com maior escore no ranking do *docking* de cada banco de dados, também foi feita a DM da astressina e da proteína em condição apo (apenas a proteína, sem qualquer ligante), que serão utilizadas como comparativo entre os

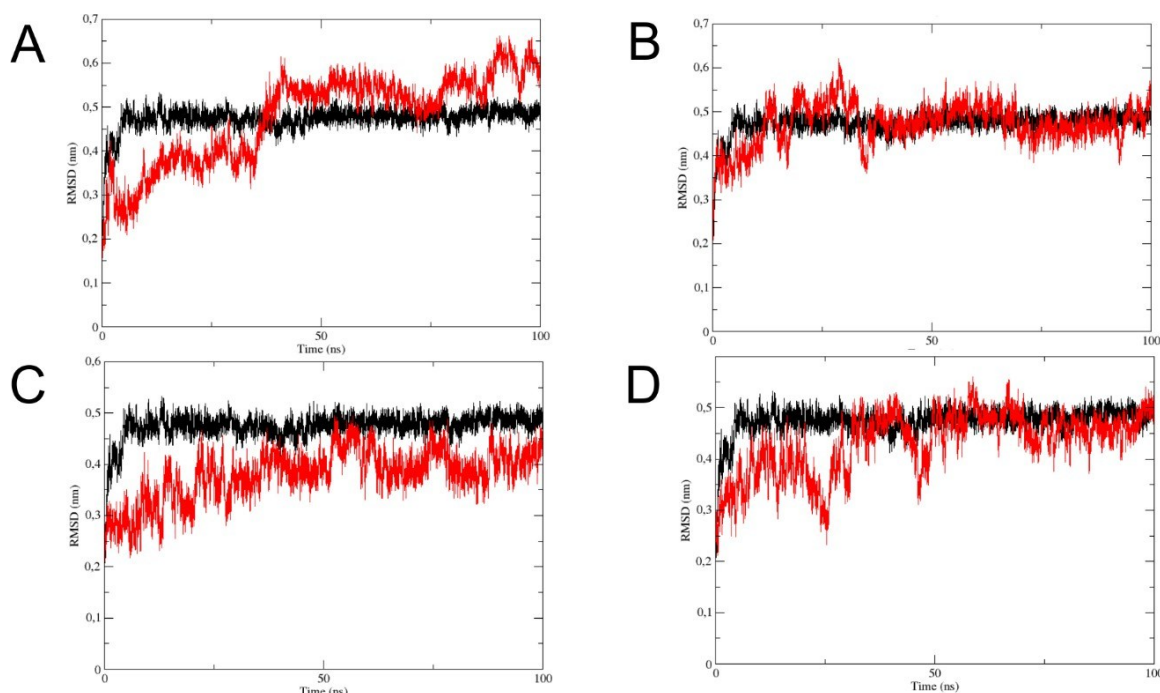
resultados, totalizando assim, 5 dinâmicas moleculares. Realizadas no *software* GROMACS, durando 100 nanosegundos, com a DM é possível simular a atividade de cada átomo em um ambiente biológico, analisar as interações da interface proteína-ligante e analisar a qualidade destas interações (Hollingsworth; Dror, 2018).

4.5.1. RMSD

A análise RMSD mede o desvio médio das posições atômicas proteicas em relação à estrutura inicial de referência, identificando assim, se o complexo proteína-ligante atinge um estado de equilíbrio ou apresenta instabilidades grandes, avaliando assim, a estabilidade estrutural do sistema. Desta forma, valores estáveis ao longo do tempo simulado são indicadores de que a estrutura manteve sua conformação global (Sargsyan; Grauffel; Lim, 2017).

Na análise de RMSD, idealmente, o gráfico inicia bastante irregular e, com o passar do tempo, começa a flutuar menos, mostrando uma estabilidade maior dos átomos proteicos. Além disto, menores valores significam uma estabilização mais adequada

Figura 6 – Resultado comparado da análise RMSD.



Resultado comparado da análise RMSD de predição do desvio médio, em nm, das posições atômicas do CRF2R. Em preto está o resultado simulado da proteína em estado apo e em vermelho da

interação da: (A) astressina, (B) SC-95778429, (C) Molport-029-885-470 e (D) NuBBe-1055 com o ligante por 100 ns.

Fonte: autoria própria (2026)

A partir da figura 6A, é possível observar que a proteína, quando em interação com a astressina (em vermelho), ficou muito instável quando comparado com a APO (em preto), apresentando média $0,474 \pm 0,0282$ nm. Porém, sabe-se que este peptídeo interage muito bem com o CRF2R, então este resultado pode ser fruto de algumas limitações, como, por exemplo, o campo de força utilizado na dinâmica pode não ter sido o mais adequado para peptídios, ou então, os 100 ns de simulação não foram suficientes para que a ligação se estabilizasse.

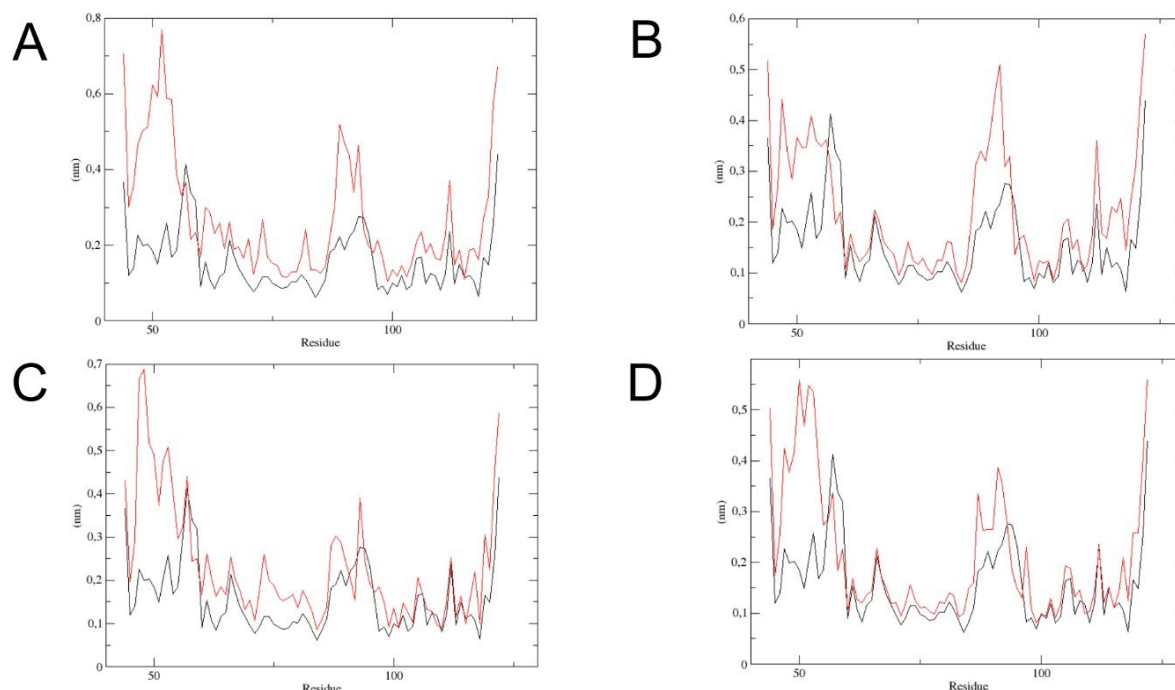
Em B e em D é possível ver (em vermelho) que as moléculas do CNS-MPO e do NuBBe (respectivamente) tiveram uma estabilidade próxima da APO (em preto em ambos), $0,472 \pm 0,0477$ nm e $0,432 \pm 0,0614$ nm respectivamente

Enquanto com a molécula do NP, em C, a proteína teve uma menor variação (em vermelho) do que quando comparado com a forma APO dela (em preto), $0,379 \pm 0,0503$ nm. Este resultado indica que o CRF2R potencialmente se torna mais estável quando ligado com a Molport-029-885-470.

4.5.2. RMSF

A partir da análise RMSF é possível analisar a flexibilidade de cada aminoácido que constitui a proteína alvo ao longo do tempo simulado, medindo as flutuações médias em torno da posição de equilíbrio, evidenciando assim, quais regiões apresentam maior mobilidade estrutural. A partir disto, pode-se identificar os resíduos que apresentam um papel crucial na estabilidade do complexo proteína-ligante (Bagewadi, 2023).

Figura 7 – Resultado comparado da análise RMSF.



Resultado comparado da análise RMSF de predição da flexibilidade do CRF2R, em nm, quando ligado às moléculas seleccionadas. em preto está a o resultado simulado da proteína em estado apo e em vermelho o resultado da interação da: (A) astressina, (B) SC-95778429, (C) Molport-029-885-470 (D) e NuBBE-1055 com o ligante por 100 ns.

Fonte: autoria própria (2026)

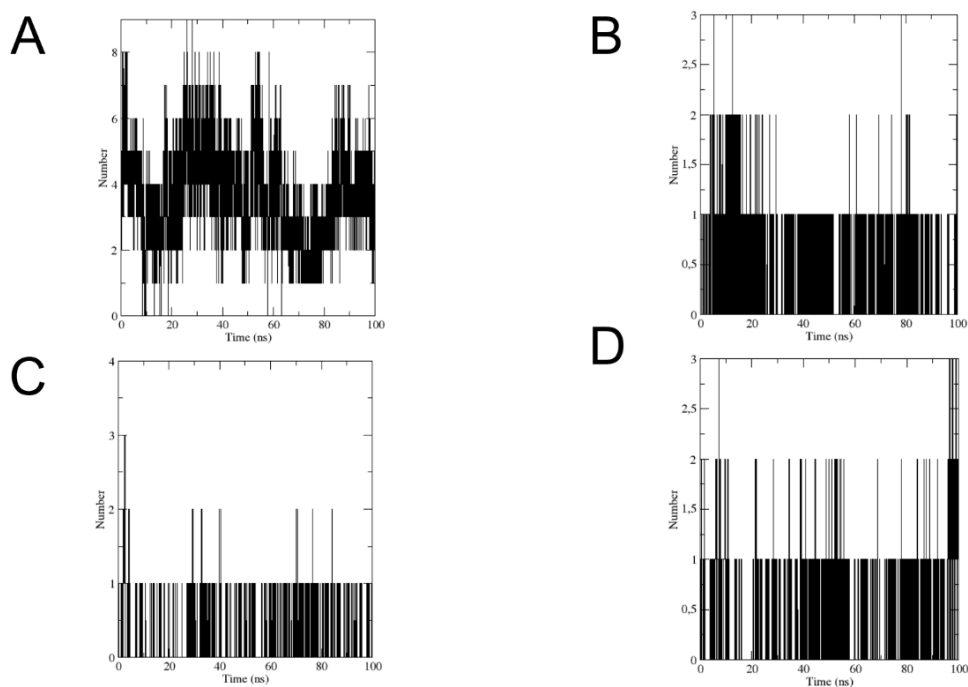
A partir dos dados obtidos, foi possível observar que a presença da astressina (em vermelho na figura 7, A) aumentou a instabilidade da proteína, quando comparado com a proteína apo (em preto), apresentando uma média de movimentação de $0,273 \pm 0,161$ e 0.157 ± 0.0807 nm respectivamente. A partir disto, em ordem decrescente de movimentação média dos resíduos da proteína, temos o Molport-029-885-470 (em C, cor vermelha) o SC-95778429 (em B, cor vermelha) e o NuBBE-1055 (em D, cor vermelha), com médias de 0.232 ± 0.135 nm, 0.222 ± 0.118 nm e 0.211 ± 0.127 nm, respectivamente. Desta forma, é possível notar que as moléculas seleccionadas, de forma geral, influenciaram estabilidade da proteína, tal qual a astressina. Este resultado pode indicar que o antagonismo está relacionado com a movimentação mais intensa de certas regiões do receptor. Porém, estudos experimentais devem ser realizados para comprovar esta afirmação.

4.5.3. Ligações de hidrogênio

As ligações de hidrogênio são muito relevantes na estabilidade da interação ligante-proteína, portanto, sua avaliação é um indicativo de uma forte ancoragem. Esta

análise quantifica a ocorrência e a estabilidade de ligações de hidrogênio ao longo do tempo, assim, moléculas que apresentam muitas ligações estáveis, provavelmente, tem melhor interação com o alvo (Arnittali; Rissanou; Harmandaris, 2019).

Figura 8 – Resultado da predição do número de ligações de hidrogênio.



Resultado da predição do número de ligações de hidrogênio formados entre a: (A) astressina, (B) SC-95778429, (C) Molport-029-885-470 e (D) NuBBE-1055 e a proteína em 100.

Fonte: autoria própria (2026)

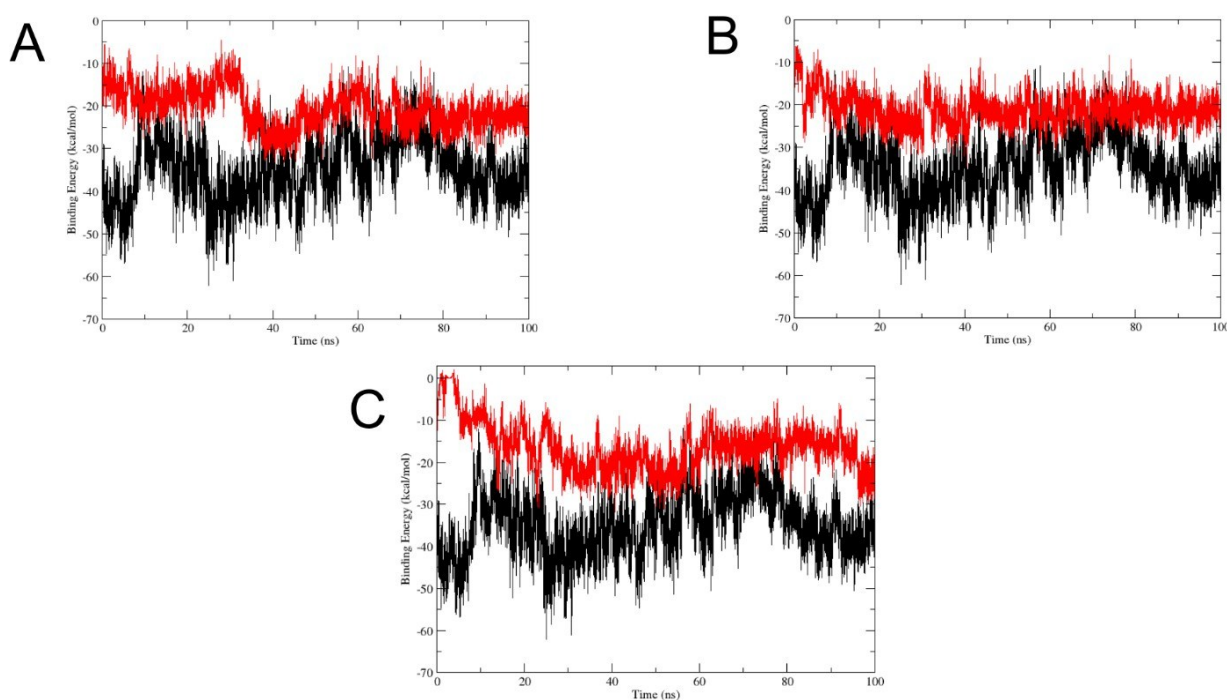
Na figura 8, possível notar que, em A, a astressina realiza uma média de 3,578 ligações de hidrogênio ao longo de toda a simulação. Isto pode ocorrer, principalmente devido ao tamanho do peptídeo e indica uma forte interação ligante-proteína, que era esperado de um antagonista conhecido e comercializado. A molécula do CNS (em B) e do NuBBE (em D) formaram uma ou zero ligações de hidrogênio ao longo de toda a simulação, com médias de 0,354 e 0,251 respectivamente, corroborando com os resultados indicados pelo modelo 2D de interação proteína-ligante predito pelo MOE (ver figura 4, A e C, respectivamente). Já a molécula do NP (em C) realizou, ao longo da simulação toda, ao menos uma ligação de hidrogênio, apresentando uma média de 0,108, estes dados não corroboram com o modelo 2D de interação feito pelo NuBBE (ver figura 4, em C), que indicam duas ligações de hidrogênio, potencialmente, porque o tempo de simulação da DM foi insuficiente.

Apesar das três moléculas realizarem poucas ligações de hidrogênio, especialmente quando comparadas à astressina, este dado isoladamente não indica uma incapacidade de interação delas com o CRF2R, pois a estabilização do complexo proteína-ligante pode, também, se dar por outros tipos de interações, como a de Van Der Waals, a eletrostática e hidrofóbicas.

4.5.4. Energia de ligação

A análise da energia de ligação foi realizada através do método MMPBSA (*Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area*) em que é feito um cálculo das interações eletrostáticas e de van der Waals, a energia de solvatação polar e apolar, estimando assim, a força de interação entre o receptor e o composto ao longo do tempo da DM. O resultado pode ser observado em um gráfico de energia por tempo, em que quanto menor a energia de ligação e a flutuação dos resultados, melhor a ligação entre a molécula e a proteína alvo (Genheden; Ryde, 2015).

Figura 9 – Resultados comparados da análise de energia de ligação.



Resultados comparados da análise de energia de ligação, em Kcal/mol por 100 ns, predita da interação das moléculas selecionadas com o CRF2R. Em preto está o resultado simulado da ligação da astressina e em vermelho das moléculas selecionadas: (A) SC-95778429, (B) Molport-029-885-470 e (C) NuBBE-1055 com o ligante.

Fonte: autoria própria.

Nestes resultados, é possível notar que a astressina apresentou o valor mais baixo (figura 9, em preto em A, B e C), com média de $-34,990 \pm 7,443$ Kcal/mol, quando comparado com as três moléculas analisadas, o que pode ser explicado pelo tamanho do peptídeo, que gera um maior número de possíveis interações com a proteína. A partir disto, quando comparada com o antagonista original, o composto que apresentou o pior resultado foi o do NuBBE (em vermelho, na figura 8C), com média de $-16,4661 \pm 5,797$ Kcal/mol, enquanto a do CNS-MPO e do NP se mostraram mais estáveis, com médias de $-20,569 \pm 4,595$ Kcal/mol e $-21,140 \pm 3,656$ Kcal/mol, respectivamente. Estes resultados sugerem que os compostos possuem uma afinidade semelhante ao peptídeo, mas a Molport-029-885-470 potencialmente tem uma melhor interação com ele.

4.6. PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

As predições das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das três moléculas foram realizadas por meio da plataforma pkCSM. Foram avaliados os seguintes parâmetros: capacidade de atravessar a BHE, solubilidade em água, hepatotoxicidade, toxicidade aguda em ratos, dose máxima tolerada em humanos, potencial de inibição dos canais hERGs e toxicidade AMES.

Essas variáveis são determinantes no processo de desenvolvimento de fármacos, uma vez que, após a identificação de uma molécula com potencial afinidade pelo alvo, inicia-se a etapa de otimização estrutural. Essa fase envolve a avaliação farmacológica e toxicológica do composto, podendo demandar modificações químicas com o objetivo de aprimorar seu perfil de eficácia, segurança e propriedades farmacocinéticas (Rang *et al.*, 2016, p. 166).

Tabela 3. Resultado da predição farmacocinética e toxicológica.

	Solubilidade em água (log/L)	Permeabilidade da BHE (Log BB)	Hepatotoxicidade	Toxicidade oral aguda em ratos (DL50) (Mol/kg)	Dose máxima tolerada em humanos (log mg/kg/dia)	Inibidor de hERG I	Inibidor de hERG II	Toxicidade de AMES
Molport-029-885-470	-3.493	-1,642	Sim	3,067	0,394	Não	Sim	Não
SC-95778429	-3.983	-0,786	Sim	2,559	-0,155	Não	Sim	Não
NuBBE-1055	-5.109	-0,784	Sim	3,375	-0,659	Não	Não	Não

Fonte: autoria própria (2026).

A solubilidade em água (logS) é dada pelo logaritmo da sua concentração molar e representa a solubilidade da molécula em água a 25° C (Pires; Blundell; Ascher, 2015). As moléculas do NP e do CNS-MPO apresentaram valores muito semelhantes de solubilidade em água (-3.493 e -3.983 log/L, respectivamente), enquanto a NuBBE-

1055 apresentou um valor menor de solubilidade (-5,109 log/L).

Cheng e Merz (2003), estimaram, *in silico*, a solubilidade de 809 compostos, tanto moléculas *drug-likes* quanto pequenas moléculas orgânicas e, a partir disto, criaram um ranking que correlaciona a solubilidade com a possibilidade da molécula ter efeito *drug-like* (em que um valor menor que -8 log/L indica alta insolubilidade, entre -2 e 0 log/L uma solubilidade ótima e maior que 0 log/L muito solúvel para uma potencial atividade *drug-like*). Com base neste trabalho, tanto as moléculas Molport-029-885-470 e SC-95778429 demonstraram uma boa capacidade *drug-like*, por terem uma solubilidade aceitável, enquanto a NuBBE-1055 possui uma baixa possibilidade de ter efeito *drug-like*.

A permeabilidade da molécula a BHE é medida *in vivo* como logBB, sendo a razão logarítmica da concentração da droga no cérebro pela concentração da droga no plasma, predizendo assim, a capacidade de moléculas atravessarem a BHE. Se logBB for maior que 0,3, a molécula atravessa facilmente a barreira, mas, se menor que -1, há pouca capacidade de atravessar (Pires; Blundell; Ascher, 2015). A partir destes dados, foi previsto que a molécula que pior atravessa a BHE é a do NP (Log BB = - 1,642). Já a do CNS-MPO e NuBBE, apresentaram uma capacidade mediana de atravessar a barreira (Log BB = -0,786 e -0,784 respectivamente), dados que não são ótimos para possíveis fármacos com um alvo encefálico.

A predição de hepatotoxicidade é baseada no efeito colateral, em humanos, associado ao fígado de 531 compostos, assim, o composto é classificado como hepatotóxico se possui ao menos um efeito de disfunção da função do fígado (Pires; Blundell; Ascher, 2015). Foi predito que todas as moléculas possuem potencial hepatotóxico.

A DL50 corresponde a dose mínima que causa a morte de metade dos animais de um grupo, desta forma, a DL50 de ratos, dado por mol/kg é uma medida importante para a toxicidade dos compostos (Pires; Blundell; Ascher, 2015). As três moléculas apresentaram DL50s semelhantes, porém, a SC-95778429 foi indicada como sendo “mais letal”, enquanto a NuBBE-1055 a “mais segura”. A título de comparação, a sertralina, um antidepressivo amplamente utilizado e comercializado para o tratamento da ansiedade, possui uma DL50 em ratos de, aproximadamente, 5,195 mol/kg (Pfizer Inc., 2016; Rang *et al.*, 2016, p. 125)

A Dose máxima tolerada em humanos (log(mg/kg/dia)) estima o limiar tóxico de substâncias para seu efeito nocivo no organismo, para isto, é considerada baixa

se menor ou igual à 0,477 log(mg/kg/dia) e alta se maior que este valor (Pires; Blundell; Ascher, 2015). Foi predito que todas as moléculas apresentaram uma dose máxima tolerada em humanos considerada baixa, sendo este um resultado bastante positivo.

O gene hERG codifica os canais de potássio hERG I e hERG II cuja inibição está associada a arritmias fatais, desta forma, se positivo, possivelmente a substância possui a capacidade de inibir o respectivo canal (Pires; Blundell; Ascher, 2015). De acordo com as predições obtidas, observou-se potencial de inibição do hERG II para as moléculas provenientes dos bancos NP e CNS-MPO, resultado este, que não ideal.

A toxicidade AMES estima o potencial mutagênico de compostos, se positivo, a molécula potencialmente possui um efeito carcinogênico, enquanto se negativo, indica segurança do composto neste quesito (Pires; Blundell; Ascher, 2015). As predições realizadas indicaram que nenhuma das moléculas apresentou potencial mutagênico.

A partir destes dados preditos nota-se que a molécula Molport-029-885-470 apesar de apresentar uma boa solubilidade, ter uma dose máxima tóxica em humanos considerada baixa, não ser mutagênico e não inibir a hERG I, possui a pior permeabilidade da BHE, fator crucial para um possível fármaco com atuação no SNC, inibe a hERG II, apresenta hepatotoxicidade e uma DL50 em ratos mediana. A NuBBE-1055 apesar de possuir uma dose tóxica máxima em humanos baixa, não inibir nenhum hERG e não ser mutagênica, possui a pior solubilidade, uma permeabilidade da BHE e uma DL50 em ratos média. Já a SC-95778429, apesar de apresentar a menor dose máxima em humanos, não inibir hERG I, não ser mutagênico e ter uma boa solubilidade, possui uma permeabilidade da BHE baixa, apresenta hepatotoxicidade, inibição de hERG II e uma maior LD 50 em ratos.

Com base nestas comparações, potencialmente a SC-95778429 possui as características farmacocinéticas mais adequadas quando comparada com as outras duas, apesar disso, ela ainda possui pontos críticos que, potencialmente, podem inviabilizar sua utilização farmacológica (como a hepatotoxicidade e a inibição de hERG II, por exemplo). Entretanto, é possível realizar uma série de estratégias para melhor manejar estas moléculas, como aumentar sua biodisponibilidade, adequar suas solubilidade, reduzir sua toxicidade etc. Dentro destas, está, por exemplo, a utilização de nanoencapsulamento e o transporte e adsorção mediado por receptor, que podem melhorar o desempenho farmacocinético de fármacos. Estas técnicas já são utilizadas em drogas que possuem capacidades farmacocinéticas limitadas, mas uma ótima atividade farmacodinâmica (LIU *et al.*, 2024).

5. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho, observa-se que as três moléculas selecionadas apresentaram comportamentos semelhantes em todos os parâmetros analisados, sugerindo uma potencial capacidade de antagonizarem o CRF2R, embora não apresentem um perfil farmacocinético ideal. Entre os compostos avaliados, destacou-se a Molport-029-885-470, que apresentou um maior potencial de interação com o alvo. A partir das medições fornecidas pela DM, foi predito que na interação do composto com o CRF2R, existe um maior equilíbrio (indicado pela análise RMSD), uma maior movimentação dos aminoácidos da proteína (indicado pela análise RMSF), uma menor energia de ligação e é a única que não tem potencial de inibição de nenhum hERG. Porém, as predições farmacocinéticas indicaram que a molécula do NP possui a pior capacidade de atravessar a BHE, o potencial de inibir hERG II e apresenta hepatotoxicidade. Portanto, se torna importante a realização de posteriores trabalhos para melhor predizer as características químicas destas moléculas, como DMs de maior duração e, posteriormente, a realização de análises *in vitro* e *in vivo*, a fim de elucidar a atividade destes compostos no organismo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Mark James et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, v. 1, p. 19-25, 2015.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5. ed. Boston: Pearson, 2013.

AMINPOUR, M.; MONTEMAGNO, C.; TUSZYNSKI, J. A. An Overview of Molecular Modeling for Drug Discovery with Specific Illustrative Examples of Applications. *Molecules*, v. 24, n. 9, 30 abr. 2019.

ARNITTALI, Maria; RISSANOU, Anastassia N.; HARMANDARIS, Vagelis. Structure of biomolecules through molecular dynamics simulations. *Procedia Computer Science*, v. 156, p. 69-78, 2019.

BAGEWADI, Zabin *et al.* Molecular Dynamics and Simulation Analysis against Superoxide Dismutase (SOD) Target of *Micrococcus luteus* with Secondary Metabolites from *Bacillus licheniformis* Recognized by Genome Mining Approach. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 30, 2023.

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

BROGI. Computational Approaches for Drug Discovery. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3061, 22 ago. 2019.

BROOKS, B. R. *et al.* CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 10, p. 1545-614, 2009.

CAPORUSCIO, F.; TAFI, A. Pharmacophore Modelling: A Forty Year Old Approach and its Modern Synergies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 17, p. 2543–2553, 1 jun. 2011.

CHEMBRIDGE CORPORATION. **Targeted and Specialty Libraries: CNS**. San Diego: ChemBridge, [2026]. Disponível em: <https://chembridge.com/targeted-and-specialty-libraries/cns/>. Acesso em: 9 ago. 2026.

CHEMICAL COMPUTING GROUP ULC. **Molecular Operating Environment**. 2024.0601. Montreal, Canadá. Disponível em: <https://www.chemcomp.com/en/Products.htm>. Acesso em: 28 fev. 2026.

CHENG, A.; MERZ, K. M. Prediction of Aqueous Solubility of a Diverse Set of Compounds Using Quantitative Structure–Property Relationships. v. 46, n. 17, p. 3572–3580, 23 jul. 2003.

CROCQ, M.-A. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 319–25, 2015.

DOMIN, H.; ŚMIAŁOWSKA, M. The diverse role of corticotropin-releasing factor (CRF) and its CRF1 and CRF2 receptors under pathophysiological conditions: Insights into stress/anxiety, depression, and brain injury processes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 163, p. 105748–105748, 1 ago. 2024.

FARAVELLI, C. *et al.* The Role of Life Events and HPA Axis in Anxiety Disorders: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 35, p. 5663–5674, 8 out. 2012.

GENHEDEN, Samuel; RYDE, Ulf. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert opinion on drug discovery*, v. 10, n. 5, p. 449-461, 2015.

GILLIGAN, P. J.; ROBERTSON, D. W.; ZACZEK, R. Corticotropin Releasing Factor

(CRF) Receptor Modulators: Progress and Opportunities for New Therapeutic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1641–1660, maio 2000.

GRACE, C. R. et al. Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 12, p. 4858–4863, 20 mar. 2007.

HAUGER, R. et al. Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor Signaling in the Central Nervous System: New Molecular Targets. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 5, n. 4, p. 453–479, 1 ago. 2006.

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129–1143, 2018.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY CHEMISTRY AND HUMAN HEALTH DIVISION MEDICINAL CHEMISTRY SECTION GLOSSARY OF TERMS USED IN MEDICINAL CHEMISTRY (IUPAC Recommendations 1998).

Disponível em: <<https://publications.iupac.org/pac/1998/pdf/7005x1129.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2026.

LENT, R. **Cem bilhoes de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo (Sp): Atheneu, 2010.

LIAPAKIS, G. et al. Members of CRF Family and their Receptors: From Past to Future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 17, p. 2583–2600, 1 jun. 2011.

LIU, Y. *et al.* Advances in Nanotechnology for Enhancing the Solubility and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs. **Drug design, development and therapy**, v. Volume 18, p. 1469–1495, 1 maio 2024.

MOLPORT. **Natural Product and NP-Like Compound Library**. Riga, [2026]. Disponível em: <https://www.molport.com/shop/natural-compound-database>. Acesso em: 28 fev. 2026.

MORENO-PERAL, P. et al. Risk factors for the onset of panic and generalised anxiety disorders in the general adult population: A systematic review of cohort studies. **Journal of Affective Disorders**, v. 168, p. 337–348, out. 2014.

NECHITA, D.; NECHITA, F.; MOTORGA, R. A review of the influence the anxiety exerts on human life. **Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie**, v. 59, n. 4, p. 1045–1051, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World mental health report: Transforming mental health for all**, 2022. Disponível em:

<https://www.who.int/publications/i/item/9789240049338>. Acesso em 8 out. 25.

PFIZER Inc. *Material Safety Data Sheet: Sertraline hydrochloride film coated tablets*. Version 6.2, revision date 02 Jun. 2016. Pfizer Global Environment, Health, and Safety Operations. 2016. Disponível em: https://cdn.pfizer.com/pfizercom/products/material_safety_data/Sertraline_hydrochloride_film_coated_tablets_2-Jun-2016.pdf. Acesso em: 28 fev. 2026

PILON, A. C. et al. **NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity**. *Scientific Reports*, 7, 7215, 2017.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 22 abr. 2015.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids: Mechanisms of action in health and disease. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 42, n. 1, p. 15–31, fev. 2016.

RANA, T. et al. Exploring the role of neuropeptides in depression and anxiety. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 114, p. 110478, 2 mar. 2022.

RANG, H *et al.* **Rang & Dale: Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2016. 125 p. ISBN 978-85-352-8343-3.

CONGRESSIONAL BUDGET OFFICE. Research and development in the pharmaceutical industry. Washington, DC: Congressional Budget Office, abr. 2021. Disponível em: https://www.cbo.gov/publication/57126#_idTextAnchor036. Acesso em: 8 out. 2025.

REUL, J. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 23–33, 1 fev. 2002.

RIVIER, J. E.; RIVIER, C. L. Corticotropin-releasing factor peptide antagonists: Design, characterization and potential clinical relevance. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 161–170, abr. 2014.

SADYBEKOV, A. V.; KATRITCH, V. Computational approaches streamlining drug discovery. **Nature**, v. 616, n. 7958, p. 673–685, 1 abr. 2023.

SARGSYAN, Karen; GRAUFFEL, Cédric; LIM, Carmay. How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*, v. 13, n. 4, p. 1518-1524, 2017.

SPINA, M. et al. Behavioral Effects of Central Administration of The Novel CRF Antagonist Astressin in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 230–239, mar. 2000.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273–343, 2021.

V.; CUENDET, M. A.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 32(11), 2359–2368, 2011.

VALDÉS-TRESANCO, M. S. et al. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 29 set. 2021.

VALE, W. et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 213, n. 4514, p. 1394–1397, 18 set. 1981.

VALLI, M. et al. **Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil**. *Journal of Natural Products*, 76(3), 439-444, 2013.

VASCONCELOS, M. et al. Corticotropin-releasing factor receptor signaling and modulation: implications for stress response and resilience. **Trends in Psychiatry and Psychotherapy**, v. 42, n. 2, p. 195–206, 1 jun. 2020.

ZIMMERMANN, M. et al. Modifiable risk and protective factors for anxiety disorders among adults: A systematic review. **Psychiatry Research**, v. 285, n. 1, p. 112705, 1 mar. 2020.