

DOCKING MOLECULAR E TOXICOLOGIA IN SILICO DE NOVAS SÉRIES DE CANDIDATOS A INIBIDORES DA ENZIMA FAAH1

Molecular docking and silicon toxicology of new series of candidates to enzyme faah1 inhibitors

Valter Luiz da Conceição Gonçalves¹, Andrielle M. Domard², Hugo A. Oliveira², Rodrigo S. Bitzer¹

¹Docente do Curso de Graduação em Farmácia do UNIFESO – Teresópolis – RJ – BR, ²Discente do Curso de Graduação em Farmácia do UNIFESO – Teresópolis – RJ – BR

Resumo

Neste novo estudo, os resultados de docking molecular mostram que as novas séries (2, 3 e 4) de inibidores da enzima FAA1 apresentam energias de ligação global na ordem de 5.5 – 10.2 (Kcal/mol). O risco toxicológico é baixo e os valores das propriedades físico-químicas como drug-likeness e drug-score qualificam as séries a candidatos a ensaios in vitro e in vivo.

Palavras Chave: Endocanabinóide, Inibidores da FAAH1, Otimização Estrutural.

Abstract

This new study molecular docking results showed that at (2, 3 and 4) sets of inhibition of FAAH enzyme have overall binding energy in the range of 5.5 – 10.2 (kcal/mol). The toxicological risk is low and the values of the physicochemical properties as drug-likeness and drug-score qualify the series candidates for in vitro assays and in vivo.

Keywords: Endocannabinoid, FAAH1 Inhibitors, Structural Optimization.

INTRODUÇÃO

O sistema de sinalização endocanabinoide (eCB) compreende receptores metabotrópicos (CB1, CB2 e, possivelmente, GPR3, GPR6, GPR12, GPR18, GPR23, GPR55, GPR84, GPR119 e GPR120), o receptor ionotrópico não-seletivo TRPV1 (canal de cátions), ligantes endógenos de natureza lipídica, como anandamida (AN) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), proteínas transportadoras, além de enzimas que respondem pela síntese (por exemplo: diacilglicerol lipase), recaptação e degradação (por exemplo: monoacilglicerol lipase e hidrolase de amidas de ácidos graxos 1) dos ligantes endógenos (FREUND, KATONA & PIOMELLI, 2003; HOWLETT et al., 2002; PERTWEE et al., 2010).

Desde a sua caracterização molecular na década de 1990, o sistema eCB tem sido considerado alvo terapêutico para muitas patologias, à medida que participa da mediação de vários processos fisiológicos, incluindo

cognição, percepção de dor, inflamação, fome e saciedade, entre outros (PERTWEE, 2014). Também, o sistema eCB está implicado em uma miríade de processos fisiopatológicos de relevância clínica e epidemiológica que sustentam as doenças de Alzheimer e Parkinson, depressão, ansiedade, neuroinflamação, dor neuropática e obesidade (AGARWAL et al., 2007; DODD et al., 2010; NOONAN et al., 2010; SAITO, WOTJAK & MOREIRA, 2010; PERTWEE, 2001). Além disso, há evidências experimentais de que o sistema eCB desempenha um papel de destaque nos mecanismos de autoproteção contra doenças neurodegenerativas, excitotoxicidade, estresse oxidativo, neuroinflamação, isquemia cerebral e lesão cerebral traumática (NOONAN et al., 2010; SHOHAMI et al., 2011). Indubitavelmente, os receptores canabinóides CB1 e CB2 consistem em alvos farmacológicos poderosíssimos para o tratamento de todas aquelas injúrias. Todavia, uma limitação à utilização de agonistas de CB1 e CB2 como agentes potencializadores da

sinalização eCB reside no seu elenco de efeitos colaterais indesejáveis, tais como: adição, amnésia, disforia, sedação, tontura e prejuízos na coordenação motora (efeitos extrapiramidais), (CRAWLEY et al., 1993; SAITO, WOTJAK & MOREIRA, 2010).

Diversos estudos têm revelado que um aumento nas concentrações dos endocanabinoides endógenos (AN e 2-AG) melhoram a eficácia da resposta dos receptores canabinóides frente a uma série de distúrbios, incluindo ansiedade, depressão, esclerose múltipla, certos tipos de dor, inflamação, câncer, esquizofrenia, transtornos de estresse pós-traumático, algumas doenças intestinais e cardiovasculares, entre outros (SAITO, WOTJAK & MOREIRA, 2010). Este tipo de abordagem na modulação e potencialização do sistema eCB pode reduzir a gravidade dos sintomas ou retardar a progressão dessas doenças (PERTWEE, 2014). Com efeito, estudos experimentais e ensaios clínicos recentes têm explorado os efeitos desejáveis da ativação dos receptores CB, evitando os efeitos negativos da sua estimulação global por ação direta de agonistas, através da manipulação da concentração de seus ligantes endógenos, sobretudo AN, via inibição competitiva da enzima hidrolase de amidas de ácidos graxos 1 (FAAH1; EC 3.5.1.99).

Neste novo estudo, propomos o planejamento e o desenho de três novas séries de inibidores da enzima FAAH1 para investigar

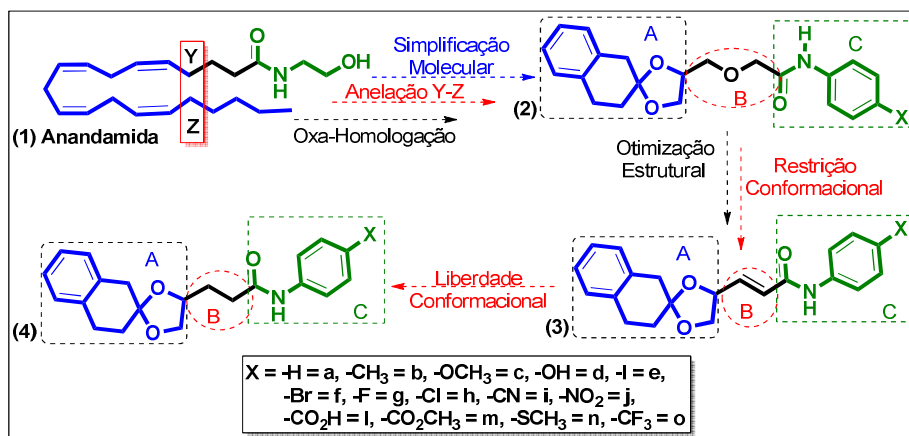
a novidade estrutural, avaliar as propriedades físico-químicas e toxicológicas e realizar docking molecular.

METODOLOGIA

Planejamento e Desenho Estrutural das Novas Séries de Inibidores da FAAH1

A partir da modificação molecular do padrão estrutural (1) ligante endógeno (AN), visamos o planejamento e o desenho de três novas séries de inibidores da enzima FAAH1, conforme o esquema 1. A nova série (2a-o) desenhada a partir do padrão estrutural (1), visa estudar a influência de mudanças na natureza da região B (em vermelho) e C (em verde) de (1). Neste sentido, foram utilizadas as estratégias de simplificação molecular, anelação da região Y-Z e Oxa-homologação. Já para a obtenção da nova série (3a-o), a partir da série (2a-o) foi utilizada a estratégia de restrição conformacional da região B. E por último, a série (4a-o) foi obtida utilizando como estratégia de nova modificação na região B, aumentando a liberdade conformacional. Em todas as três séries, a região A contendo núcleo spiro-benzílico por simplificação molecular foi mantida e a região C teve a cadeia alifática alterada para uma estrutura aromática com a possibilidade de explorar os efeitos eletrônicos de 14 substituintes.

Esquema 1. Gênese do padrão estrutural das séries (2-4) desenhados como inibidores da enzima FAAH a partir do ligante endógeno anandamida (1).



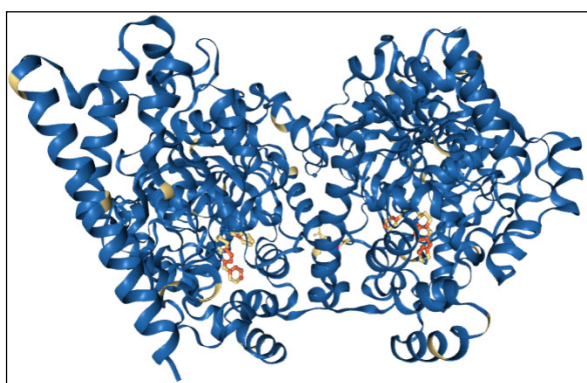
Predição de Propriedades Físico-Químicas e de Risco Toxicológico In Silico e Novidade Estrutural

As estruturas químicas das séries (2, 3 e 4a-o) candidatas a inibidores da enzima FAAH1 sofreram avaliação na base OSIRIS Property Explorer e Chemicalize que foram utilizadas para estimar o risco de efeitos tóxicos, tais como: tumorigênico, mutagênico, irritante e de efeitos reprodutivos, assim como para propriedades físico-químicas relevantes para fármacos, tais como: druglikeness (fármaco-similar/semelhança), drug-score. A estratégia metodológica seguiu pela busca em bases de dados virtuais como PubChem e Swiss Target Prediction, para obtenção de informações de novidade estrutural (ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2016).

Estudos de Docking Molecular

A partir da base de dados de estruturas Protein Data Bank, foi realizado o download do arquivo no formato pdb da estrutura cristalina obtida da enzima FAAH1 com identificador (ID 3OJ8), cuja sequência de aminoácidos corresponde ao fragmento 30-579 na estrutura, conforme observado na figura 1.

Figura 1. Estrutura da Enzima FAA1 contendo as cadeias A e B e o ligante co-cristalizado OJ8



A estrutura da enzima foi manipulada utilizando o software AutoDock Tools, empregado para preparação dos arquivos de entrada para a enzima no formato pdbqt. Antes do docking, a cadeia B e as moléculas de águas foram manualmente removidas da estrutura da enzima 3OJ8, assim como os ligantes co-cristalizados e adicionados átomos de

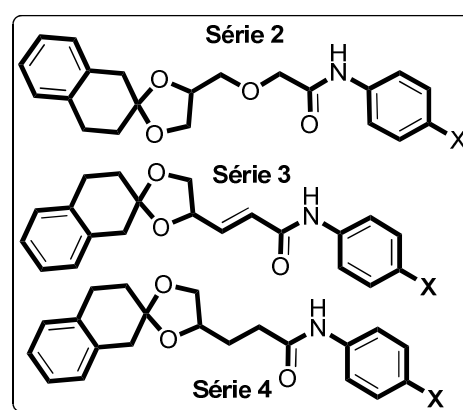
hidrogênio polares e cargas de Kollman, além do ajuste de carga nos aminoácidos da estrutura da cadeia A. A localização nativa do inibidor (OJ8) co-cristalizado na estrutura da enzima 3OJ8 foi utilizada como referência para orientar o docking (MORRIS et al., 2009).

O programa Avogadro foi utilizado para o desenho das estruturas das séries (2, 3 e 4a-o) no formato mol2 utilizado na etapa de docking. O programa Pymol 1.7 com o plugin para executar o software AutoDock Vina foi utilizado para implementar a operação de docking molecular entre a estrutura tridimensional experimental de 3OJ8A modificada e os ligantes das séries (2, 3 e 4a-o) para explorar os potenciais modos de ligação do complexo ligante - enzima (TROTT e OLSON, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas estruturas da série (2a-o) Oxa-homologada, da série (3a-o) insaturada e da série (4a-o) saturada, conforme quadro 1, utilizando o software ChemBioDraw Ultra 12.0., que permitiu o desenho em 2D.

Quadro 1 – Estrutura em 2D das séries (2, 3 e 4a-o), obtidas pelo software ChemBioDraw Ultra 12.0



As estruturas das séries (2, 3 e 4) foram submetidas ao PubChem, Swiss Target Prediction para busca de depósito nessas bases, os resultados foram negativos, o que indica a manutenção da novidade no padrão estrutural das novas séries. Na sequência, as estruturas das séries (2, 3 e 4) foram submetidas aos programas ChemBioDraw Ultra 12.0 e Chemicalize para obtenção de propriedades físico-químicas, que são importantes para

avaliação do docking molecular. Os dados obtidos para avaliação da “Regra dos Cinco”, de todos os compostos pertencentes às séries (2, 3 e 4) apresentaram valores de características físico-químicas que são utilizadas para avaliação da biodisponibilidade oral (LIPINSKI, 2004).

As estruturas das séries (2, 3 e 4) foram submetidas ao ensaio de avaliação dos riscos toxicológicos por meio da base de dados OSIRIS Property Explorer que realiza uma predição através da procura de potenciais riscos de toxicidade. Nas tabelas 1, 2 e 3 são apresentados os resultados das três séries.

Tabela 1 – Avaliação de Riscos Toxicológicos e Propriedades Físico-Químicas para a série (2a-o) oxa-homologada.

Sigla	X	Risco Toxicológico				Propriedades Físico-Químicas	
		Mutagenic	Tumorigenic	Irritant	Reproductive Effective	Druglikeness	Drug-Score
2a	(-H)	(-)	(-)	(-)	(-)	-2.17	0.44
2b	(-CH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-1.81	0.43
2c	(-OCH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-1.52	0.46
2d	(-OH)	(-)	(-)	(-)	(-)	-0.12	0.6
2e	(-I)	(-)	(-)	(-)	(-)	-0.12	0.43
2f	(-Br)	(-)	(+)	(-)	(-)	-2.37	0.21
2g	(-F)	(-)	(-)	(-)	(-)	-1.64	0.44
2h	(-Cl)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.47	0.55
2i	(-CN)	(-)	(-)	(-)	(-)	-7.09	0.36
2j	(-NO ₂)	(-)	(-)	(-)	(-)	-15.74	0.37
2l	(-CO ₂ H)	(-)	(-)	(-)	(-)	-1.03	0.49
2m	(-CO ₂ CH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-4.01	0.38
2n	(-SCH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-0.13	0.49
2o	(-CF ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-8.94	0.32

Legenda: previsão de baixo risco quando negativo (-), médio risco quando positivo (+) e alto risco quando (++). Druglikeness faixa de (-13 a 7) e Drug-score (0 a 1).

Como pode ser observado nas tabelas 1, 2 e 3, em relação aos possíveis efeitos toxicológicos entre os 42 derivados ensaiados apenas os que possuem o substituinte X = Br na estrutura apresentaram uma única indicação de risco positivo (médio), com potencial tumorigênico, não significando que a estrutura vá efetivamente apresentar este risco, para tanto seriam necessários testes *in vitro*. Os demais derivados das três séries somando um total de 39 estruturas apresentaram uma previsão de baixo risco em todos quesitos avaliados (mutagênico, tumororênico, irritante e toxicidade para reprodução). A avaliação de

risco de toxicidade é uma indicação de que a estrutura desenhada pode ser prejudicial a categoria de risco relativo especificado.

Para avaliar a confiabilidade da predição de toxicidade, o software utiliza um conjunto de compostos tóxicos e um conjunto de compostos presumivelmente não tóxicos através da predição. O processo de predição depende de um conjunto de fragmentos estruturais pré-computados na base de dados que dão origem a alertas de toxicidade no caso de serem encontrados na estrutura submetida ao programa (RAIES & BAJIC, 2016).

Tabela 2 – Avaliação de Riscos Toxicológicos e Propriedades Físico-Químicas para a série (3a-o) insaturada.

Sigla	X	Risco Toxicológico				Propriedades Físico-Químicas	
		Mutagenic	Tumorigenic	Irritant	Reproductive Effective	Druglikeness	Drug-Score
3a	(-H)	(-)	(-)	(-)	(-)	-1.78	0.43
3b	(-CH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-1.43	0.41
3c	(-OCH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-1.15	0.45
3d	(-OH)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.25	0.61
3e	(-I)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.25	0.41
3f	(-Br)	(-)	(+)	(-)	(-)	-1.99	0.19
3g	(-F)	(-)	(-)	(-)	(-)	-1.27	0.43
3h	(-Cl)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.82	0.52
3i	(-CN)	(-)	(-)	(-)	(-)	-6.71	0.33
3j	(-NO ₂)	(-)	(-)	(-)	(-)	-15.35	0.35
3l	(-CO ₂ H)	(-)	(-)	(-)	(-)	-0.65	0.5
3m	(-CO ₂ CH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-3.64	0.36
3n	(-SCH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.25	0.47
3o	(-CF ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-8.56	0.29

Legenda: previsão de baixo risco quando negativo (-), médio risco quando positivo (+) e alto risco quando (++). Druglikeness faixa de (-13 a 7) e Drug-score (0 a 1).

Nas tabelas 1, 2 e 3, pode-se também observar os valores de drug-score, que é uma pontuação com um valor real que está entre 0 e 1, calculada como a fração de critérios físico-químicos como: cLogP, logS, peso molecular e riscos de toxicidade, que devem ser obtidos para sugerir que a

estrutura em análise possa ser um candidato a fármaco. A pontuação 1 indica que uma molécula é uma excelente candidata para ser um fármaco, ao passo que valor próximo a 0 indica que a molécula apresenta baixo potencial de ser um fármaco.

Tabela 3 – Avaliação de Riscos Toxicológicos e Propriedades Físico-Químicas para a série (4a-o) saturada.

Sigla	X	Risco Toxicológico				Propriedades Físico-Químicas	
		Mutagenic	Tumorigenic	Irritant	Reproductive Effective	Druglikeness	Drug-Score
4a	(-H)	(-)	(-)	(-)	(-)	-0.3	0.5
4b	(-CH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.33	0.55
4c	(-OCH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	1.73	0.69
4d	(-OH)	(-)	(-)	(-)	(-)	1.73	0.69
4e	(-I)	(-)	(-)	(-)	(-)	1.73	0.46
4f	(-Br)	(-)	(+)	(-)	(-)	-0.51	0.22
4g	(-F)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.22	0.51
4h	(-Cl)	(-)	(-)	(-)	(-)	2.31	0.55
4i	(-CN)	(-)	(-)	(-)	(-)	-5.23	0.31
4j	(-NO ₂)	(-)	(-)	(-)	(-)	-13.87	0.34
4l	(-CO ₂ H)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.83	0.6
4m	(-CO ₂ CH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-2.16	0.37
4n	(-SCH ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	1.73	0.52
4o	(-CF ₃)	(-)	(-)	(-)	(-)	-7.08	0.27

Legenda: previsão de baixo risco quando negativo (-), médio risco quando positivo (+) e alto risco quando (++). Druglikeness faixa de (-13 a 7) e Drug-score (0 a 1).

Os resultados de drug-score para a série (2, 3 e 4) revelaram o mesmo comportamento, 9 entre as 14 estruturas de cada série, ou seja, 64% das estruturas apresentam valores ≥ 0.4 . Pode-se observar, também, que nas três séries, as estruturas contendo os substituintes X = -Br, -CN, -NO₂, -CO₂CH₃ e -CF₃, foram as que apresentaram valores para drug-score menores do que 0.4. Estes mesmos substituintes atribuíram os menores valores as suas estruturas nas séries (2, 3 e 4) para a propriedade de druglikeness, que também é utilizada para predizer se determinada estrutura química possui semelhança estrutural com fármacos já comercializados. Nesta análise, a técnica utiliza valores de cLogP, peso molecular e descritores topológicos da estrutura de fragmentos de fármacos comerciais e de reagentes da Fluka®, que formam um banco de dados contendo mais de 20 mil estruturas, gerando um diagrama com faixa de valores de -13 a 7. Os fragmentos de cada estrutura química das séries (2, 3 e 4) foram submetidos à técnica e foram comparados com os fragmentos do banco de dados. De acordo o descritivo da técnica, as estruturas que apresentarem os valores na faixa negativa próximo a -2 passando para o lado positivo contém fragmentos predominantes que são frequentemente

encontrados em fármacos comerciais. Desta forma, os resultados apresentados para as séries (2, 3 e 4) também são bastante promissores nesta análise físico-química, tendo em vista que na série 2 (8 em 14 estruturas, ou seja, 57%) estão compreendidas na faixa desejada. Já nas séries 3 e 4 (10 em 14 estruturas, 71%) se enquadram na faixa.

Os ligantes das séries (2, 3 e 4) foram avaliados quanto a sua capacidade de ligação para formação do complexo (ligante-enzima) de forma individual nos ensaios de docking molecular, utilizando o programa AutoDock Vina. O valor de energia de ligação global para cada complexo variou entre 5.5 - 10.2 (Kcal/mol). As energias de ligação obtidas nos ensaios de docking entre o complexo (ligante - enzima) para as séries (2, 3 e 4) e o sítio ativo da enzima 3OJ8, estão na tabela 4.

O ligante co-cristalizado experimentalmente no sítio ativo da enzima FAAH, OJ8 considerado reversível, apresentou energia de ligação global de -10.2. Estes dados mostram que vários ligantes das séries (2, 3 e 4) apresentaram energias de ligação global na formação do complexo (ligante-enzima) com valores próximos ao encontrado para o ligante OJ8 co-cristalizado na enzima FAAH, indicando um modo de interação (ligante-enzima) semelhante.

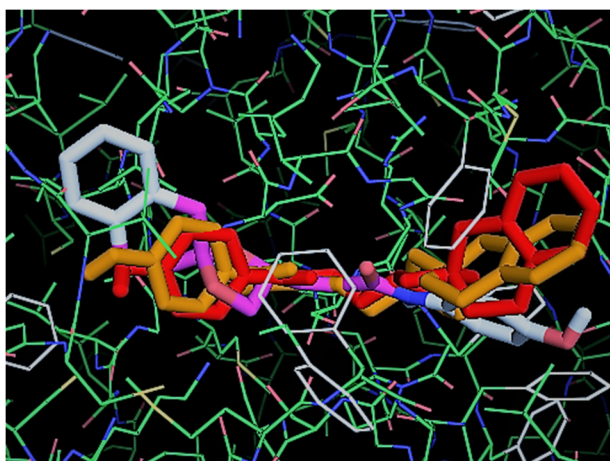
Tabela 4 – Energias de ligação obtidas por docking molecular para as séries (2, 3 e 4a-o).

Sigla	X	(Kcal/Mol*) 3OJ8	Sigla	X	(Kcal/Mol*) 3OJ8	Sigla	X	(Kcal/Mol*) 3OJ8
2a	(-H)	-8.6	3a	(-H)	-8.5	4a	(-H)	-8.8
2b	(-CH ₃)	-8.8	3b	(-CH ₃)	-9.4	4b	(-CH ₃)	-8.9
2c	(-OCH ₃)	-8.2	3c	(-OCH ₃)	-9.6	4c	(-OCH ₃)	-8.8
2d	(-OH)	-8.6	3d	(-OH)	-9.1	4d	(-OH)	-8.7
2e	(-I)	-8.0	3e	(-I)	-6.0	4e	(-I)	-8.6
2f	(-Br)	-8.1	3f	(-Br)	-9.3	4f	(-Br)	-8.7
2g	(-F)	-8.5	3g	(-F)	-9.4	4g	(-F)	-8.7
2h	(-Cl)	-8.3	3h	(-Cl)	-9.4	4h	(-Cl)	-8.7
2i	(-CN)	-9.1	3i	(-CN)	-8.9	4i	(-CN)	-8.6
2j	(-NO ₂)	-8.4	3j	(-NO ₂)	-5.5	4j	(-NO ₂)	-8.5
2l	(-CO ₂ H)	-8.3	3l	(-CO ₂ H)	-6.0	4l	(-CO ₂ H)	-9.0
2m	(-CO ₂ CH ₃)	-8.5	3m	(-CO ₂ CH ₃)	-9.9	4m	(-CO ₂ CH ₃)	-8.6
2n	(-SCH ₃)	-7.8	3n	(-SCH ₃)	-9.3	4n	(-SCH ₃)	-8.6
2o	(-CF ₃)	-8.4	3o	(-CF ₃)	-10.1	4o	(-CF ₃)	-8.5
OJ8	Ligante	-10.2	OJ8	Ligante	-10.2	OJ8	Ligante	-10.2

Legenda: Score (Kcal/Mol)* - energias de ligação global das estruturas do ligante da série 2 e o padrão de referência o ligante co-cristalizado OJ8 no sítio ativo da enzima 3OJ8.

Os resultados apresentados na tabela 4 mostram que, avaliando as energias de ligação global para o mesmo substituinte X entre as diferentes séries (2 - oxa-homologada, 3 - insaturada e 4 - saturada), a maior diferença de energia ocorre na série insaturada, que apresenta por substituinte os maiores e menores valores em kcal/mol. Um exemplo está no substituinte -OH que na série 2 e 3 apresentou valor em módulo de 8.6 e 8.7 respectivamente, e na série 4 um valor em módulo de 9.1.

Figura 2. Inibidores 2d em laranja, 3d em vermelho e 4d no sítio ativo da enzima FAAH

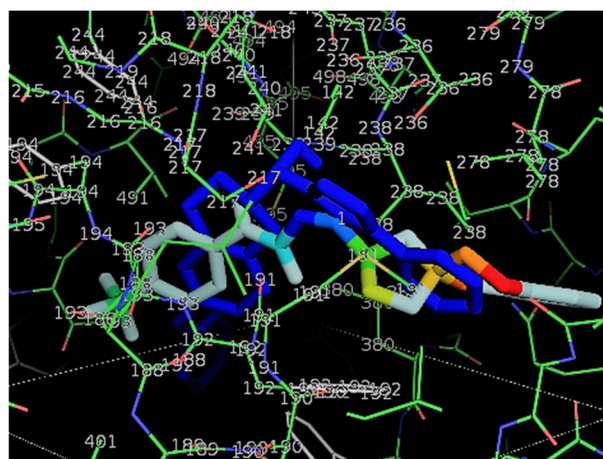


Na figura 2, pode-se observar os ligantes 2d em laranja, 3d em vermelho e 4d colorido dockados na enzima 3OJ8. A orientação das estruturas no sítio catalítico da enzima para os ligantes 2d e 4d são quase idênticas e a orientação para o ligante 3d está invertida, o que explica, em parte, a diferença de energia global de ligação, pois os resíduos de aminoácidos que estão interagindo com as estruturas são diferentes. Os resultados ainda mostram que quando o substituinte X = -I, -NO₂ e -CO₂H na série 3 os resultados de energia global são os menores que nas séries 2 e 4, no entanto, os demais substituintes apresentaram valores de energia global superiores que nas séries 2 e 4. Essa característica pode também estar relacionada à restrição conformacional que foi aplicada à estrutura na região B (espaçador), uma vez que as regiões A e C são idênticas nas três séries.

A figura 3 mostra o complexo entre o sítio ativo da enzima 3OJ8 e os inibidores OJ8 em azul e 3o (-CF₃) colorido. Observa-se as

interações entre os aminoácidos [Ser 217, Ser 241 e Lis 142] da tríade catalítica da enzima e as estruturas dos inibidores 3o e OJ8 com certa sobreposição, indicando o mesmo modo de ligação reversível, uma vez que a carbonila contida na estrutura do 3o não está muito próxima dos resíduos da enzima Ser 217, Ser 241 que realizam o ataque nucleofílico, levando à formação de um complexo irreversível.

Figura 3. Inibidores 3o colorido e OJ8 em azul no sítio ativo da enzima FAAH



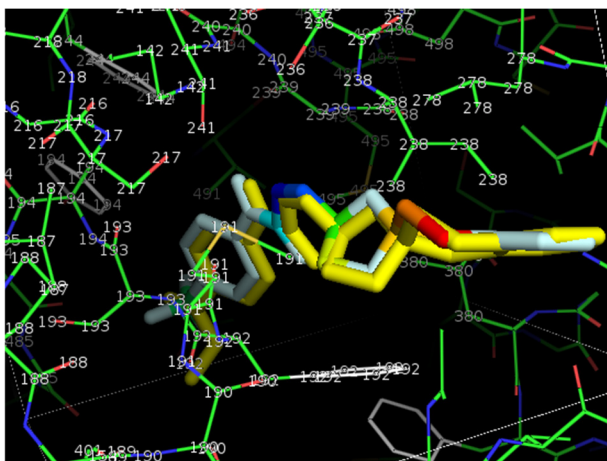
Na série 2, os valores de energia global variaram de -7.8 a -9.1 e na série 4 a variação foi de -8.5 a -9.0, gerando maior homogeneidade. Essas diferenças são oriundas do tipo de substituinte ligado ao anel aromático, exercendo efeitos eletrônicos e estéricos. Segundo Tavares (2004), uma quantidade expressiva de trabalhos tem mostrado que os efeitos eletrônicos exercidos por grupos substituintes desenvolvem a atividade biológica de fármacos.

Neste sentido, a retirada do átomo de (-O-) das estruturas químicas da série 2 para gerar a série 3 restringe a liberdade conformacional da região B com a criação (-C=C). Essa estratégia de restrição conformacional levou a série 3 a apresentar os maiores valores de energia global entre as séries, quando os substituintes foram X = -CH₃, -OCH₃, -F, -Cl, -CO₂CH₃ e -CF₃ as energias globais variaram de -9.4 a -10.1 kcal/mol. Ao observar a estrutura química do ligante co-cristalizado OJ8 que realiza interação com a enzima de forma reversível, observa-se, também, que sua estrutura possui restrição conformacional por possuir apenas

seis ângulos de torção, deixando a estrutura mais fixa para realização do docking molecular.

Observando o modo de ligação dos dois ligantes da série 3 que apresentaram as maiores energias de ligação global (3m e 3o), observa-se total sobreposição, figura 4.

Figura 4. Inibidores 3o colorido e 3m em amarelo no sítio ativo da enzima FAAH



No estudo realizado por Carlson et al., (2009), os autores criaram uma forma de medir baixa e alta afinidade através de uma modelo entre ligante – enzima definindo que: quando a variação de energia de ligação é $[\Delta G_{bind} > -9 \text{ kcal/mol}]$ temos baixa afinidade com concentrações do ligante na ordem de $>250 \text{ nM}$, e que quando a variação de energia de ligação é $[\Delta G_{bind} \leq -9 \text{ kcal/mol}]$ temos alta afinidade com concentrações do ligante na ordem de $\leq 250 \text{ nM}$. Partindo deste modelo, espera-se que nos ensaios in vitro e in vivo as séries 2 e 4 realizem a inibição com valores $>250 \text{ nM}$, enquanto a série 3 com valores de $\leq 250 \text{ nM}$, apresentando alta afinidade.

Os resultados de docking molecular indicam que as séries (2, 3 e 4) apresentam padrão estrutural com características que permitem a interação com o sítio de ligação e ativo da enzima FAAH que são constituídos pelos aminoácidos (Metionina 191 e Serina 217) e (Lisina 142, Serina 217 e Serina 241), respectivamente.

CONCLUSÃO

Os dados da predição de risco de toxicidade para as séries 2 e 3 mostraram risco baixo. Apenas dois ligantes apresentaram risco

relativo em apenas uma medida. Já as análises de propriedades físico-químicas como drug-likeness e drug-score e as relacionadas a Regra do Cinco estimadas para as séries 2 e 3 satisfazem aos parâmetros farmacocinéticos e qualificam o padrão estrutural das séries para ensaios in vitro e in vivo.

A ausência de resultados obtidos nas bases de busca de estruturas químicas depositadas corrobora para o ineditismo do padrão estrutural contido nas séries 2, 3 e 4. As propriedades físico-químicas atribuíveis a regra de Lipinsk que satisfazem a regra dos cinco, a predição de riscos toxicológicos além do drug-score e druglikeness indicam que as séries 2, 3 e 4 apresentam atributos e características encontrados em fármacos comerciais, indicando que o padrão estrutural seja promissor para ser explorado em ensaios in vivo e in vitro.

Os resultados do docking molecular confirmaram a formação dos complexos (enzima – ligante) entre as estruturas químicas das séries (2, 3 e 4) e a estrutura da enzima FAAH (3OJ8), indicando uma forma de ligação reversível na região do sítio ativo da enzima. As energias de ligação global dos ligantes da série 3 apresentaram valores superiores aos dos ligantes das séries 2 e 4, quando comparados com o ligante co-cristalizado na estrutura da enzima. Estes resultados corroboram o planejamento e desenho estrutural da nova série de inibidores da enzima FAAH a partir da construção da série 2 oriunda inicialmente do ligante endógeno anandamida por estratégias de química medicinal.

Os resultados de docking molecular demonstraram, ainda, que a restrição na liberdade conformacional da série 2, influencia, de forma direta, as energias de ligação global na série 3 em 11 dos 14 dos substituintes. A série 3 apresentou ainda diferenças de energia global com valores entre -0.1 a -1.9 (Kcal/Mol) a mais quando comparados os pares de ligantes com mesmo substituinte na região C da estrutura das séries 2 e 4, demonstrando assim um perfil de maior afinidade e menor concentração molar para os ensaios in vivo e in vitro.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, N. et al. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat. Neurosci.* 10, 870-878, 2007.

CARLSON, H. A. et al. Differences between high-and low-affinity complexes of enzymes and nonenzymes. *Journal of medicinal chemistry*, 51(20), 6432-6441. 2008.

CRAWLEY, J. N. et al. Anandamide, an Endogenous Ligand of the Cannabinoid Receptor, Induces Hypomotility and Hypothermia in-Vivo in Rodents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 46. 4, 967-972. 1993.

DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 129-140, 2007.

DODD, G. T. et al. The peptide hemopressin acts through CB1 cannabinoid receptors to reduce food intake in rats and mice. *J. Neurosci.* 30, 7369-7376, 2010.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017-1066, 2003.

HOWLETT, A. C. et al. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161-202, 2002.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies.* 1, 4. 337-341. 2004.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal Computational Chemistry.* 30, 16. 2785-2791. 2009.

NOONAN, J. et al. Endocannabinoids prevent beta-amyloid-mediated lysosomal destabilization in cultured neurons. *J. Biol. Chem.* 49, 38543-38554, 2010.

ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. 2015. Available at <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. Acessado em 22 de setembro de 2015.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* 63, 569-611, 2001.

PERTWEE, R. G. Elevating endocannabinoid levels: pharmacological strategies and potential therapeutic applications. *Proceedings of the Nutrition Society.* 73, 96-105. 2014.

PERTWEE, R. G. et al. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol. Rev.* 62, 588-631, 2010.

RAIES, A. B.; BAJIC, V. B. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity *WIREs Comput Mol Sci*, 6:147-172, 2016.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? *Rev. Bras. Psiquiatr.* vol.32 supl.1 São Paulo May 2010, S7-S14.

SHOHAMI, E. et al. Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1402-1410, 2011.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. *Química Nova*, 27(4), 631-639. 2004.

TROTT, O. e OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal Computational Chemistry.* 31, 2. 455-61. 2010.

Contato:

Nome: Valter Luiz da Conceição Gonçalves
e-mail: valter.luiz@unifeso.edu.br

Apoio financeiro: PICPq - Programa de Iniciação Científica e Pesquisa do UNIFESO
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq