

Campus Realengo

Curso de Graduação em Farmácia

Thaís Alves de Moraes

Aplicação de screening virtual para a descoberta de potenciais ligantes para o receptor P2X7

Rio de Janeiro

2021

Thaís Alves de Morais

**APLICAÇÃO DE SCREENING VIRTUAL PARA A DESCOBERTA
DE POTENCIAIS LIGANTES PARA O RECEPTOR P2X7**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao IFRJ/Campus
Realengo, como cumprimento parcial
das exigências para conclusão do curso.

Orientadores: Anael Viana Pinto Alberto
Anne Caroline Cândido Gomes

Rio de Janeiro
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Karina Barbosa dos Santos

Bibliotecária - CRB 7 n° 6212

M827

Morais, Thais Alves de

Aplicação de screening virtual para a descoberta de potenciais ligantes para o receptor P2X7 / Thais Alves de Moraes, 2021.

41f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2021.

Orientador(a): Profª. Drª. Anne Caroline Cândido Gomes

Coorientador(a): Prof. Dr. Anael Viana Pinto Alberto

1. Purinérgicos. 2. Receptor P2X7. 3. Screening virtual. 4. Docking Molecular.
I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Gomes, Anne Caroline Cândido . III. Alberto, Anael Viana Pinto. IV. Título.

COBIB/CReal

CDU 615

THAIS ALVES DE MORAIS

APLICAÇÃO DE SCREENING VIRTUAL PARA A DESCOBERTA DE
POTENCIAIS LIGANTES PARA O RECEPTOR P2X7

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao Instituto
Federal do Rio de Janeiro
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia.

Aprovado em 14/10/2021

Banca Examinadora



Prof^a. Dr^a. Anne Caroline Cândido Gomes - (Orientadora - IFRJ/*Campus* Realengo)



Prof. Dr. Anael Viana Pinto Alberto - (Orientador - FIOCRUZ)



Prof^a. Dr^a. Natiele Carla da Silva Ferreira - (Membro Externo - FIOCRUZ)



Prof. Dr. Rodolfo Goetze Fiorot - (Membro Externo - UFF)

MORAIS, T. A. Aplicação de screening virtual para a descoberta de potenciais ligantes para o receptor P2X7. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

RESUMO

O receptor P2X7 é um receptor purinérgico ativado por ATP extracelular e que forma um canal iônico cátion seletivo. Além disso, esse receptor promove a abertura de um poro membranar que permite a passagem de moléculas de até 900 Da quando exposto prolongadamente a altas concentrações de ATP. O receptor P2X7 é amplamente expresso em humanos, principalmente, em células do sistema imune e do sistema nervoso central, onde atua na sinalização que favorece o desenvolvimento de doenças inflamatórias e neurodegenerativas, respectivamente. Apesar de terem sido desenvolvidos diversos antagonistas para esse receptor, nenhum deles é aprovado para uso clínico, o que estimula a busca por novas moléculas com essa atividade. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi identificar potenciais ligantes do receptor P2X7 através da realização de *screening* virtual. Ao todo, foram testadas cerca de 4.000 moléculas do banco de dados africano através da técnica de *docking* molecular, cujos *scores* variaram de -9,348 a -5,622 kcal/mol. Em seguida, elaboramos um ranking com as 100 moléculas que apresentaram os menores valores de score, as quais foram avaliadas quanto ao número de violações acerca da regra de 5 de Lipinski, ao perfil ADMET e ao espectro de atividades. Com isso, apenas 6 moléculas foram selecionadas para a condução dos testes *in vitro*. Portanto, os resultados apontam para a descoberta de potenciais ligantes para o receptor P2X7, o que poderá contribuir significativamente para a farmacologia desse receptor.

Palavra-chave: Purinérgicos. Receptor P2X7. *Screening* virtual. *Docking* Molecular.

MORAIS, T. A. Application of virtual screening to discover potential ligands for the P2X7 receptor. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

ABSTRACT

The P2X7 receptor is an extracellular ATP-activated purinergic receptor that forms a cation selective ion channel. Furthermore, this receptor promotes the opening of a membrane pore that allows the passage of molecules of up to 900 Da when exposed to high levels of ATP for a long time. The P2X7 receptor is widely expressed in humans, mainly in cells of the immune system and the central nervous system, where it acts in signaling that helps the development of inflammatory and neurodegenerative diseases, respectively. Although several antagonists for this receptor have been developed, none of them are approved for clinical use, which encourages the continued search for new molecules with this activity. In this context, the aim of this work was to identify potential ligands for the P2X7 receptor through virtual screening. Altogether, about 4,000 molecules from the African database were tested using the molecular docking technique, with scores ranging from -9.348 to -5.622 kcal/mol. We then built a ranking of the 100 molecules based on the lowest score values and evaluated them according to the number of Lipinski's rule of 5 violations, ADMET profile, and spectrum of activities. Thus, only 6 molecules were selected for conducting the *in vitro* tests. Therefore, the results point to the discovery of potential ligands for the P2X7 receptor, which may contribute to the pharmacology of this receptor.

Keywords: Purinergic. P2X7. Receptor. Screening virtual. Docking Molecular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de uma subunidade do receptor P2X7.....	12
Figura 2 – Estrutura dos agonistas do receptor P2X7.....	14
Figura 3 – Sítio de ligação no receptor P2X4 semelhante ao do receptor P2X7.....	24
Figura 4 – Interações, em 2D, entre aminoácidos do receptor P2X7 e ATP.....	25
Figura 5 – Estrutura do antagonista competitivo TNP-ATP.....	26
Figura 6 – Interações, em 2D, entre aminoácidos do receptor P2X7 e TNP-ATP.....	27
Figura 7 – Sobreposição do ligante cristalográfico com o reancorado.....	28
Figura 8 – Previsão do potencial biológico de toxicidade e carcinogenicidade das 39 moléculas previamente selecionadas no <i>ranking</i>	31
Figura 9 – Estrutura das seis moléculas não carcinogênicas e atóxicas.....	31
Figura 10 – Estrutura das moléculas candidatas.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Moléculas do *ranking* que se enquadraram dentro dos parâmetros da regra dos 5 de Lipinski e demais regras de drogabilidade.....29

Tabela 2 - Moléculas que não apresentaram potencial toxicidade e carcinogenicidade.....31

Tabela 3 - Previsão das propriedades farmacocinéticas das moléculas candidatas.....32

Tabela 4 - Predição das atividades biológicas das moléculas candidatas.....33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA.....	10
1.2 RECEPTOR P2X7.....	10
1.2.1 Estrutura do receptor P2X7	11
1.2.2 Ligante do receptor P2X7	13
1.2.3 Ativação do receptor P2X7	14
1.2.4 Fisiologia e patologias associadas ao receptor P2X7	15
1.3 SCREENING VIRTUAL.....	18
1.4 DOCKING MOLECULAR.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 DESENVOLVIMENTO	22
3.1 METODOLOGIA.....	22
3.1.1 Estrutura do receptor P2X7	22
3.1.2 Banco de dados	22
3.1.3 Docking Molecular	22
3.1.4 Seleção de hits baseada na regra de 5 de Lipinski e drogabilidade	23
3.1.5 Predição do espectro de atividades	23
3.1.6 Obtenção do perfil ADME	23
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.2.1 Interação entre o receptor P2X7 e o seu agonista natural (ATP)	24
3.2.2 Interação entre o receptor P2X7 e antagonista competitivo (TNP-ATP)	25
3.2.3 Docking Molecular	28
3.2.4 Seleção de hits baseada na regra de 5 de Lipinski	28
3.2.5 Predição do espectro de atividades como critério de exclusão de moléculas tóxicas e carcinogênicas	30
3.2.6 Obtenção do perfil ADME	32
3.2.7 Predição do espectro de atividades (antineoplásica, anti-inflamatória e analgésica)	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

A sinalização purinérgica é realizada através de nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares que atuam sobre os receptores purinérgicos P1 e P2, respectivamente. Esses receptores são proteínas transmembranas que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como reatividade vascular, apoptose e secreção de citocinas (CAPPATO, 2012).

Os receptores P1 foram os primeiros receptores dessa família a serem descritos e possuem quatro subtipos caracterizados (A1, A2A, A2B e A3). São receptores metabotrópicos que possuem sete domínios transmembrana e são ativados por adenosina (CAPPATO, 2012).

Já os receptores P2 são ativados principalmente por nucleotídeos de adenosina e uracila, e são divididos em duas classes: P2Y e P2X (TAMAJUSUKU, 2010). Os receptores P2Y possuem oito subtipos caracterizados em humanos (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) e são receptores metabotrópicos ativados por ATP, ADP, UTP, entre outros. Os receptores P2X possuem sete subtipos caracterizados em mamíferos (P2X1-7), são ionotrópicos e, quando ativados, esses canais se abrem permitindo a passagem de íons, preferencialmente cátions, através da membrana plasmática. Isso resulta em um aumento da concentração de cálcio livre intracelular e na despolarização da membrana (CARVALHO, 2018). Os receptores desta classe são ativados fisiologicamente por ATP, além de agonistas sintéticos como Bz-ATP e $\alpha\beta$ -metil-ATP, apresentando diferentes sensibilidades a tais ligantes (FERREIRA, 2013).

1.2 RECEPTOR P2X7

O receptor P2X7 é amplamente expresso em células de mamíferos (rato, camundongo, urso panda e humanos), principalmente, no sistema nervoso central (oligodendrócitos, astrócitos e micróglia) e no sistema imune (monócitos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas) (BEZERRA, 2012; KOPP *et al.*, 2019; MENDES, 2017). Com isso, esse receptor está envolvido em diversos processos fisiológicos como a regulação do ciclo celular, aumento da resposta inflamatória, ativação de fosfolipases, ativação de proteínas quinases e ativação de vários fatores de transcrição. Devido a esse grande número de fenômenos que são mediados por esse receptor, já foram relatadas diversas doenças relacionadas à sua ativação, tais

como doenças inflamatórias (distrofia muscular de Duchenne, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal); neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson); além de dor e câncer (LARA *et al.*, 2020).

Devido ao potencial terapêutico, diversas empresas farmacêuticas vêm desenvolvendo antagonistas seletivos para o receptor P2X7, tais como a AstraZeneca (AZ10606120, AZ11645373 e AZD9056), GlaxoSmithKline (GSK1482160), Johnson & Johnson's (JNJ-47965567, JNJ-42253432, JNJ-54232334, JNJ-54140515, JNJ-54166060) e Pfizer (CE-224535). Todavia, nenhum desses antagonistas é aprovado para uso clínico. (LARA *et al.*, 2020).

1.2.1 Estrutura do receptor P2X7

O gene que codifica o receptor P2X7 humano está localizado no cromossomo 12, adjacente ao gene do receptor P2X4, e contém 13 exons que dão origem a uma proteína de 595 aminoácidos. Este gene P2X7R é altamente polimórfico, apresentando algumas mutações que conferem a perda de função proteica. A estrutura do P2X7 humano não foi elucidada através das técnicas de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN), devido às dificuldades comuns de purificação e cristalização de proteínas transmembranares (TM). Essas limitações, inclusive, geram um impacto no número de estruturas de proteínas TM inseridas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). Inicialmente, a previsão da estrutura tridimensional do P2X7 e outros receptores P2X se deu através das informações estruturais do P2X4, elucidada através de Cristalografia de Raio-X. Atualmente, a estrutura do receptor P2X7 foi totalmente definida pelo método de crio-microscopia eletrônica (SOARES, 2015). Além disso, as estruturas do P2X7 de galinha, urso panda e rato (incluindo o domínio intracelular) também estão disponíveis e são amplamente empregadas em estudos sobre a estrutura e funcionalidade deste receptor (LARA *et al.*, 2020).

O receptor P2X7 é um canal iônico formado por três subunidades (trimérico) com três sítios de ligação para ATP equivalentes, residindo entre essas subunidades. Cada subunidade possui um domínio extracelular, dois domínios transmembrana (TM1 e TM2) e um domínio intracelular, localizado no citoplasma da célula, onde estão presentes as caudas citoplasmáticas N-terminal e C-terminal, se organizando predominantemente na forma de homotrímero (BEZERRA, 2012; SOARES, 2015).

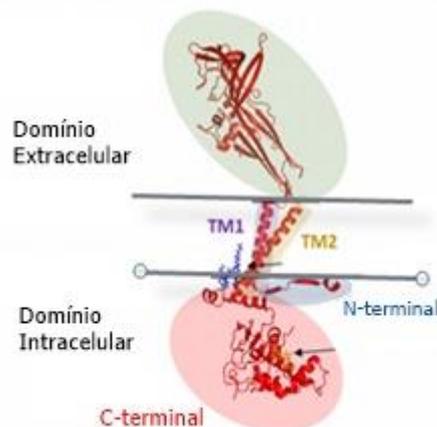
O domínio extracelular possui 282 aminoácidos, que assumem uma estrutura de folha-beta pregueada e contém um sítio de ligação de ATP entre duas subunidades. Essa região é rica em lisinas, que são importantes para a interação com o ATP, e em cisteínas que fazem cinco ligações dissulfeto entre si, desempenhando um papel importante na manutenção da conformação do domínio extracelular (LARA *et al.*, 2020).

O primeiro domínio transmembranar denominado TM1 possui cerca de 20 aminoácidos, enquanto o segundo domínio transmembranar denominado TM2 possui cerca de 19 aminoácidos. Dados na literatura sugerem que o TM2 forma a luz do canal iônico nos receptores P2X, sendo confirmado no receptor P2X4 e esse perfil parece se repetir para os outros subtipos (FERREIRA, 2013; KOPP *et al.*, 2019).

A cauda citoplasmática N-terminal possui apenas 25 aminoácidos, sendo uma cauda curta, que é ancorada na membrana plasmática por meio da palmitoilação, onde ocorre a adição de ácido palmítico a resíduos de cisteína através de ligação tioéster (BATISTA, 2018; LARA *et al.*, 2020).

A cauda citoplasmática C-terminal é formada por 245 aminoácidos, sendo mais longa nos receptores P2X7 quando comparada com outros receptores P2X e está envolvida na indução do poro não seletivo na membrana plasmática. Essa região é rica em cisteínas que sofrem palmitoilação em pelo menos cinco resíduos regulando assim sua localização na membrana celular. Esses resíduos palmitoilados permitem que cada cauda C-terminal crie dois locais de ligação de zinco e um local de ligação de difosfato ou trifosfato de guanosina (GDP / GTP) (SOARES, 2015).

Figura 1 – Estrutura de uma subunidade do receptor P2X7.



1.2.2 Ligantes do receptor P2X7

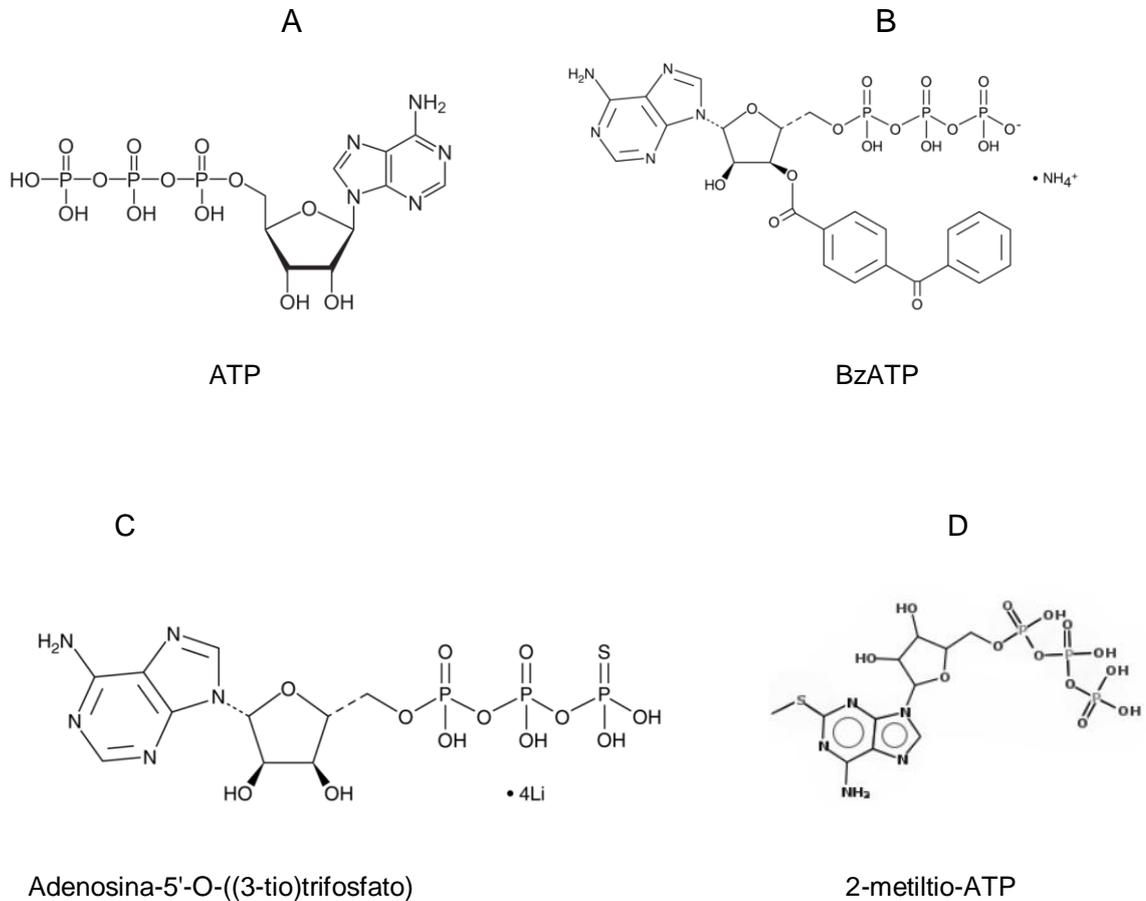
O principal ativador endógeno do receptor P2X7 é a adenosina tri-fosfato (ATP) (Figura 1A), que é um nucleotídeo trifosfatado existente em todas as células, formado por uma base nitrogenada, que é a adenina, uma pentose e três grupamentos fosfato (DIAS, 2017). Além do seu papel energético, essa molécula pode atuar na sinalização extracelular como um neurotransmissor purinérgico. Este nucleotídeo é armazenado em vesículas nas terminações sinápticas dos neurônios pré-sinápticos e, após a despolarização, é liberado, atuando em receptores pós-sinápticos denominados purinoreceptores como o P2X7. A liberação de ATP nos terminais pré e pós-sinápticos pode ocorrer como um mecanismo fisiológico, a partir da liberação de vesículas por exocitose ou através de transportadores de membrana, como canais de alta condutância, ou por um mecanismo patológico em resposta a danos celulares, como isquemia, inflamação, apoptose e necrose, sendo rapidamente degradado no meio extracelular por diferentes ATPases (ALTENHOFEN, 2013; CAPPATO, 2012).

Estudos sugerem que o sítio de ligação ao ATP nos receptores P2X possui resíduos aromáticos, que interagem com a adenina, fazendo ligações do tipo Pi-Pi e resíduos carregados positivamente, que fazem interações eletrostáticas com os grupamentos fosfato carregados negativamente presente na molécula de ATP (FERREIRA, 2013).

O receptor P2X7 é menos sensível ao seu agonista natural (ATP), quando comparado aos outros receptores P2X, necessitando de concentrações muito maiores para ser ativado ($EC_{50} \geq 100 \mu\text{M}$). Enquanto os demais receptores P2X são ativados por concentrações próximas de 1-10 μM de ATP. (TAMAJUSUKU, 2010).

O ATP rígido 3'-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP, conhecido como BzATP (Figura 2B), é o principal agonista sintético do receptor P2X7, sendo mais potente do que o ATP (BATISTA, 2008). Outros agonistas, como adenosina-5'-O-((3-tio)trifosfato) (Figura 1C) e 2-metiltio-ATP (Figura 1D) também podem ativar o receptor P2X7 humano, mas não são capazes de ativar os receptores de ratos e camundongos (TAMAJUSUKU, 2010).

Figura 2 – Estrutura dos agonistas do receptor P2X7.



Fonte: PubChem (2021).

1.2.3 Ativação do receptor P2X7

Quando o receptor P2X7 é estimulado pelo seu agonista, ele apresenta dois estágios de ativação, sendo que o primeiro corresponde à formação de um canal catiônico não seletivo de baixa condutância e o segundo a formação de um poro não seletivo de alta condutância. Esse receptor possui três sítios de ligação para o ATP, e a ativação do canal catiônico só ocorre quando dois desses sítios são ocupados. Quando a primeira molécula de ATP se liga no seu sítio de ligação, ocorre uma mudança conformacional levando a um rearranjo assimétrico fechado do trímero, o que dificulta a ligação da segunda e da terceira molécula de ATP no receptor. Com isso, a ativação do canal iônico do P2X7 só é alcançada quando o nível de ATP extracelular é elevado e é por isso que este receptor é menos sensível ao seu agonista natural em comparação com outros receptores P2X. Quando o segundo sítio de ligação de ATP é ocupado o receptor passa para um estado conformacional

assimétrico aberto, no qual uma baixa condutância é observada, ocorrendo a ativação do canal catiônico que facilita o influxo de Na^+ e Ca^{2+} e o efluxo de K^+ , resultando em um aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular livre e na despolarização da membrana celular (FERREIRA, 2014; KOPP *et al.*, 2019; LARA *et al.*, 2020).

Já a formação do poro não seletivo ocorre frente ao estímulo prolongado de ATP (4s ou acima), tornando a célula permeável a moléculas de alto peso molecular. Existem duas principais hipóteses para o mecanismo de abertura do poro. A primeira hipótese sugere que o próprio canal catiônico se dilata, através de um movimento de flexão de TM1 e TM2, formando o poro não seletivo. Isso aconteceria quando a terceira molécula de ATP ocupasse o seu sítio de ligação, ocorrendo um arranjo simétrico do trímero, levando a um alargamento e abertura do poro não seletivo. A segunda hipótese sugere a participação de proteínas acessórias para a formação do poro não seletivo e algumas proteínas formadoras de poro são candidatas a serem associadas ao receptor P2X7, como as panexinas, poro associado à maitoxina, TRPV1 (receptor vaniloide de potencial transiente), CALHM1 (modulador da homeostase de cálcio) entre outras. A abertura do poro não seletivo torna a célula permeável a moléculas de até 900 Da, como brometo de etídio, iodeto de propídeo, YOPRO-1 e *Luciferyellow*, um sal de lítio, levando à rápida despolarização da membrana e, caso a estimulação seja prolongada (15 a 30 minutos aproximadamente), a célula sofre danos irreversíveis podendo acarretar em morte celular (FERREIRA, 2013; ROGER *et al.*, 2015).

1.2.4 Fisiologia e patologias associadas ao receptor P2X7

A ativação do receptor P2X7 possui um efeito duplo na regulação do ciclo celular, em que a abertura do canal catiônico induz a proliferação celular, enquanto a abertura do poro não seletivo induz a morte celular. A abertura do canal catiônico nesse receptor induz a proliferação celular devido, principalmente, ao aumento dos níveis de cálcio intracelular, que ativa várias vias envolvidas na proliferação celular, como as vias do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), quinases c-Jun amino-terminal / proteína quinase ativada por mitógeno (JNK / MAPK), fosfatidilinositol 3-quinase / oncogene viral de timoma murino / homólogo do oncogene de mielocitomatose (PI3K / AKT / myc) e fator Induzido por Hipoxia-1 alfa- fator de crescimento endotelial vascular (HIF1 α -VEGF). Com isso, pode estar envolvido com

o aumento da proliferação e sobrevivência de muitos tipos de células cancerosas, incluindo câncer pancreático, leucemia e glioma. A abertura do poro não seletivo na membrana plasmática induz diferentes formas de morte celular como necrose, apoptose, autofagia. A necrose pode ocorrer devido à permeabilização não seletiva de moléculas de alto peso molecular, levando a uma interrupção da homeostase intracelular e citólise. A apoptose ocorre devido à grande despolarização da membrana, ativação das caspases 3, 8 e 9 e redistribuição de fosfatidilserina para a membrana externa. Já a autofagia ocorre devido à ativação da fusão autofagossomo-lisossomo ao regular positivamente beclin1 e LC3-II, desencadeando todo o processo de autofagia (KOPP *et al.*, 2019; LARA *et al.*, 2020).

Com base nisso, esse receptor pode desempenhar um duplo papel no câncer. A sua ativação pode favorecer o tumor, já que a abertura do canal catiônico ativa vias que induzem a proliferação celular, mas também pode provocar a redução tumoral devido à abertura do poro não seletivo e a mediação da morte celular. O ATP extracelular está presente em baixas concentrações em tecido saudável, mas sua concentração pode aumentar drasticamente durante o desenvolvimento do tumor, levando a formação prolongada do poro não seletivo e consequente morte celular, representando um desafio de sobrevivência para as células cancerosas. A sobrevivência do tumor não é comprometida quando a função do macroporo é inibida, enquanto a função do canal iônico se mantém. (KOPP *et al.*, 2019; LARA *et al.*, 2020).

O papel do receptor P2X7 no sistema imune, levando a um aumento da resposta inflamatória, está associado a situações em que há uma alta concentração de ATP extracelular. Quando esse receptor é ativado ele estimula as células dendríticas, linfócitos T (CD4+, CD8+ e T killer), macrófagos e micróglia, além de promover a morte de células Treg (BOMFIM, 2014). A ativação do receptor P2X7 leva a montagem e a ativação do inflamassoma NLRP3, que é um complexo proteico presente no citoplasma da célula, formado por três estruturas básicas: receptores do tipo NOD, proteína adaptadora (ASC) e pró-caspase 1, e é responsável pela clivagem da enzima pró-caspase 1 em caspase 1. A caspase 1 promove a clivagem da proteína pró-interleucina 1 β (pró-IL-1 β) em IL-1 β madura (uma das principais citocinas pró-inflamatórias), que é então liberada por macrófagos e outras células do sistema imunológico, desencadeando o processo

inflamatório (DANVAZO, 2016). Outras citocinas e quimiocinas também são secretadas devido à ativação do receptor P2X7, como IL-1 α , IL-2, IL4, IL6, IL8, IL-13, IL-18, TNF- α , CCL2 e CCL3. Como esse receptor assume um perfil pró-inflamatório, sua ativação pode estar associada a diversas doenças inflamatórias, como distrofia muscular de Duchenne, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal. Por ser amplamente distribuído no SNC, principalmente nas microglias, sua ativação e liberação de citocinas pró-inflamatórias causa neurotoxicidade desencadeando doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (FERREIRA, 2013; LARA *et al.*, 2020; SOUZA, 2016).

A ativação de fosfolipases, como fosfolipase A2 (PLA2) e fosfolipase D (PLD), também pode ocorrer através de receptores P2X7. Essas enzimas são responsáveis por catalisar a hidrólise de fosfolipídios para produzir diferentes segundos mensageiros lipídicos ou mediadores bioativos da sinalização celular. A fosfolipase A2 hidrolisa os fosfolipídios da membrana celular, particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, liberando o ácido araquidônico (AA). O ácido araquidônico liberado será metabolizado por duas enzimas distintas: pelas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que desencadeia a biossíntese das prostaglandinas e dos tromboxanos, e pelas lipoxigenases (LOX), responsável pela síntese dos leucotrienos, lipoxinas e outros compostos. Essas prostaglandinas são responsáveis pela sensibilização de receptores da dor (nociceptores) e elevação da temperatura corpórea no hipotálamo por estímulo de citocinas, com isso, este receptor pode ser associado ao processo de dor (SANTOS-FILHO, 2009). A ativação da PLA2 por P2X7 ocorre principalmente em células imunes e epiteliais e, além dos efeitos citados anteriormente, pode causar também secreção de calicreína, geração de lipídios bioativos e formação de poros. Fosfolipases D catalisam a hidrólise da ligação fosfodiéster dos glicerofosfolipídeos ou esfingofosfolipídeos produzindo, principalmente, ácido fosfatídico (PA), podendo causar remodelação da membrana e ativar diversas proteínas, como o complexo NOX, fosfolipase C (PLC), quinases e proteínas regulatórias da proteína G (KOPP *et al.*, 2019; LARA *et al.*, 2020).

Com isso, nota-se que o receptor P2X7 está amplamente distribuído pelo organismo, mediando um grande número de fenômenos e pode estar envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos. Atualmente, no mercado, não existe nenhum fármaco que tenha o P2X7 como alvo farmacológico. Exatamente por isso,

há um grande interesse no desenvolvimento de fármacos que possam atuar nesses receptores sendo empregados no tratamento de diferentes doenças.

1.3 SCREENING VIRTUAL

O *screening* virtual (SV) é uma metodologia útil na descoberta de novos antagonistas para o receptor P2X7, pois fornece informações importantes sobre a estrutura e as interações moleculares desses receptores. No SV são analisadas extensas bases de dados de moléculas, buscando reduzir o conjunto de moléculas a uma quantidade que possa ser manipulada, comparada e testada em laboratório. Antes do *screening* Virtual, toda a etapa de testes de interação entre moléculas era feito em laboratório, fazendo com que este processo fosse lento, custoso e exigisse um bom planejamento prévio (JESUS, 2016).

O *screening* virtual pode ser executado sendo baseado na estrutura do ligante (LBVS – *Ligand based Virtual Screening*) ou baseado na estrutura do receptor (SBVS - *Structure-based Virtual Screening*). No LBVS, os ligantes conhecidos são utilizados como referência para comparações, através de similaridade química, com outros compostos. Já o SBVS simula interações moleculares entre ligantes e macromoléculas, através do docking molecular, permitindo a descoberta de novos ligantes com maior variedade estrutural quando comparados aos encontrados através da LBVS (JESUS, 2016).

O suporte computacional para o *screening* virtual pode variar de um simples computador a um sistema altamente avançado, dependendo do método utilizado. Um dos softwares utilizados são Autodock, DOCK, BLAZE, DOCKTHOR e GSA. Essa metodologia computacional pode ser lenta e custosa por conta das extensas bases de dados de moléculas analisadas e, também, das características de execução das ferramentas disponíveis. Para um melhor desempenho do *screening* virtual, gerando reduções do tempo total de execução, é importante que ocorra adaptação do Autodock para plataformas de execução paralela (JESUS, 2016).

O SV, utilizando a técnica de *docking* molecular, pode ter diversas aplicações no campo de receptores P2, uma delas é a busca de melhores candidatos a fármacos para ensaios clínicos, que poderiam tornar-se novas terapias no tratamento de diversas doenças, e também é aplicada para avaliar a seletividade e afinidade no teste de ligantes, além disso, o *docking* molecular pode ser empregado para avaliar a atividade potencial moduladora alostérica positiva e negativa em

receptores P2, como no estudo de Dhuna *et al.* (2019), que examinaram a atividade dos ginsenosídeos de *Panaxginseng*, uma planta medicinal tradicional chinesa, como moduladores alostéricos positivos do receptor P2X4 e P2X7 (ALBERTO *et al.*, 2020).

1.4 DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular é uma ferramenta computacional que permite avaliar a interação entre duas moléculas, podendo ser uma macromolécula (proteína) e um ligante. O ligante pode assumir diversas conformações (dependendo do número de torções livres que ele possui) e através do *docking* molecular é possível descobrir quais dessas conformações serão as mais adequadas para se ligar no sítio ativo da proteína alvo, gerando o complexo proteína/ligante mais estável. Ou seja, através do *docking* molecular é possível saber quais são as conformações do ligante que melhor interagem com a macromolécula alvo e geram o complexo mais estável. Em geral, as interações entre ligante e proteína são relacionadas a uma energia de ligação, que refere-se à energia livre de Gibbs. Essa grandeza termodinâmica está relacionada com a espontaneidade de um processo e depende tanto da variação de entalpia, variação de entropia e temperatura. E, quanto menor for a energia livre de Gibbs, mais espontâneo e favorável é o processo. No resultado do *docking* molecular, essa energia é chamada de *score* e quanto menor o valor de *score*, maior será a afinidade do ligante com a proteína. (FAN, 2019; SILVA, 2018).

Existem vários softwares que realizam o *docking* molecular, como por exemplo, o Autodock, DockThor, Raccoon entre outros. Esses programas vão realizar a ancoragem de um determinado ligante a uma macromolécula alvo, formando um complexo ligante/macromolécula. O *docking* pode ser realizado com a proteína estática ou com certa liberdade conformacional da proteína, dependendo da técnica utilizada, enquanto que as ligações do ligante sempre são rotacionadas para ele ser encaixado de diversas maneiras no sítio de ligação. Em seguida, o programa fornece as energias envolvidas nas interações entre ligante e molécula alvo nas diferentes conformações do ligante e aquela interação que liberar mais energia forma o complexo de menor energia e mais estável. (FAN, 2019).

Com isso, nesse trabalho o SV foi conduzido através da técnica de *docking* molecular, e as moléculas que apresentaram os menores valores de *score* foram submetidas a outras análises *in silico* para a investigação das características físico-

químicas, farmacocinéticas e espectro de atividades, ocorrendo uma seleção de moléculas consideradas como potenciais *hits* (um novo ligante ou composto bioativo).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo geral identificar novos ligantes para o receptor P2X7 utilizando análises *in silico*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a interação entre as moléculas retiradas do Banco Africano (AfroDb) e o receptor P2X7, através de *docking* molecular;
- Investigar as características físico-químicas, farmacocinéticas e espectro de atividades das moléculas candidatas através de programas de predição virtual.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 METODOLOGIA

3.1.1 Estrutura do receptor P2X7

A estrutura do receptor P2X7 utilizada no estudo foi à estrutura cristalográfica do P2X7 do urso panda (5U2H) (KARASAWA; KAWATE, 2016), 85% idêntica à proteína P2X7 humana, obtida através do banco de dados *Protein Data Bank*. Apesar de não possuir boa resolução (3,90 Å), essa estrutura foi escolhida por possuir o ligante cristalográfico ATP. Além disso, também foi utilizada a estrutura (5XW6) da galinha para avaliação da interação do receptor com o antagonista competitivo (TNP-ATP) (KASUYA; HATTORI; NUREKI, 2017).

3.1.2 Banco de dados

As moléculas utilizadas no SV pertencem ao banco de moléculas africano (AfroDb), o qual faz parte da base de dados ZINC15 (<https://zinc.docking.org/>). Elas são moléculas de origem natural, sendo que a maioria delas pertence à classe dos terpenos, que foram isolados de plantas medicinais na África. O download do banco de dados foi feito no formato PDB e posteriormente transformadas para SDF. Esse banco de dados foi escolhido, pois o interesse desse estudo era trabalhar com produtos naturais, sendo o AfroDb o banco com um maior número de moléculas disponíveis.

3.1.3 Docking Molecular

O SV foi realizado através da técnica de *docking* molecular. A macromolécula utilizada possui o ATP como ligante cristalográfico, isso é importante, pois a localização espacial do sítio-ativo torna-se conhecida. Após o download, feito através do *Protein Data Bank*, a proteína (5U2H) e o ligante cristalográfico (ATP) foram separados e tratados no *Discovery Studio Visualizer*. A ancoragem entre a proteína e os ligantes de interesse foi feita no *AutoDock Tools* e o ATP foi utilizado para a construção da caixa para ancoragem, através do ajuste das dimensões x, y e z (center_x = 171,338, center_y = 167,075, center_z = 143,325, size_x = 10, size_y = 8 e size_z = 8).

Para a validação do método, foi realizada a reancoragem do ATP no receptor e, após isso, foi avaliada a sobreposição do ligante cristalográfico com o reancorado,

para verificar se os átomos e ligações apresentavam sobreposição, determinando se o método de *docking* foi eficiente.

O *docking* molecular foi realizado através do servidor Dockthor (<https://dockthor.Incc.br/v2/>). Neste servidor é possível fazer o *upload* da molécula alvo e de aproximadamente mil ligantes. Após aplicar todos os comandos, o *docking* molecular foi realizado através dos algoritmos do Dockthor e os resultados encaminhados por e-mail dentro de alguns dias e as interpretações dos resultados foram feitas pela nossa equipe.

3.1.4 Seleção de *hits* baseada na regra de 5 de Lipinski e drogabilidade

A aplicação da regra de 5 de Lipinski consistiu no primeiro filtro de seleção de moléculas consideradas como potenciais *hits*. Os valores referentes a esses parâmetros foram obtidos através do site Molinspiration (<https://www.molinspiration.com>), a partir da inserção da sequência SMILES de cada molécula. Em seguida, foi calculado a drogabilidade das moléculas utilizando os critérios de Lipinski, Ghose, Veber e Egan, através do site Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch>). O critério de exclusão para esse filtro foi à violação de dois ou mais critérios.

3.1.5 Predição do espectro de atividades

O site utilizado para a predição do espectro de atividades foi o PASS online (<http://www.pharmaexpert.ru/PASSonline/index.php>), a partir da inserção da sequência SMILES de cada molécula. Inicialmente, essa predição foi utilizada como critério para a exclusão das moléculas que apresentassem as atividades carcinogênica e/ou tóxica. Em um segundo momento, ela foi utilizada para a predição das atividades biológicas das moléculas candidatas, como antineoplásica, anti-inflamatória e analgésica.

3.1.6 Obtenção do perfil ADME

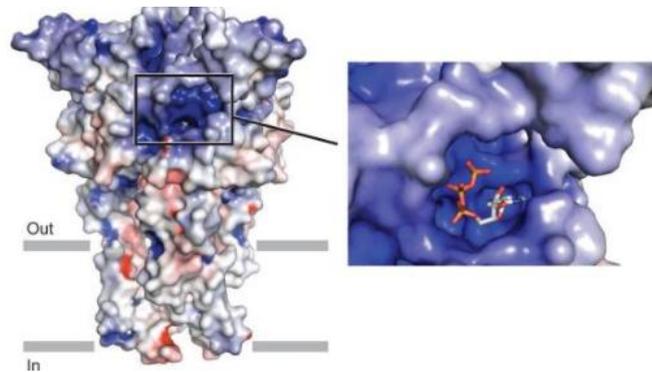
O cálculo desses parâmetros (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) foi obtido através do site Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch>), a partir da inserção da sequência SMILES de cada molécula.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Interação entre o receptor P2X7 e o seu agonista natural (ATP)

O receptor P2X7 possui três locais de ligação de ATP equivalentes, localizados em cada um dos três pares de superfícies de contato de subunidades adjacentes. Esse sítio de ligação é revestido com resíduos aromáticos e resíduos carregados positivamente e a base de adenina do ATP encontra-se profundamente enterrada no bolso de ligação do ATP. A molécula de ATP ligada adota uma estrutura em forma de U com fosfatos dobrados em direção ao anel de adenina. Esses grupos fosfatos carregados negativamente em forma de U participam de interações iônicas e ligação de hidrogênio (HATTORI; GOUAUX, 2012).

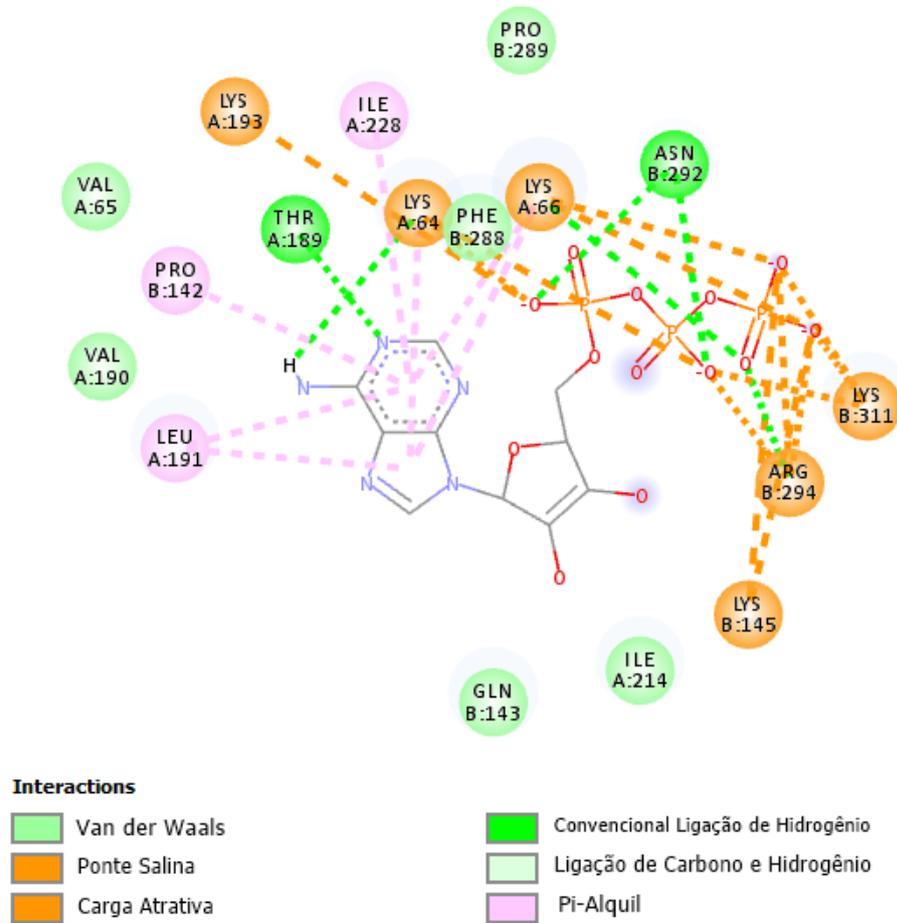
Figura 3 - Sítio de ligação no receptor P2X4 semelhante ao do receptor P2X7



Fonte: Adaptado de HATTORI; GOUAUX (2012).

As interações importantes para a ativação deste receptor (Figura 4) ocorrem entre as lisinas (Lys64, Lys66, Lys145, Lys193 e Lys311) e os grupamentos fosfato carregados negativamente presente na molécula de ATP, que realizam interações iônicas, além disso, a lisina (Lys66) e asparagina (Asn292) também realizam ligações de hidrogênio com esses grupamentos fosfatos. No anel de adenina ocorre interações hidrofóbicas do tipo Pi-alquil com leucina (Leu191), isoleucina (Ile228), prolina (Pro142) e lisina (Lys64 e Lys66) e, por fim, ligações de hidrogênio com treonina (Thr189) e lisina (Lys64) (HATTORI; GOUAUX, 2012).

Figura 4 – Interações, em 2D, entre aminoácidos do receptor P2X7 e ATP

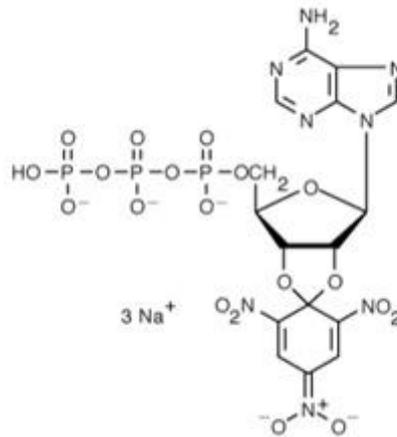


Fonte: *Discovery Studio Visualizer* (2021).

3.2.2 Interação entre o receptor P2X7 e o antagonista competitivo (TNP-ATP)

O 2', 3'-O- (2,4,6-trinitrofenil) -ATP (TNP-ATP) é um antagonista competitivo do receptor P2X7 (Figura 5), que se liga no sítio de ligação do ATP, impedindo a ligação deste agonista natural. O anel de adenina de TNP-ATP adota uma conformação semelhante à observada nas estruturas ligadas a ATP. Os grupos fosfatos presentes no TNP-ATP adotam uma estrutura totalmente estendida, diferente dos grupos fosfatos presentes no ATP, que formam uma estrutura curvada em "forma de U". Esta conformação estendida dos grupos fosfato participa de ligações de hidrogênio (KASUYA *et al.*, 2017).

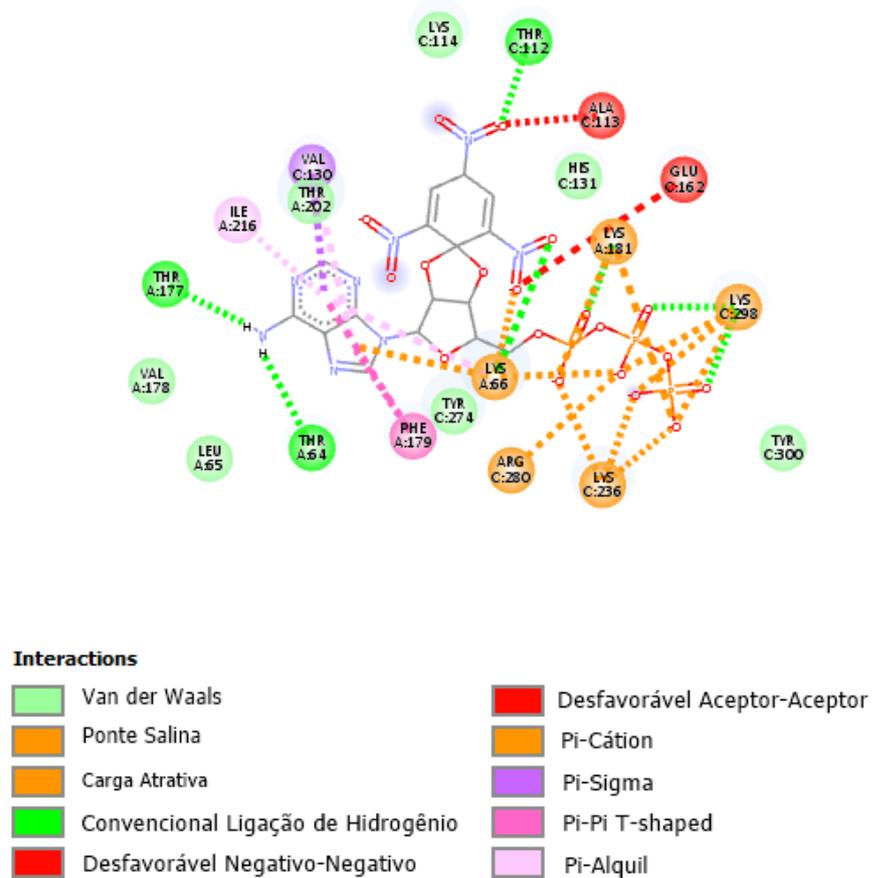
Figura 5 – Estrutura do antagonista competitivo TNP-ATP



Fonte: PubChem (2021).

As interações importantes para a ligação do antagonista competitivo (Figura 6) ocorrem entre lisinas (Lys66, Lys181, Lys236 e Lys298) e os grupamentos fosfatos carregados negativamente presente na molécula de TNP-ATP, que realizam interações iônicas, além disso, as lisinas (Lys181, Lys236 e Lys298) também realizam ligações de hidrogênio com esses grupamentos fosfatos. No anel de adenina ocorre ligação de hidrogênio com a treonina (Thr64 e Thr177), interações hidrofóbicas do tipo Pi-álquil entre lisina (Lys66), treonina (Thr202) e isoleucina (Ile216) e interação do tipo Pi-pi com a fenilalanina (Phe179). Já no grupo trinitrofenil ligado a ribose ocorre ligação de hidrogênio com a treonina (Thr112 e Thr202) e lisina (Lys66) (KASUYA *et al.*, 2017).

Figura 6 – Interações, em 2D, entre aminoácidos do receptor P2X7 e TNP-ATP



Fonte: *Discovery Studio Visualizer* (2021).

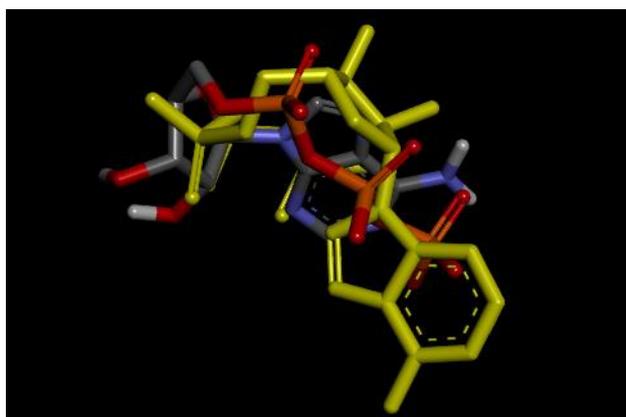
Ao compararmos a estrutura do agonista natural (ATP) e do antagonista competitivo (TNP-ATP) com as moléculas testadas (ANEXO A), podemos observar que elas apresentam pouca semelhança estrutural. Como as moléculas testadas possuem anéis volumosos, espera-se que esses anéis façam as interações hidrofóbicas, como ocorre com o anel de adenina. Já as carboxilas, presentes na maioria das moléculas, podem realizar as interações iônicas com os aminoácidos lisinas. Além disso, as hidroxilas realizam as ligações de hidrogênio. Por fim, esses possíveis antagonistas são estruturalmente maiores do que o agonista natural (ATP), e os grupos volumosos são importantes para o bloqueio do sítio ativo, impedindo que o agonista se ligue e exerça sua função.

3.2.3 Docking Molecular

Nesse trabalho, realizamos o SV através da técnica de *docking* molecular com aproximadamente 4 mil moléculas oriundas de produtos naturais. O valor de *score* dessas moléculas variou entre -9,348 kcal/mol e -5,622 kcal/mol. A partir dos dados de *docking* molecular, foi elaborado um *ranking* com as 100 moléculas que apresentaram os menores valores de *score*, os quais variaram entre -9,348 a -8,648 kcal/mol. Esse *ranking* foi elaborado com o intuito de fazermos uma pré-seleção das moléculas que evoluíram para as demais etapas de predição *in silico*. Essa faixa de interação é considerada boa, quando comparada á energia de interação do BzATP (-8,285 kcal/mol), principal agonista sintético do receptor P2X7.

A sobreposição do ligante cristalográfico com o reancorado (Figura 7) mostrou que o processo de *Docking* molecular não foi tão eficiente, já que os átomos e ligações não estão aproximadamente sobrepostos.

Figura 7 - Sobreposição do ligante cristalográfico com o reancorado



Fonte: *Discovery Studio Visualizer* (2021).

3.2.4 Seleção de *hits* baseada na regra de 5 de Lipinski

A primeira predição realizada com as moléculas distribuídas no *ranking* diz respeito à sua aplicabilidade quanto à regra de 5 de Lipinski. Lipinski *et al.* (1997) realizaram um estudo com o intuito de identificar quais propriedades físico-químicas estão relacionadas com uma adequada biodisponibilidade oral de um composto. Nesse estudo, Lipinski analisou quatro parâmetros físico-químicos de mais de 2000 fármacos que apresentavam uma boa biodisponibilidade oral, esses parâmetros são: peso molecular, log p, número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (soma dos átomos O-H e N-H) e número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio

(soma dos átomos O e N). Os resultados alcançados pelo estudo liderado por Lipinski gerou a chamada regra dos cinco de Lipinski. Essa regra prevê que para que as moléculas apresentem boa biodisponibilidade oral, elas devem apresentar as seguintes características: peso molecular ≤ 500 Da, logP calculado (Clog P) ≤ 5 , que é o coeficiente de partição, sendo um parâmetro frequentemente usado como medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos, número de átomos doadores de hidrogênio ≤ 5 e número de átomos aceptores de hidrogênio ≤ 10 . As moléculas que apresentem duas ou mais violações quanto a esses parâmetros têm grande chance de serem pouco permeáveis (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Assim, como podemos observar na Tabela 1, apenas 39 moléculas do *ranking* (Anexo A) se enquadraram aos critérios dessa regra, apresentando entre 0 e 1 violação. Cabe ressaltar que esse fato já poderia ser esperado, uma vez que os produtos naturais consistem em uma exceção a essa regra (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Além disso, essas moléculas previamente referidas ainda apresentaram 0 ou 1 violação de critérios adicionais de drogabilidade, estabelecidos por Ghose, Veber, Egan e Muegge (DAINA *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Moléculas do *ranking* que se enquadraram dentro dos parâmetros da regra dos 5 de Lipinski e demais regras de drogabilidade

Molécula	Score (kcal/mol)	Peso Molecular	Doadores de L.H	Aceptores de L.H	Log P	Violações	Violações (drogabilidade)
1458	-9,348	398,50	5	7	-0,04	0	0
1649	-9,207	366,45	0	6	2,39	0	0
3847	-9,202	468,27	3	3	4,45	0	1 - Ghose
125	-9,153	322,49	0	3	4,50	0	0
123	-9,150	308,51	0	2	5,28	1	1 - Muegge
80	-9,130	384,56	2	5	3,81	0	0
124	-9,125	310,52	1	2	5,15	1	1 - Muegge
5671	-9,120	354,49	2	5	3,53	0	0
142	-9,100	326,52	2	3	4,96	0	0
126	-9,081	323,50	1	3	0,57	0	0
104	-9,049	340,50	3	4	3,90	0	0
5670	-8,981	354,49	2	5	3,53	0	0
127	-8,976	324,50	1	3	4,13	0	0
4963	-8,969	324,50	3	3	3,64	0	0
5101	-8,969	324,50	3	3	3,64	0	0
83	-8,943	326,52	2	3	4,46	0	1 - Muegge
102	-8,941	322,49	1	1	5,38	1	0
4974	-8,915	90,15	4	5	2,60	0	0
122	-8,907	324,50	1	3	4,62	0	0
141	-8,894	428,75	1	1	8,24	1	0
5006	-8,881	308,51	2	2	4,35	0	1 - Muegge
1349	-8,862	354,49	4	5	1,32	0	0
105	-8,851	324,50	2	3	4,85	0	0
112	-8,841	308,51	1	1	6,0	1	1 - Muegge
4964	-8,832	308,51	2	2	4,58	0	1 - Muegge

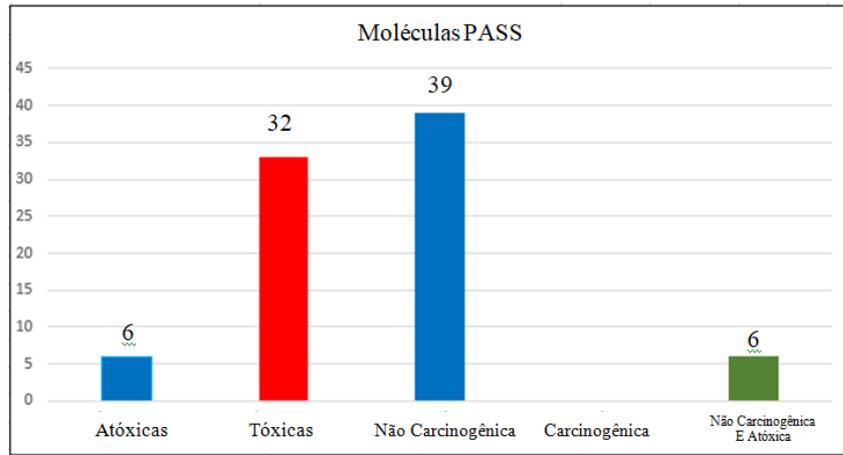
5672	-8,824	356,50	3	5	3,37	0	0
5666	-8,805	356,50	3	5	3,00	0	0
137	-8,796	324,50	1	3	4,62	0	0
89	-8,784	324,50	1	3	4,62	0	0
5504	-8,780	342,52	2	4	4,48	0	1 - Muegge
5363	-8,772	370,44	3	7	1,21	0	0
5664	-8,763	356,5	3	5	3,37	0	0
5005	-8,757	308,51	2	2	4,35	0	1 - Muegge
118	-8,737	358,48	4	6	1,92	0	0
115	-8,712	324,5	1	3	4,62	0	0
119	-8,711	358,48	4	6	1,92	0	0
6151	-8,696	370,49	3	6	2,44	0	0
3432	-8,677	286,37	4	5	0,83	0	0
3667	-8,654	280,45	1	2	4,24	0	0

Fonte: O autor (2021).

3.2.5 Predição do espectro de atividades como critério de exclusão de moléculas tóxicas e carcinogênicas

Em seguida, essas 39 moléculas foram submetidas à análise da predição do espectro de atividades, a qual prevê o potencial biológico de uma molécula com base em sua relação estrutura-atividade. Esse programa prevê os possíveis efeitos biológicos para uma molécula através da comparação da sua estrutura com estruturas previamente treinadas pelo algoritmo, as quais abrigam mais de 7.200 tipos de atividades biológicas. Os resultados dessa previsão são resumidos em uma lista de atividades biológicas prováveis, em que essas moléculas apresentam probabilidade de serem ativas (P_a) e probabilidade de serem inativas (P_i). Os valores de P_a e P_i variam no intervalo de 0,000 e 1,000 e, em geral, o somatório de P_a e P_i não é igual a 1, pois provavelmente há uma faixa inconclusiva ou de incerteza, onde não é possível determinar se a molécula é ativa ou inativa. Isso porque o algoritmo fornece conjuntos separados de critérios para determinar a atividade e a inatividade, não sendo critérios excludentes. Para uma molécula, a chance de apresentar determinada atividade é quando a $P_a \geq 0,7$. É improvável de apresentar determinada atividade quando a $P_a < 0,5$ (RAZZAGHI-ASL *et al.*, 2018). O critério de eliminação utilizado nesse filtro foi o valor de $P_a \geq 0,7$ para as atividades “carcinogênica” e “tóxica”. Como podemos ver na Figura 8, nenhuma molécula apresentou carcinogenicidade, todavia 32 moléculas apresentaram alta probabilidade de serem tóxicas. Uma das 39 moléculas apresentou erro nessa plataforma e por isso foi eliminada. Assim, apenas seis moléculas não demonstraram potencial de toxicidade e carcinogenicidade simultaneamente, como pode ser observado na Tabela 2, seguindo para as próximas etapas de predições.

Figura 8 - Previsão do potencial biológico de toxicidade e carcinogenicidade das 39 moléculas previamente selecionadas no *ranking*.



Fonte: O autor (2021).

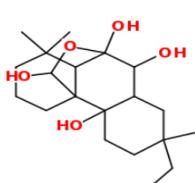
Tabela 2 - Moléculas que não apresentaram potencial toxicidade e carcinogenicidade.

Molécula	Tóxica	Carcinogênica
4974	0,428	ND
5363	0,696	ND
1349	0,686	ND
3847	0,656	ND
4963	0,635	ND
5101	0,635	ND

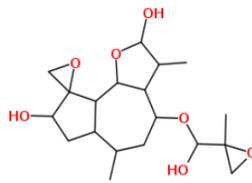
ND: não determinada.

Fonte: O autor (2021).

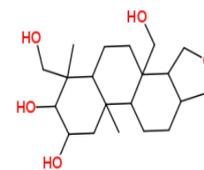
Figura 9 – Estrutura das seis moléculas não carcinogênicas e atóxicas.



Africano (4974)



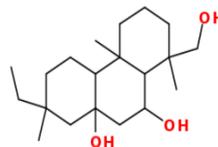
Africano (5363)



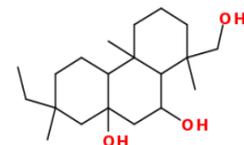
Africano (1349)



Africano (3847)



Africano (4963)



Africano (5101)

Fonte: Molinspiration (2021).

3.2.6 Obtenção do perfil ADME

Posteriormente, essas seis moléculas que não apresentaram toxicidade e carcinogenicidade seguiram para a etapa de obtenção do perfil ADME, o qual consiste nas propriedades farmacocinéticas das moléculas que são importantes para determinar a sua eficácia e segurança. Como podemos observar na Tabela 3, todas as moléculas possuem alta absorção gastrointestinal e cutânea, pois quanto mais negativo o log Kp (com Kp em cm/s), menos permeante na pele é a molécula. Além disso, a maioria delas interage com proteínas plasmáticas, com exceção das moléculas 4963 e 5101, e três delas (3847, 4963 e 5101) são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Finalmente, nenhuma delas é inibidora das isoformas das enzimas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4).

Tabela 3 - Previsão das propriedades farmacocinéticas das moléculas candidatas

Molécula	ADME				
	Absorção		Distribuição		Metabolismo
	Cutânea (Log Kp)	G.I	PP	BBB	CYP
3847	-5.40 cm/s	Alta	Sim	Sim	Não
4963	-5.40 cm/s	Alta	Não	Sim	Não
5101	-5.40 cm/s	Alta	Não	Sim	Não
4974	-6.62 cm/s	Alta	Sim	Não	Não
1349	-7.24 cm/s	Alta	Sim	Não	Não
5363	-8.42 cm/s	Alta	Sim	Não	Não

GI = gastrointestinal; PP = proteínas plasmáticas; BBB = barreira hematoencefálica

Fonte: O autor (2021).

3.2.7 Predição do espectro de atividades (antineoplásica, anti-inflamatória e analgésica)

Finalmente, analisamos as predições do espectro de atividades a fim de verificarmos seus possíveis efeitos sobre o receptor P2X7, o qual está envolvido com a regulação do ciclo celular, resposta inflamatória, ativação de fosfolípases e ativação de proteínas quinases. Com isso, esse receptor está associado a diversas doenças inflamatórias (distrofia muscular de Duchenne, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal), neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), câncer e dor (LARA *et al.*, 2020). Assim, essas moléculas foram avaliadas quanto aos possíveis efeitos que poderiam apresentar sobre cada uma dessas doenças mencionadas. Como podemos observar na Tabela 4, todas as moléculas apresentam atividade antineoplásica, com exceção da molécula 5101. Todavia, apenas a molécula 1349

apresentou probabilidade de atuar sobre a estimulação da caspase-3, podendo explicar a atividade antineoplásica através deste mecanismo. Além disso, nenhuma das moléculas pesquisadas possui atividade analgésica e antiinflamatória, com exceção da molécula 1349.

Tabela 4 - Predição das atividades biológicas das moléculas candidatas

Atividades	Moléculas					
	Africano 3847	Africano 4963	Africano 5101	Africano 4974	Africano 1349	Africano 5363
	Câncer					
Antineoplásico	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Indução de apoptose	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Estimulação de caspase 3	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
Estimulação de caspase 8	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Inflamação					
Analgésico	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Dor					
Antiinflamatório	Não	Não	Não	Não	Sim	Não

Fonte: O autor (2021).

A molécula de número (4974) é denominada de esferopsidina B (Figura 10A). Essa molécula é um produto natural encontrado em *Diplodia cupressi*, que pertence ao gênero de fungos anamórficos da família Botryosphaeriaceae. Esse composto é uma gama-lactona, metabólito secundário da classe dos diterpenos, cuja fórmula molecular é $C_{20}H_{28}O_5$ e massa molar é 348,4 g/mol. Não há estudos relacionando alguma atividade dessa substância sobre os receptores P2X. A esferopsidina B apresenta atividade antibacteriana contra as bactérias *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Pseudomonas fuscovaginae* e *Burkholderia glumae*, que causam a doença bacteriana do arroz, e também apresenta atividade sobre a dissuasão de picadas, além de propriedade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (CIMMINO, 2013).

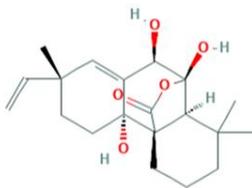
A molécula de número (1349) é denominada de epispongiatriol (Figura 10B), que consiste em um furanoditerpeno encontrado em esponjas do gênero *Spongia* da Grande Barreira de Corais australiana. O epispongiatriol é um isômero do espongiatriol. Esse composto possui a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_5$ e massa molar 348,4 g/mol. Ainda não há nenhum relato na literatura sobre a atividade dessa molécula sobre os receptores P2X. Estudos mostram que o espongiatriol causa queda na pressão sanguínea, mas não na frequência cardíaca, em ratos hipertensos de forma dose-dependente até 50 mg / kg, além de inibir a ativação do fator nuclear

kappa B e induzir a apoptose em células de câncer pancreático (GUZMÁN *et al.*, 2013).

A molécula de número (5363) é denominada de acroptilina (Figura 10C) e consiste em uma lactona sesquiterpênica isolada da planta *Acroptilon repens* e que possui propriedades antialérgicas. Sua fórmula molecular é $C_{19}H_{23}ClO_7$ e massa molar 398,8 g/mol. Ainda não há relatos na literatura sobre a sua atividade sobre os receptores P2X. Todavia, um estudo já foi realizado para avaliar a toxicidade do extrato aéreo de *Asteraceae centaurea Repens* L, também conhecida como *Acroptilonrepens*, em camundongos mostrou pela primeira vez que a acroptilina possui propriedades anti-hiperlipidêmicas (MORADI, 2017).

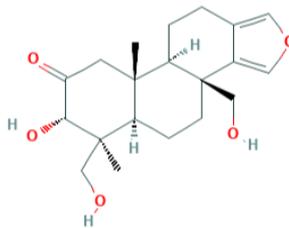
Figura 10 – Estrutura das moléculas candidatas.

A



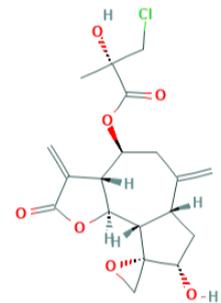
Esferopsidina B

B



Episongiatriol

C



Acroptilina

Fonte – PubChem (2021).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ativação do receptor P2X7 está associada a inúmeros eventos celulares que levam a diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como doenças inflamatórias (distrofia muscular de Duchenne, artrite reumatóide e doença inflamatória intestinal); neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson); além de dor e câncer, uma molécula que tenha uma boa interação com este receptor, principalmente exercendo uma ação antagonista, uma boa farmacocinética e baixa toxicidade, sendo considerada segura, será capaz de ser empregada na terapia de uma série de doenças associadas a este receptor.

Através da aplicação da técnica de SV utilizando a metodologia de *docking* molecular, conseguimos testar aproximadamente 4.000 moléculas de origem natural, retiradas do banco de dados AfroDB. Dentre elas, as moléculas esferopsidina B, espongiatriol e acroptilina se mostraram as mais promissoras em termos de afinidade com o receptor P2X7 e drogabilidade, além de apresentarem perfil ADMET ideal para administração por via oral. Assim, como perspectivas futuras, essas moléculas serão compradas e conduzidas para testes *in vitro*, o que poderá contribuir significativamente para a farmacologia desse receptor.

Por fim, ainda não há relatos na literatura relacionando alguma ação das moléculas aprovadas sobre os receptores P2X, sendo a primeira vez que é detectada uma possível atividade dessas moléculas sobre o receptor P2X7, o que torna este estudo pioneiro.

REFERÊNCIAS

- ALBERTO, A. V. P. *et al.* Molecular Modeling Applied to the Discovery of New Lead Compounds for P2 Receptors Based on Natural Sources. **Frontiers in Pharmacology**, Rio de Janeiro, Brazil, p. 1–13, 29 Sep. 2020.
- ALTENHOFEN, S. **Avaliação dos efeitos de fármacos benzodiazepínicos sobre o catabolismo de nucleotídeos, nucleosídeos e acetilcolina em encéfalo de zebrafish adulto (danio rerio)**. Orientador: Carla Denise Bonan. 2013. 133 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- BATISTA, C. M. **Estudos sobre a s-palmitoilação de proteínas em *trypanosoma cruzi***. Orientador: Maurilio José Soares. 2018. 134 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Paraná, 2018.
- BATISTA, D. R. **Estudo dos receptores purinérgicos em células gliais do gânglio da raiz dorsal**. Orientador: Antônio Carlos Cassola. 2008. 21 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008..
- BEZERRA, R. J. S. **Triagem de extratos vegetais e fúngicos de diferentes biomas para identificação de antagonistas do receptor P2X7**. Orientador: Luiz Anastacio Alves; Valber da Silva Frutuoso. 2012. 201 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.
- BOMFIM, C. C. B. **Papel do receptor P2X7 na modulação da resposta imune pulmonar induzida por micobactérias hipervirulentas**. Orientadora: Maria Regina D'Império Lima. 2014. 24 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2014.
- CAPPATO, M. S. **Caracterização dos mecanismos de transporte associados ao receptor p2x7 em macrófagos**. Orientador: Pedro Muanis Persechini. 2012. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.
- CARVALHO, L. C. F. **Efeito de ectonucleotidases de *Leishmania* sobre a produção de IL-1 β em células dendríticas**. Orientador: Luís Carlos Crocco Afonso. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
- CIMMINO, A. *et al.* Cyclopaldic acid, seiridin, and sphaeropsidin A as fungal phytotoxins, and larvicidal and biting deterrents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): structure-activity relationships. **Chemistry & biodiversity**, v.10, ed. 7, p. 1239-1251, 12 jul. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cbdv.201390007>. Acesso em: 18 jun. 2021

DAINA, A. *et al.* SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **SCIENTIFIC REPORTS**, Suíça, p. 1-13, 3 mar. 2017.

DANVAZO, G. G. **Inflamassoma NLRP3 como um possível mecanismo na mediação de déficits funcionais na hipertensão: efeitos do treinamento aeróbio**. Orientadora: Lisete Compagno Michelini. 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2016.

DIAS, L. P. **Adenosina Trifosfato (ATP) na criopreservação de sêmen suíno**. Orientador: Carine Dahl Corcin. 2017. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, China, v. 7, ed. 2, p. 83-89, 29 jan. 2019.

FERREIRA, D. N. M. **Estudo Estrutural de Parte do Domínio M2 do Receptor P2X7 Humano**. Orientador: Luiz Anastácio Alves. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

FERREIRA, L. G. B. **Poros formados pelos receptores p2x7 e trpv1: eventos comuns em macrófagos peritoneais de camundongos?**. Orientador: Prof. Luiz Anastacio Alves. 2014. 138 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

GUZMÁN, E. *et al.* Spongatriol Inhibits Nuclear Factor Kappa B Activation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. **Marine Drugs**, Florida, v. 11, p. 1140-1151, 2 apr. 2013.

HATTORI, M.; GOUAUX, G. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. **Nature**, Portland, v. 485, n. 7397, p. 207–212, 10 nov. 2012.

JESUS, E. M. de. **Adaptação e avaliação de triagem virtual em arquiteturas paralelas híbridas**. Orientador: Marcos Ennes Barreto. 2016. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

KARASAWA, A.; KAWATE, T. **5U2H**: Crystal structure of the ATP-gated P2X7 ion channel bound to ATP and allosteric antagonist A804598. 30 nov. 2016. Homepage: <https://www.rcsb.org/>. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/5U2H>. Acesso em: 24 out. 2021.

KASUYA, G. *et al.* Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. **Nature Communications**, Tokyo, v. 8, n. 876, p. 1-10, 12 oct. 2017.

KASUYA, G.; HATTORI, M.; NUREKI, O. **5XW6**: Crystal structure of the chicken ATP-gated P2X7 receptor channel in the presence of competitive antagonist TNP-

ATP at 3.1 Angstroms. 29 jun. 2017. Homepage: <https://www.rcsb.org/>. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/5XW6>. Acesso em: 24 out. 2021.

KOPP, R. *et al.* P2X7 Interactions and Signaling – Making Head or Tail of It. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, Bordeaux, v. 12, n. 183, p. 1-25, ago. 2019.

LARA, R. *et al.* P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. **Frontiers in Pharmacology**, New York, v. 11, n. 793, p. 1-30, 4 jun. 2020.

MENDES, C. E. **Estudo do efeito dos antagonistas do receptor P2X7 e panexina-1 nas células Gliais entéricas no protocolo de isquemia e reperfusão intestinal.** Orientadora: Patricia Castelucci. 2017. 46 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2017.

MORADI, M. *et al.* Toxicity Assessment of Asteraceae Centaurea Repens L Extract in Mice. **Iranian journal of pharmaceutical research**, Iran, v. 16, ed. 3 p. 1071–1079, 2017.

PICCIRILLO, E; AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 662-677, 8 mar. 2018.

RAZZAGHI-ASL, N. *et al.* Identification of COX-2 inhibitors via structure-based virtual screening and molecular dynamics simulation. **Elsevier**, Irã, v. 83, p. 138-152, aug. 2018.

ROGER, S. *et al.* Understanding the roles of the P2X7 receptor in solid tumour progression and therapeutic perspectives. **Elsevier**, Boulevard Tonnellé, v. 1848, Ed. 10, p. 2584-2602, out. 2015.

SANTOS-FILHO, N. A. **Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A2 ácida tóxica isolada da peçonha de Bothrops moojeni.** Orientador: Andreimar Martins Soares. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas De Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

SILVA, F. D. **Docking molecular para determinação de fármacos com maior afinidade aos alvos candidatos para o tratamento de adenocarcinoma gástrico.** Orientadora: Prof. PhD Fabiana Alves. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da informação aplicada à biologia computacional) – Faculdades Promove, Belo Horizonte, 2018.

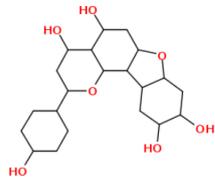
SOARES, R. F. **Estudos in silico do comportamento dinâmico do receptor p2x7 humano.** Orientador (es): Ernesto Raúl Caffarena; Pedro Celso Nogueira Teixeira. 2015. 139 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

SOUZA, V. C. **Avaliação do perfil de resposta imune e da expressão dos receptores P2X7, P2Y11, e A2A na forma indeterminada da doença de chagas.** Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal. 2016. 139 f. Tese (Doutorado em

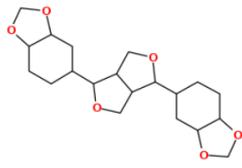
ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

TAMAJUSUKU, A. S. **Expressão e funcionalidade do receptor p2x7 em linhagem de glioma de camundongo GL261**. Orientador: Guido Lenz. 99 f. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ANEXO A – Estrutura das moléculas que se enquadraram dentro dos parâmetros da regra dos 5 de Lipinski e demais regras de drogabilidade



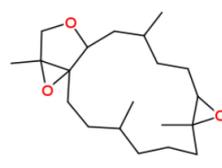
africano 1458



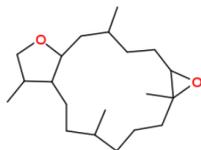
africano 1649



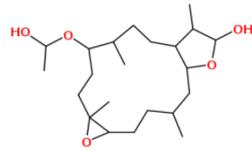
africano 3847



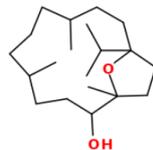
africano 125



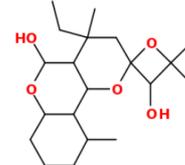
africano 123



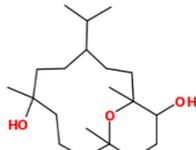
africano 80



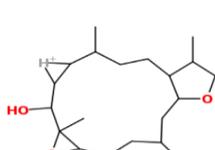
africano 124



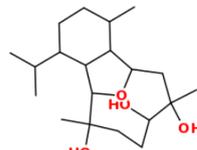
africano 5671



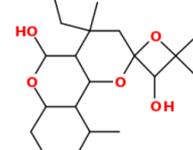
africano 142



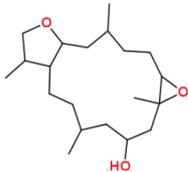
africano 126



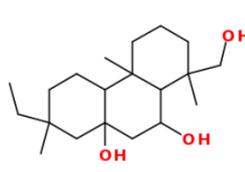
africano 104



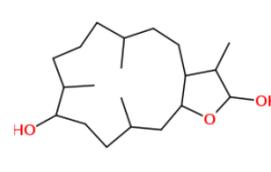
africano 5670



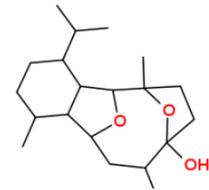
africano 127



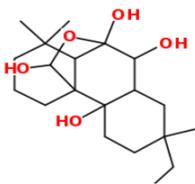
africano 4963



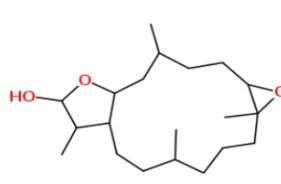
africano 83



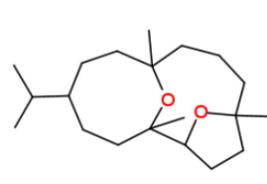
africano 102



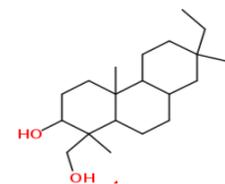
africano 4974



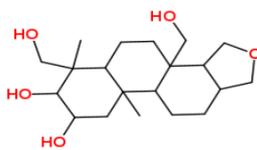
africano 122



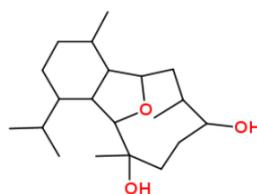
africano 141



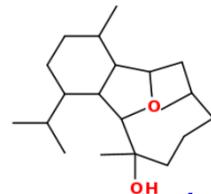
africano 5006



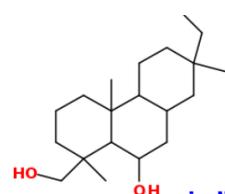
africano 1349



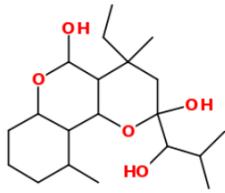
africano 105



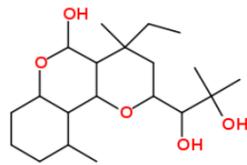
africano 112



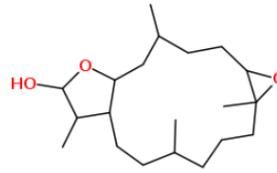
africano 4964



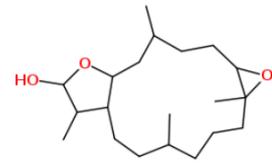
africano 5672



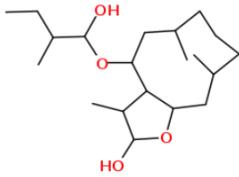
africano 5666



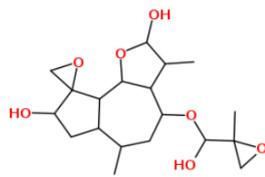
africano 137



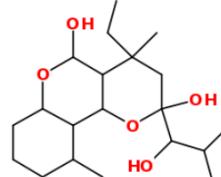
africano 89



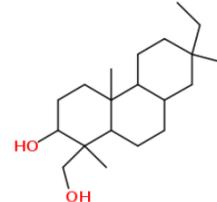
africano 5504



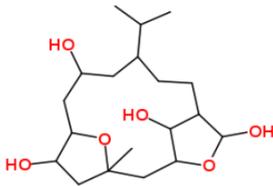
africano 5363



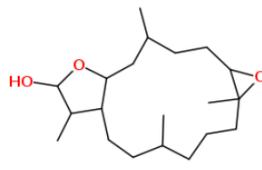
africano 5664



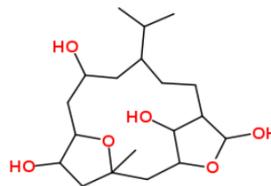
africano 5005



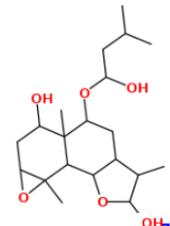
africano 118



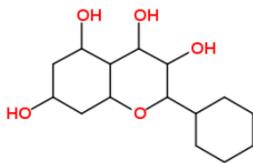
africano 115



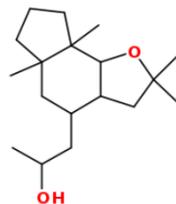
africano 119



africano 6151



africano 3432



africano 3667

Fonte – Molinspiration (2021).