

# PROTEÍNA G E DESOMORFINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL HUMANO: UM ESTUDO TEÓRICO POR SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

<sup>1</sup>Leonel Có

<sup>2</sup>Aluísio Marques da Fonseca

## Resumo

Este artigo explora as proteínas G, uma família crucial de proteínas transmembranares que desempenham um papel vital na transmissão de sinais intracelulares, especialmente no sistema nervoso central humano. Age como mediadoras entre neurotransmissores e respostas celulares, modulando processos fisiológicos essenciais, incluindo a transmissão sináptica e a excitabilidade neuronal. Também são discutidos os perigos da desomorfina, conhecido como "krokodil", um poderoso derivado de opioides em relação à morfina. Seu uso está associado a danos teciduais graves, infecções e necroses específicas, o que lhe conferiu o apelido de "droga dos zumbis". Uma abordagem hipotética chamada "droga dos zumbis, K9" é apresentada, entretanto atenuar seus efeitos contraditórios ao antagonizar seletivamente os receptores opioides específicos ligados à desomorfina. É enfatizada a necessidade de investigações aprofundadas, ensaios clínicos rigorosos e estudos pré-clínicos para desenvolver alternativas seguras à desomorfina, considerando a interação com as proteínas G e outros componentes do sistema nervoso central. Este trabalho busca contribuir para uma melhor compreensão dessa droga altamente prejudicial e oferecer perspectivas para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais seguras e eficazes, destacando a importância da segurança e eficácia na busca de soluções para os desafios por essa substância.

**Palavras-chave:** canabinoides, neurotransmissão, opioides

---

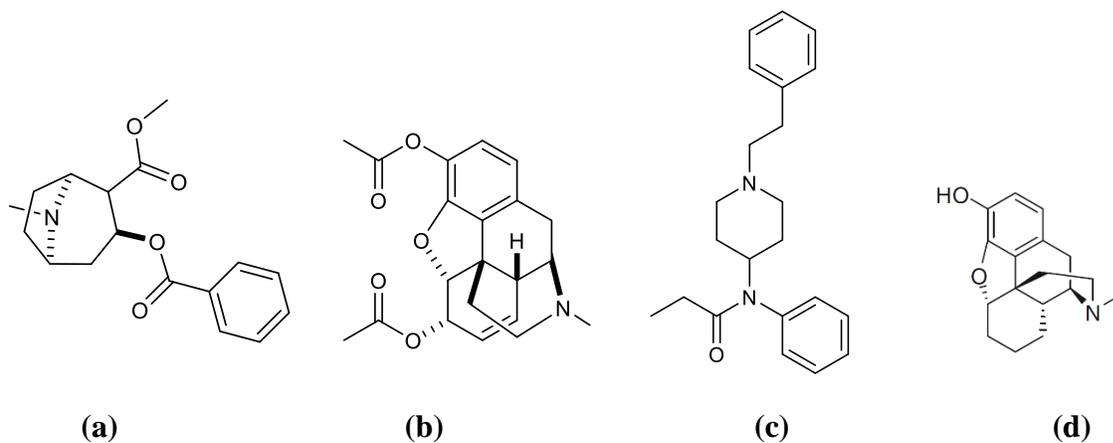
<sup>1</sup> Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Curso de Licenciatura em Química, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Sob a orientação do Prof. Aluísio Marques da Fonseca.

<sup>2</sup>Discente do curso de Licenciatura em Química pela UNILAB.

## 1. INTRODUÇÃO

O termo "droga" tem sua origem no idioma holandês, onde "droog" significa folha seca, referindo-se à matéria-prima composta por folhas de vegetais utilizadas em diversas formulações de medicamentos (Schulz et al., 2004). Substâncias comuns como entorpecentes e psicotrópicos são aquelas capazes de causar dependência física ou psíquica, atuando diretamente no sistema nervoso central (Preuss et al., 2023). No contexto brasileiro, o termo "droga" é utilizado para descrever qualquer substância capaz de modificar a função dos organismos vivos, resultando em mudanças comportamentais (Krawczyk et al., 2015). Este termo pode ser associado também a entorpecentes, devido ao seu potencial de alteração significativa no comportamento e na saúde mental dos indivíduos (Balbino, 2014).

Entre as várias drogas, uma em particular, a droga denominada K9, destaca-se por ser uma substância sintética recente que imita os efeitos da maconha, sendo muito mais potente devido à mistura de outras substâncias, como cocaína, heroína, fentanil e desomorfina (Townsend et al., 2021) (Figura 1a-1c).



**Figura 1.** Estrutura química de: (a) cocaína; (b) heroína, (c) fentanil e (d) desomorfina.

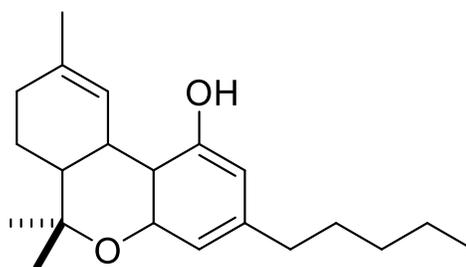
Seus efeitos colaterais são extremamente altos e se manifestam rapidamente, podendo levar à dependência química e causar danos ao cérebro. Maconha é o nome dado no Brasil a uma espécie vegetal chamada *Cannabis sativa*, como mostra a Figura 2<sup>a</sup> (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=227047383>) (exsicata # FURB53209, com registro de coleta em 04/07/2017). Essa planta contém

uma substância psicoativa chamada delta-9-tetraidrocanabinol (Figura 2b), e contém aproximadamente 400 substâncias químicas, das quais pelo menos 60 são alcaloides conhecidos como canabinoides (OLIVEIRA, 2019).

**Figura 2.** (a) Espécie *Canabis sativa*; (b) Estrutura do THC.



(a)



(b)

Além da maconha natural, os canabinoides sintéticos ganham popularidade. São também conhecidas popularmente como drogas K (K2, K4, K9) e representam o mais recente avanço das drogas sintéticas (Mills et al., 2015; Walsh & Andersen, 2020). Os canabinóides sintéticos têm uma camada de ligação com os receptores CB1 e CB2 presentes no corpo humano, principalmente no cérebro, e seus efeitos adversos são resultantes da ativação máxima desses receptores (Palladini, 2023).

Esses receptores canabinoides têm um papel crucial no corpo humano e são acoplados à proteína G, habilitados na detecção de sinais extracelulares (Zou & Kumar, 2018). O receptor CB1 é o mais abundante acoplamento à proteína G, encontrado no sistema nervoso central (Silva & Moura, 2022). Os testes farmacodinâmicos de compostos encontrados em algumas misturas de K9 detalham o receptor canabinoide CB1 em variedades de grandeza, superiores à hierarquia do  $\Delta^9$ -THC encontrado no cultivo natural da *Cannabis sativa* (Cardoso, 2023; Lima et al., 2021).

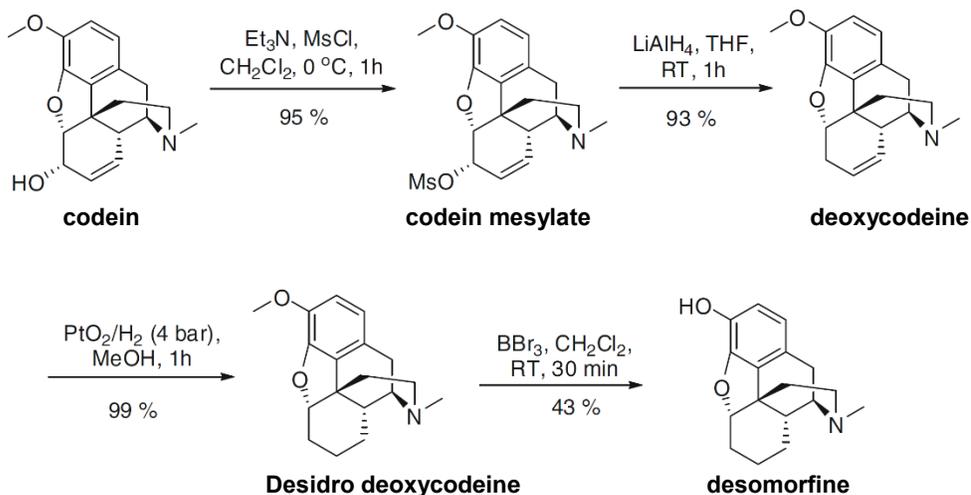
Para compreender a ação do K9, é essencial entender o papel das proteínas G. As proteínas G são uma família de proteínas transmembranares que desempenham um papel crucial na

transmissão de sinais intracelulares em diversas células, incluindo o sistema nervoso central humano (Rehman et al., 2023). Elas atuam como mediadoras entre os neurotransmissores e as respostas celulares (Hodo et al., 2020), facilitando processos fisiológicos essenciais, como a transmissão sináptica, modulação da excitabilidade neuronal e regulação do desenvolvimento e plasticidade neuronal (Schiöth & Fredriksson, 2005). No entanto, seu uso está associado a efeitos adversos graves, como danos teciduais graves, infecção grave e, em alguns casos, necrose localizada na pele, conferindo-lhe o apelido de "droga dos zumbis" (Liu et al., 2018; Young e outros, 2012).

Os efeitos adversos clínicos relatados sobre o uso da droga K9 são variados. No sistema nervoso central, destacam-se convulsões, recuperação, irritabilidade, perda de consciência, ansiedade, confusão e paranóia (Kennedy & Lhatoo, 2008). No sistema cardiovascular, foram observados casos de taquicardia, hipertensão, dor no peito e isquemia cardíaca (Kim & Park, 2019). No sistema metabólico, o uso da droga pode causar hipocalcemia e hiperglicemia (Reber et al., 2019). No sistema gastrointestinal, pode provocar náusea e vômito (Zhong et al., 2021). Além disso, no sistema nervoso independente, há possibilidade de febre e midríase (Alves et al., 2012; Kennedy & Lhatoo, 2008). Os alvos importantes na detecção dessa droga no organismo fazem parte da proteína G.

Estruturalmente, o principal componente da droga K9 é o alcaloide desomorfinina (Figura 3) que é um derivado de opioides, também conhecido como “krokodil” (van Kempen et al., 2020). Sua síntese tem como material de partida a morfina, que é convertida na codeína, onde o grupo hidroxila no carbono 6 e a ligação dupla entre os carbonos 7 e 8 passam a ser reduzidos. Esses dados foram obtidos a partir de uma patente de 1934 nos EUA (Small, 1934). Já a propriedade tradicional da desomorfinina inicia-se a partir da  $\alpha$ -clorocodina, obtida pela consequência entre cloreto de tionila e codeína. Por meio de uma evidência de oxirredução, a  $\alpha$ -clorocodina é convertida em diidrodesoxicodina, que, ao sofrer uma metilação, resulta na desomorfinina, como mostra o esquema 1 (MURPHY; BECHMANN; BARRETT, 2023; SRIMURUGAN et al., 2012). Embora tenha alguma camada pelos receptores opioides no sistema nervoso central, seu mecanismo de ação é complexo e ainda não é completamente compreendido. Sabe-se que a desomorfinina pode depender das proteínas G, já que os receptores opioides estão ligados a essa classe de proteínas (PASTERNAK; PAN, 2013).

### Esquema 1. Síntese da desomorфина a partir da codeína.



Dada a gravidade dos efeitos das drogas como K9 por um dos seus princípios ativos, a desomorфина, é crucial desenvolver novos medicamentos. Visando assim, antagonizar seletivamente os receptores opioides específicos envolvidos na ligação da desomorфина, e dessa forma, minimizando assim seus efeitos adversos (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012).

O desenvolvimento de novos medicamentos exige uma investigação rigorosa e aprofundada sobre a interação das substâncias com as proteínas G e outros componentes do sistema nervoso central. Ensaio clínico rigoroso e estudos pré-clínicos são fundamentais para avaliar a eficácia e segurança de qualquer nova droga, incluindo aqueles que podem ser desenvolvidos como alternativas à desomorфина.

Os estudos *in silico* são uma ferramenta promissora nesse contexto e podem ser realizados via simulação computacional com referência ao experimento biológico, a fim de medir a força de ligação e comparar a semelhança da molécula que apresentou maior superfície com os fármacos já conhecidos e utilizados. O princípio deste modelo de estudo é que compostos com estruturas semelhantes devem se comportar de forma semelhante (Alves et al., 2023).

Esses estudos computacionais estão cada vez mais avançados. Além de estar se tornando cada vez mais uma alternativa para auxiliar no estudo de novas drogas, utilizando softwares para simulação, entre eles o docking molecular (MENG et al., 2012). Esta técnica utiliza a estrutura em 3D de duas moléculas (ligante e alvo) para prever a melhor posição e conformação do complexo mais estável (AGU et al., 2023).

O presente trabalho teve como o objetivo Verificar os possíveis mecanismos de ação dessa droga K9, fazer investigação de estudos *in silico* para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes, explorar a proteína G para encontrar alternativas mais seguras de tratamento para pessoas afetadas por essa droga.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Detalhes Computacionais**

Todas as simulações foram realizadas usando códigos livres para uso acadêmico em um sistema operacional de 64 bits. Os seguintes códigos foram usados: AutoDock Tools™ (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012), AutoDockVina™ (TROTT; OLSON, 2010b), Avogadro™ (<http://avogadro.cc/>) (HANWELL et al., 2012), Discovery studio visualizer™ viewer (BIOVIA, 2016), Marvin™ 19.8, 2020 (<http://www.chemaxon.com>) (CSIZMADIA, 2019), Pymol (De Lano, 2020) e UCSF Chimera™ (PETTERSEN et al., 2004).

### **2.2 Preparação e otimização de ligantes**

Os ligantes utilizados na simulação foram obtidos pelo repositório de moléculas PubChem ( <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> ). As estruturas obtidas em 3D foram submetidas posteriormente a configurações de auto-otimização foi aplicado o campo de força MMFF94S (Wahl et al., 2019), para gerar conformações bioativas por minimização de conformadores gerados aleatoriamente, com algoritmo Steepest Descente (Petrova & Solov'Ev, 1997), Step per Update 4 (Sutton et al., 2016), pelo software AVOGADRO® (Hanwell e outros, 2012). Todos os arquivos com ligantes foram convertidos para os formatos correspondentes (.mol2 e .pdbqt ) com a adição de estados de ionização e tautoméricos em pH 7,4 usando o software OpenBabel ver. 3.0.0 (O'Boyle et al., 2011).

### **2.3 Procedimentos gerais do docking molecular**

Para estudos de docking molecular, foram selecionados os dois receptores acoplados à proteína G, OX 1 e OX 2, ativados pelos neuropeptídeos OX-A e OX-B. Esta orexina é um excelente ponto de partida para otimização por meio de design racional baseado em estrutura, sendo considerada um alvo promissor para o estudo do compartimento de fármacos (Rappas et al., 2020). Para obter as coordenadas tridimensionais da proteína, foram utilizados os dados

disponíveis no repositório Protein Data Bank-RCSB ( <https://www.rcsb.org/> ). A estrutura da proteína (PDB-codex 6TP3) foi resolvida por difração de raios X, sendo o cristal obtido com resolução de 3,04 Å (R-Value Free: 0,230, R-Value Work: 0,205 e R-Value Observed: 0,207, respectivamente), sendo classificada como uma proteína de membrana do organismo *Homo sapiens*, sendo expressa no sistema *Spodoptera frugiperda*. A proteína foi co-cristalizada com inibidor de [(2~{S})-2-(6-cloranil-7-metil-1~{H}-benzimidazol-2-il)-2-metil-pirrolidin-1-il]-[5-metoxi-2-(1,2,3-triazol-2- il)fenil ]metanona (NS2).

Para realizar as simulações de docking molecular, foi escolhido o Algoritmo Genético Lamarkiano – LGA, implementado no código AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010a). Para determinar o espaço de simulação, a caixa de grade foi centralizada para abranger todas as cadeias de proteínas. A caixa de grade foi centralizada nas coordenadas -26.593036, 17.896018 e -17.194127 para os eixos x, y e z, respectivamente, e tinha parâmetros de tamanho 25Å(x), 25Å(y) e 25Å(z).

Como critérios para a preparação da estrutura da proteína, moléculas de água foram removidas, enquanto cargas de Gasteiger e átomos de hidrogênio essenciais foram adicionados (Yan et al., 2014). A preparação foi realizada usando o código ADT- AutoDocktools (Morris et al., 2009).

Para obter um conjunto de dados maior, para todas as simulações (docking e redocking) foram realizadas 50 simulações independentes, sendo possível obter 20 poses por simulação. O critério de exaustividade igual a 64 foi utilizado para melhorar o refinamento parcial dos cálculos de acoplamento individuais (MARINHO et al., 2020). A estrutura da proteína foi mantida rígida, enquanto todas as ligações e torções dos ligantes foram ajustadas para girar (Nguyen et al., 2017).

Para validação estatística das simulações, foram realizados procedimentos de redocking e avaliados os valores de RMSD (Root Mean Square Deviation), tendo como parâmetro de escolha da Melhor Pose valores menores que 2 Å (YUSUF et al., 2008).

Para avaliar a estabilidade do complexo (proteínas/ligante) foi utilizado como parâmetro a energia de afinidade, que possui valores de parâmetros de idealidade abaixo de -6,0 kcal/mol (Shityakov & Förster, 2014).

Para avaliar a força da ligação de H, foram utilizados os valores das distâncias entre os átomos doador e receptor, sendo classificadas como Fortes, as interações que estavam entre 2,5 Å e 3,1 Å, Médias aquelas que estavam entre 3,1 Å e 3,55 Å, e Fracas aquelas com distância maior

que 3,55 Å (IMBERTY et al., 1991). Para validar as simulações, foi realizada a técnica de redocking no ligante cocrystalizado, ácido 2-(4-metoxi-3-fenil- fenil) etanoico. Além do ligante de referência, os fármacos obtidos do PubChem (Tabela 1) foram submetidos aos mesmos critérios e condições de simulação.

## 2.4 Cálculos MM/GBSA

As energias da mecânica molecular combinadas com a solvatação generalizada do contínuo de Born e da área de superfície MM/GBSA foram calculadas por MolAICal (Bai et al., 2021), com base no arquivo de log MD do software NAMD (PHILLIPS et al., 2005). O MM/GBSA foi estimado pelas equações 1, 2 e 3.

$$\text{Eq. 1} \quad \Delta G_{\text{ligação}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S$$

$$\text{Eq. 2} \quad \Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{interno}} + \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdw}}$$

$$\text{Eq. 3} \quad \Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{GB}} + \Delta G_{\text{SA}}$$

Onde  $\Delta E_{\text{MM}}$ ,  $\Delta G_{\text{sol}}$ , e  $T\Delta S$  representam a energia da fase gasosa MM, energia livre de solvatação (soma da contribuição polar  $\Delta G_{\text{GB}}$  e contribuição não polar  $\Delta G_{\text{SA}}$ ) e entropia conformacional, respectivamente.  $\Delta E_{\text{MM}}$  contém energia de Van Der Waals  $\Delta E_{\text{vdw}}$ , eletrostática  $\Delta E_{\text{ele}}$  e  $\Delta E_{\text{interna}}$  de energias de ligação, ângulo e diedro. Se não houver mudanças estruturais induzidas por ligação no processo de simulações de dinâmica molecular (MD), o cálculo de entropia pode ser omitido.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

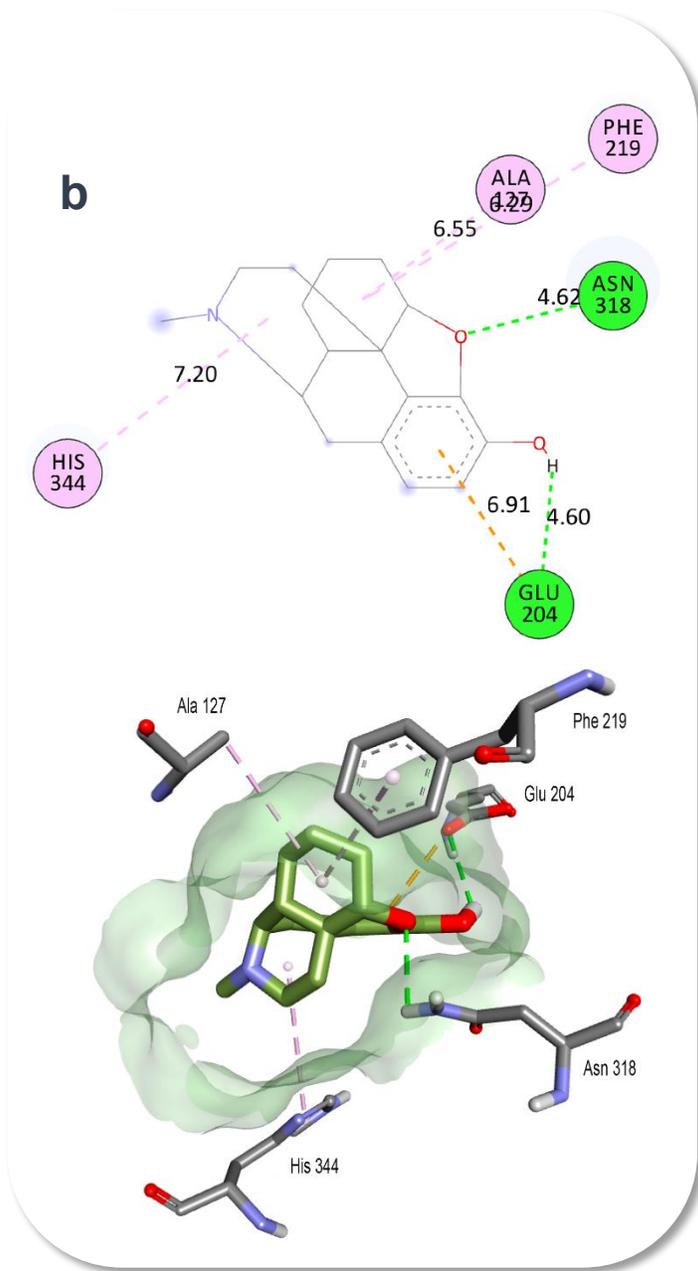
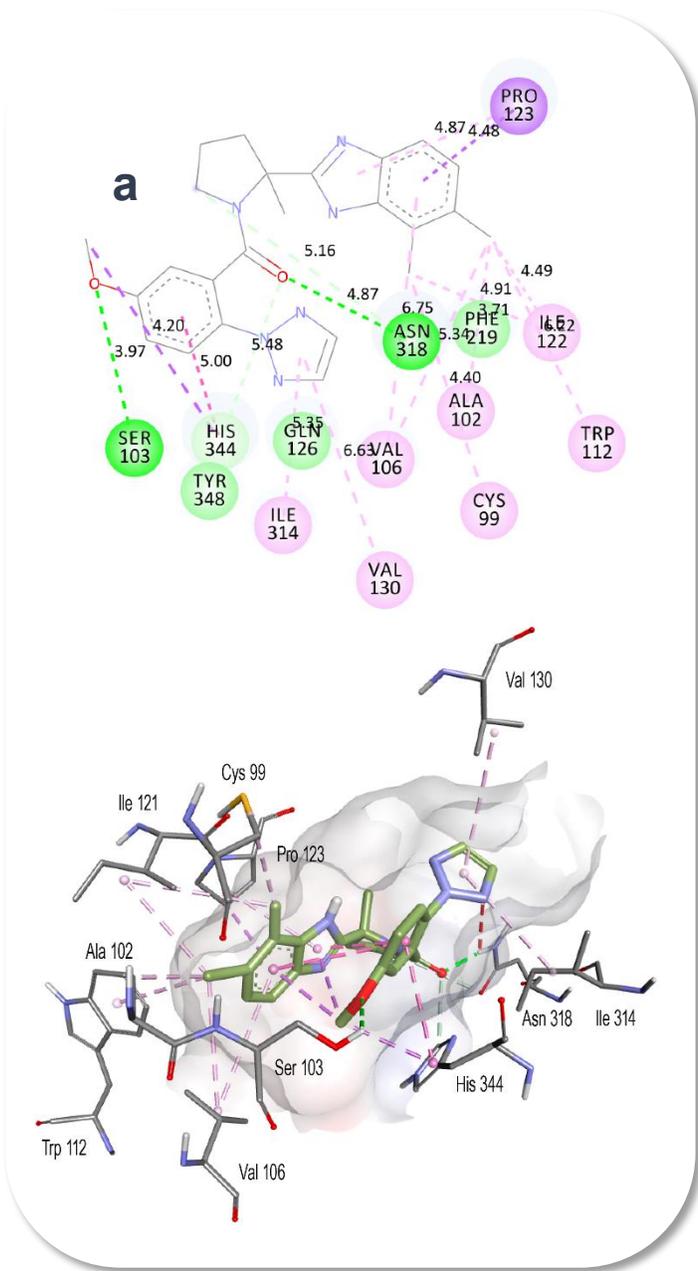
#### 3.1 Interação com resíduos de proteínas

K9 forneceu no docking molecular um RMSD de 1,8 Å, com uma energia de afinidade de -8,1 kcal/mol, interagindo na mesma região da ligante nativa, conforme mostrado na Figura 3. Com interações robustas, K9 apresentou duas ligações de hidrogênio intramolecularmente nos resíduos Glu 204 e Asn 318. Foi observada uma interação hidrofóbica do tipo alquil com Phe 219, His 344 e Ala 127 e também uma interação de empilhamento Pi com Glu 204, que fazem parte da região ativa da proteína (RAPPAS et al., 2020). O ligante nativo, utilizado como referência positiva na pesquisa, apresentou as interações polares representadas por duas ligações de hidrogênio nos resíduos Asn 318 e Ser 103. Além disso, apresentou muitas interações hidrofóbicas do tipo alquila com Ile 122, Trp 112, Ala 102, Cys 99, Val, 106, Val 130 e Ile 314. Além dessas interações, foram observadas ligações de hidrogênio de carbono nos resíduos Tyr 348, His 344, Gln 126 e Phe 219. Finalizando com uma interação do tipo Pi-sigma no resíduo Pro 123. Todos esses detalhes são mostrados na tabela 1 e Figuras 3a-b.

**Tabela 1.** Dados do acoplamento molecular.

Ligantes	Afinidade energética (kcal/mol)	RMSD (Å)
Ligante nativo	-9,7	1.9
K9	-8,1	1.8

**Figura 3.** ( a ) 2D e 3D das interações entre a estrutura mais promissora (ligante nativo) e (b) os resíduos K9 e proteína.



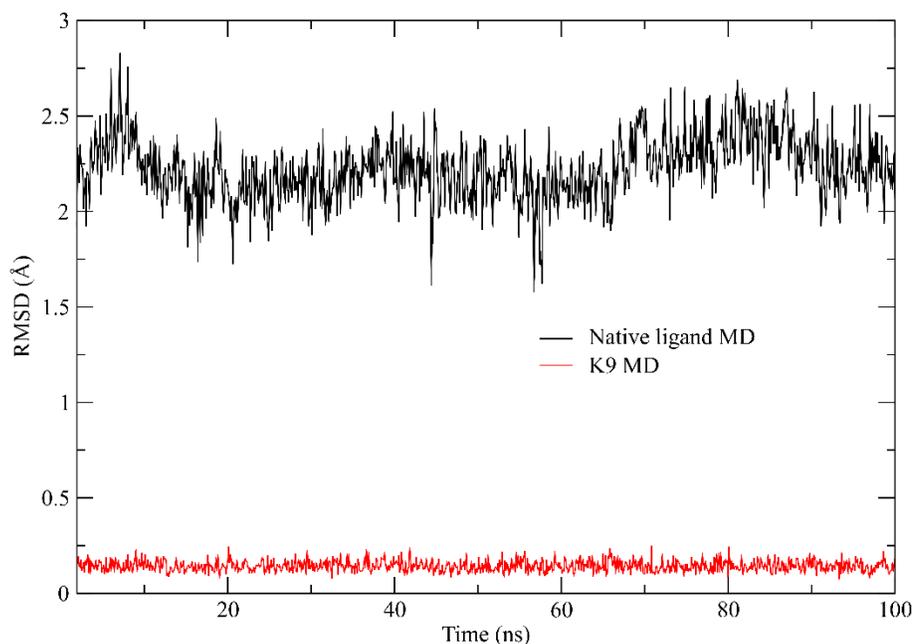
## 3.2 DINÂMICA MOLECULAR

### 3.2.1. Análise RMSD

Foi observado que os ligantes estudados foram corretamente acomodados no sítio catalítico da proteína *G* (Han et al., 2023; Kudla & Przewlocki, 2021). Assim, por meio dos complexos proteína-ligante (Figura 4), foram realizados estudos de simulação para avaliar não apenas as mudanças conformacionais da proteína, mas também sua estabilidade após cada mudança conformacional. O Root Mean Square Deviation (*RSMD*) dos complexos receptor-ligante foi usado para avaliar a extensão em que as mudanças conformacionais ocorreram na molécula estudada durante o tempo de simulação. A Figura 4 mostra os comportamentos *RSMD* dos complexos estudados no estágio de equilíbrio.

Após a análise dos valores de energia, outros parâmetros importantes para investigar a qualidade da dinâmica molecular são o Root Mean Square Deviation (RMSD) da proteína (backbone) para K9 e ligante nativo (NS2). Os valores de RMSD obtidos pelo backbone da proteína ao longo dos MDs estão entre 0,1 e 2,3 Å. No MD com o ligante K9, o perfil foi de 0,1 a 0,15 Å relativamente muito confortável, permanecendo estável desde o início da simulação. Logo após o MD da referência, o ligante NS2 apresentou uma situação de adequação de 10 ns até um sistema mais favorável durante a trajetória de 100, apresentando um RMSD médio de 2,2 Å, conforme mostrado na Figura 4.

**Figura 4.** Perfil do valor RMSD obtido para proteína *G* (com NS2, linha preta) e MD com K9 (linha vermelha).



### 3.2.2 Análise RMSF

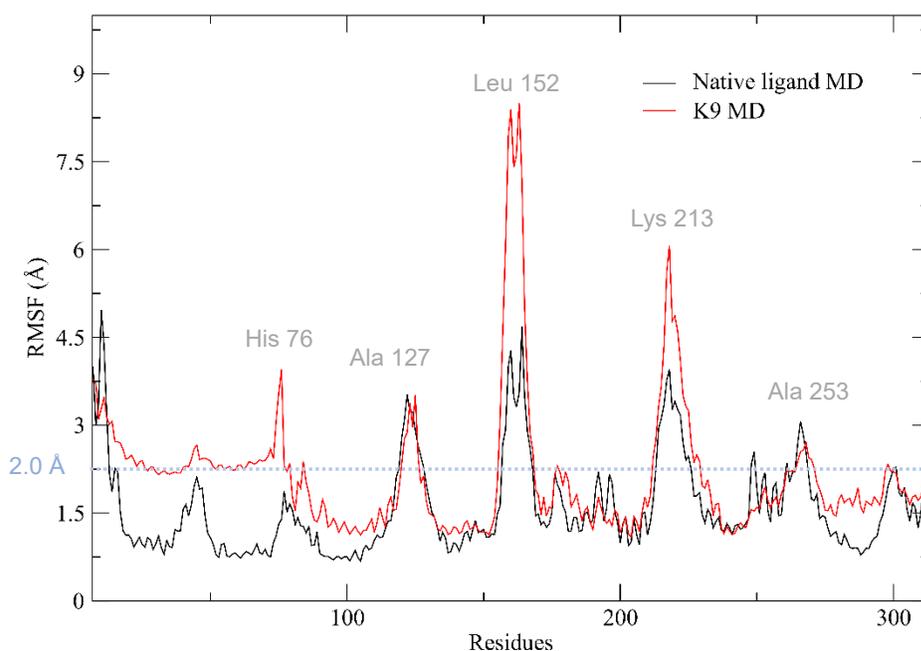
A Root Mean Square Fluctuation (RMSF) é um parâmetro relacionado à flexibilidade de resíduos de proteínas individuais. Ela serve para avaliar qualitativamente a progressão da dinâmica molecular (Dong et al., 2018). Considerando a Figura 5, um perfil semelhante de valores de RMSF é observado independentemente do ligante em contato.

Nossa análise completa de RMSF forneceu uma compreensão profunda da dinâmica e estabilidade de cada resíduo de proteína ao longo dos 100 nanossegundos de simulação. Os resultados delineiam as interações primordiais nos complexos investigados, destacando especialmente os ligantes K9 e NS2. Os resultados delineiam mudanças conformacionais substanciais ao longo da simulação.

As descobertas do nosso estudo revelam um novo aspecto da dinâmica molecular, com flutuações consistentes observadas nas trajetórias de todos os complexos. Essas flutuações se correlacionam notavelmente com resíduos de replicação importantes, conforme discutido anteriormente em estudos de (Qin et al., 2021) e (Roe & Brooks, 2020). Curiosamente, apenas os complexos entre K9 e a proteína G exibiram valores de RMSF ligeiramente superiores a 2,0 Å para os resíduos His 76, Ala 127, Leu 152 e Lys 213, adicionando uma dimensão única à nossa pesquisa. Já para o ligante nativo (NS2), as flutuações importantes com RMSF acima de 2,0 Å dos resíduos Ala 127, Leu 152, Lys 213 e Ala 253 são formadas.

Portanto, apesar das flutuações observadas, nossos resultados afirmam a estabilidade satisfatória das estruturas em uma solução aquosa. As conformações derivadas das simulações MD, intrinsecamente associadas a vários ligantes por meio de técnicas de aninhamento, oferecem insights inestimáveis sobre os modos de ligação de pequenas moléculas em diferentes estados de dobramento enzimático. Esta aplicação prática de nossa pesquisa é ainda mais elucidada por (Thirumalai et al., 2020), ressaltando sua relevância no mundo real.

**Figura 5.** Perfil do valor RMSF obtido para polimerase em MD com K9 (linha vermelha), MD com NS2 (linha preta).



### 3.2.3 Ligações de hidrogênio

A estabilidade de complexos proteína-ligante, um tópico de interesse duradouro em bioquímica, tem sido associada há muito tempo a ligações intermoleculares de hidrogênio. No entanto, um estudo recente de Müller (2017) trouxe uma nova perspectiva para esse campo, particularmente no contexto de complexos proteína-ligante. Este estudo, que utilizou simulações de dinâmica molecular, revelou novos insights que eram anteriormente inexplorados.

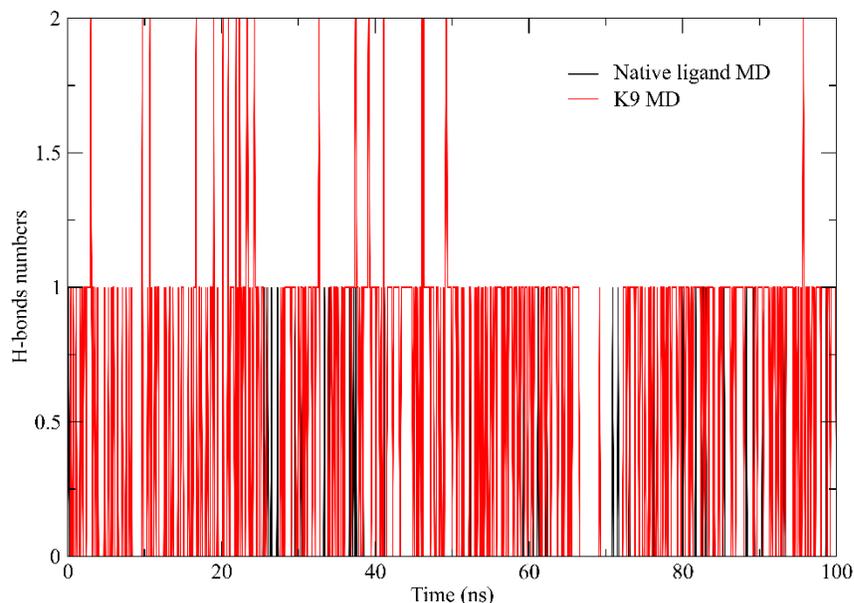
O estudo focou principalmente na formação de ligações intermoleculares de hidrogênio entre ligantes e proteínas durante as fases de equilíbrio e produção. A Figura 6 descreve vividamente as flutuações nas redes de ligações de hidrogênio durante esses estágios, ressaltando a importância de entender as variações na formação dessas ligações.

A quebra de ligações de hidrogênio indicou mudanças na estabilidade, frequentemente atribuídas a interações como Van der Waals ou forças hidrofóbicas, conforme destacado por Ferenczy & Kellermayer, (2022). Além disso, a análise revelou uma correlação direta entre o

comprimento das cadeias de carbono dos ligantes e o número médio de ligações, corroborando insights de estudos anteriores sobre acoplamento molecular. Uma revelação fundamental deste estudo foi a diferenciação entre processos dinâmicos (dinâmica molecular) e estáticos (acoplamento molecular) (Gioia et al., 2017). Enquanto o acoplamento molecular oferece informações valiosas sobre interações estáticas, simulações de dinâmica molecular capturam a evolução dinâmica desses complexos, fornecendo uma compreensão mais abrangente de sua estabilidade.

O número de ligações de hidrogênio (H-Bond) encontradas durante MDs, considerando o valor máximo de 3,3 Å, Tabela 4. Pode-se observar que MD com K9 apresenta até 2 ligações de hidrogênio por quadro e vários quadros com duas ligações de hidrogênio. Sobre MD com ligante nativo de referência NS2, há apenas alguns quadros com uma ligação de hidrogênio. Portanto, pode-se inferir que tanto o NS2 quanto o K9 tendem a interagir com a proteína G, tornando-se um possível mecanismo de interação e maior estabilidade do que o K9. Nos resíduos identificados com ligações H ao longo da dinâmica molecular, observa-se a recorrência dos resíduos Asn 318, demonstrando assim um potencial de interação tanto do K9, quanto da interação entre a proteína G e o NS2.

**Figura 6.** Número de ligações de hidrogênio (ligação H) encontradas entre o opioide de proteína G e MD com NS2 (linha preta) e MD com K9 (linha vermelha) com software VMD, considerando o comprimento máximo de 3,3 Å.

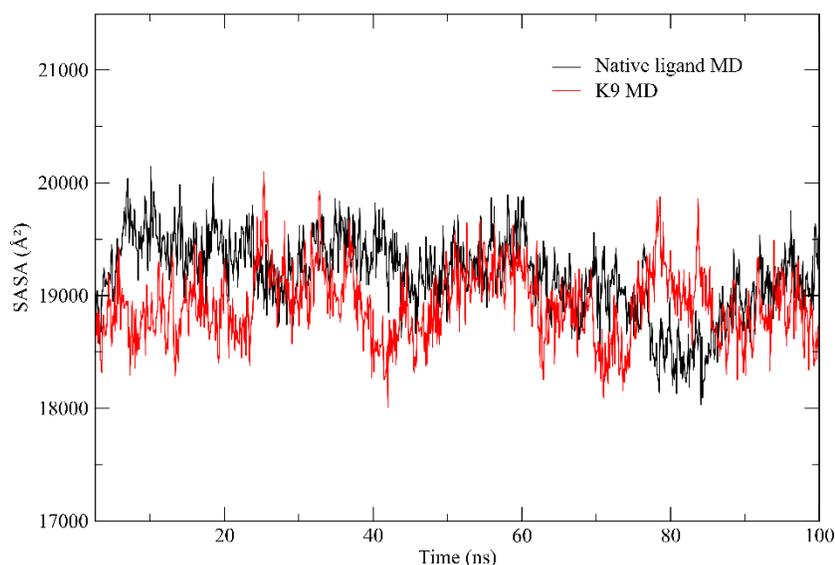


### 3.2.4. Área de superfície acessível ao solvente

A Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) é definida como a área de superfície de uma proteína que interage com suas moléculas de solvente (Mazola et al., 2015). Os valores médios de SASA para complexos NS2 e K9 livres foram monitorados durante simulações de MD de 100 ns. Os traços para a área de superfície acessível ao NS2 na Figura 7 mostram um aumento acentuado dentro de 80-100 ns, indicando relaxamento estrutural, o que favorece maior solvência no sistema (Marsh & Teichmann, 2011). Os traços para a área de superfície acessível ao K9 na Figura 7 mostram uma diminuição acentuada dentro de 93-100ns, indicando compressão estrutural, mostrando uma redução no processo solvatativo e tornando o sistema mais instável (Lins et al., 2003). Os valores médios de SASA para complexos NS2 e K9 livres foram encontrados em 19.100 Å<sup>2</sup> e 18.780 Å<sup>2</sup>, respectivamente. Não houve nenhuma mudança importante observada nos valores de SASA devido à ligação de ligantes. Após esse tempo, os valores flutuam em torno de um valor constante. Portanto, assumimos que os tempos de simulação de 100 ns foram suficientes para a amostragem de sistemas equilibrados. O SASA mais alto é encontrado para as moléculas de proteína G com os íons monovalentes estabilizadores. A execução sem íons

monovalentes mostra uma grande flutuação, enquanto os sistemas com maiores concentrações de íons têm áreas menores e podem estar encolhendo sob a influência da carga da superfície, produzindo estruturas de proteína mais compactas. Uma inspeção mais aprofundada dos dados demonstra que a flutuação ou "respiração" da superfície relaxada é principalmente devido a uma flutuação do SASA da área C-terminal flexível.

**Figura 7.** Área de superfície acessível ao solvente (SASA) da proteína *G* como uma função do tempo das simulações MD: MD com K9, estabilizando íons monovalentes (linha vermelha) e MD com NS2, estabilizando íons monovalentes (linha preta). As curvas são médias de execução dos dados brutos com uma janela de 100 ns.



### 3.3 Cálculos MM/GBSA

Após balancear a dinâmica de produção, a amostragem das etapas foi realizada de 5 em 5, seguindo o intervalo de amostragem de 10ns da metodologia para estimativa da variação de energia livre usando múltiplas trajetórias. Os cálculos de MMGBSA foram realizados em um campo de solvente implícito simulando uma solução salina 0,15M.

Embora formalmente o cálculo da variação da energia livre nesta técnica passe pela análise da entropia a partir dos modos normais das equações do sistema 4, 5 e 6, na prática esse cálculo não foi feito.

$$\text{Eq. 4} \quad \Delta A_{interaction}^{(vac)} = (E_{complex}^{MM} - E_{target}^{MM}) - (E_{complex}^{MM} - E_{ligand}^{MM}) + T\Delta S_{NORMODS}$$

$$\text{Eq. 5} \quad \Delta A_{interaction}^{(vac)} = E_{complex}^{MM} - E_{target}^{MM} - E_{complex}^{MM} + E_{ligand}^{MM} + T\Delta S_{NORMODS}$$

$$\text{Eq.6} \quad \Delta A_{interaction}^{(vac)} = E_{ligand}^{MM} - E_{target}^{MM} + T\Delta S_{NORMODS}$$

Cálculos de modos normais são muito demorados e computacionalmente custosos. Esse tipo, em última análise, torna os cálculos de triagem virtual, que são o foco deste estudo, não totalmente impossíveis. No entanto, há uma razão mais importante. Foi demonstrado que os cálculos de entropia diminuem a correlação dos valores de afinidade previstos com valores experimentais quando a análise é feita com alguns microestados amostrados das trajetórias (Hou et al., 2011; Rastelli et al., 2009). Como as limitações de tempo de cálculo são essenciais, incluir esses cálculos no procedimento não é encorajado.

As energias MM/GBSA são consideradas uma forma de estimar a energia livre para o estudo *in silico* de ligantes em complexos de proteínas (Genheden & Ryde, 2015). Elas são tipicamente baseadas em simulações MD e trazem precisão entre pontuação empírica e perturbação alquímica estrita (Chen et al., 2018). Como na entropia conformacional, é difícil obter um valor concorrente. Principalmente, se os ligantes não têm nenhuma mudança estrutural induzida por ligação em simulações MD, a entropia conformacional é geralmente ignorada para calcular pela análise de modo padrão (Wang et al., 2018). O MolAICal forneceu uma maneira rápida de avaliar a energia livre de ligação sem a entropia do ligante com base na abordagem de três trajetórias. A decomposição da energia de interação usando o método MMGBSA (Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area) forneceu insights detalhados sobre as contribuições energéticas dos complexos receptor-ligante. Conforme descrito na Tabela 2, os cálculos de energia livre revelaram descobertas significativas em relação à estabilidade e afinidade de ligação desses complexos. O ligante de referência para o complexo NS2/proteína G demonstrou inicialmente uma estimativa de energia livre de -21,98 kcal/mol. O complexo K9/proteína G mostrou uma energia livre ligeiramente mais favorável de -24,17 kcal/mol, indicando uma afinidade de ligação mais forte.

Essa diferença sutil, porém crucial, na energia livre destaca a estabilidade aprimorada do complexo K9/proteína G, particularmente ao longo da trajetória da dinâmica molecular de 100 ns.

A estabilidade aumentada do complexo K9 sugere um potencial para maior eficácia, possivelmente devido à sua capacidade de induzir ou estabilizar conformações específicas dentro do receptor opioide, levando à dependência química. Essa observação ressalta a importância das mudanças conformacionais induzidas por ligantes no receptor, que podem desempenhar um papel fundamental na modulação da função do receptor e influenciar as vias de sinalização a jusante.

**Tabela 2.** Dados de estimativa de energia livre de K9 e NS2 contra proteína G.

<b>Complexo</b>	<b><math>\Delta E</math> ( eletrostático ) + <math>\Delta G</math> (sol)</b>	<b><math>\Delta E</math> (VDW)</b>	<b>Ligação <math>\Delta G</math> (kcal/mol)</b>	<b>Desvio padrão</b>
K9/ Proteína G	4,74	-28,91	-24,17	+/- 0,0182
NS2 /G-proteína	20,28	-42,26	-21,98	+/- 0,0469

#### 4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o estudo da droga K9 utilizando os métodos de docking e dinâmica molecular trouxe insights importantes sobre seu comportamento em relação à proteína G, receptora de opioides. A análise demonstrou que K9 apresenta uma interação estável e superficial significativamente alta com a proteína-alvo em comparação ao ligante de referência, NS2, indicando seu impacto potencial no sistema nervoso central. Essas descobertas não apenas reforçam a hipótese de que o K9 pode causar danos biológicos, mas também oferecem uma base sólida para futuros estudos que visem entender seu mecanismo de ação. Assim, os dados gerados podem servir como ponto de partida para o desenvolvimento de estratégias de mitigação e otimização de projetos voltados para minimizar os efeitos adversos de drogas no organismo humano, contribuindo para benefícios sociais e de saúde pública.

## 5. REFERÊNCIAS

- AGU, P. C. et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, v. 13, p. 13398, 17 ago. 2023.
- ALVES, A. D. O.; SPANIOL, B.; LINDEN, R. Canabinoides sintéticos: drogas de abuso emergentes. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 39, n. 4, p. 142–148, 2012.
- ALVES, M.; STREIT, L.; PIZZOLATO, T. Utilização de Modelos in Silico para Avaliação da Toxicidade de Resíduos de Agrotóxicos, Fármacos e Metabólitos em Águas Naturais. **Química Nova**, 2023.
- BAI, Q. et al. MolAICal: a soft tool for 3D drug design of protein targets by artificial intelligence and classical algorithm. **Briefings in bioinformatics**, v. 22, n. 3, p. 1–12, 2021.
- BALBINO, M. A. **Estudo do comportamento eletroquímico do 9-tetraidrocanabinol derivatizado com Fast Blue B**. Doutorado em Química—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 29 out. 2014.
- BIOVIA, D. S. **Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego**. Dassault Systèmes, 2016.
- CARDOSO, R. **Droga K9: O que é, efeitos colaterais e principais riscos. Exame Toxicológico**, 11 out. 2023. Disponível em: <<https://www.exametoxicologico.com.br/droga-k9/>>. Acesso em: 29 jan. 2024
- CHARLES V. PREUSS; ARUN KALAVA; KEVIN C. KING. **Prescription of Controlled Substances: Benefits and Risks**. University of South Florida: StatPearls, 2023.
- CHEN, F. et al. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 8. Predicting binding free energies and poses of protein-RNA complexes. **RNA**, v. 24, n. 9, p. 1183–1194, 2018.
- CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web**. 2019.
- DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.** , 2020.
- DONG, Y. W. et al. Structural flexibility and protein adaptation to temperature: Molecular dynamics analysis of malate dehydrogenases of marine molluscs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 6, p. 1274–1279, 2018.
- FERENCZY, G. G.; KELLERMAYER, M. Contribution of hydrophobic interactions to protein mechanical stability. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 1946–1956, 2022.
- GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449–461, 2015.

GIOIA, D. et al. Dynamic docking: A paradigm shift in computational drug discovery. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–21, 2017.

HAN, J. et al. Ligand and G-protein selectivity in the  $\kappa$ -opioid receptor. **Nature**, v. 617, n. 7960, p. 417–425, 2023.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, dez. 2012.

HODO, T. W. et al. Critical Neurotransmitters in the Neuroimmune Network. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1869, 21 ago. 2020.

HOU, T. et al. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 1, p. 69–82, 2011.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. **The Scripps Research Institute Molecular**, v. 32, 2012.

IMBERTY, A. et al. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.

KENNEDY, G. M.; LHATOO, S. D. CNS Adverse Events Associated with Antiepileptic Drugs. **CNS Drugs**, v. 22, n. 9, p. 739–760, 1 set. 2008.

KIM, S. T.; PARK, T. Acute and Chronic Effects of Cocaine on Cardiovascular Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 584, 29 jan. 2019.

KRAWCZYK, N.; FILHO, C. L. V.; BASTOS, F. I. The interplay between drug-use behaviors, settings, and access to care: a qualitative study exploring attitudes and experiences of crack cocaine users in Rio de Janeiro and São Paulo, Brazil. **Harm Reduction Journal**, v. 12, p. 24, 6 ago. 2015.

KUDLA, L.; PRZEWLOCKI, R. Influence of G protein-biased agonists of  $\mu$ -opioid receptor on addiction-related behaviors. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 4, p. 1033–1051, 2021.

LIMA, A. A. DE; ALEXANDRE, U. C.; SANTOS, J. S. O uso da maconha (*Cannabis sativa* L.) na indústria farmacêutica: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e46101219829–e46101219829, 13 set. 2021.

LINS, L.; THOMAS, A.; BRASSEUR, R. Analysis of accessible surface of residues in proteins. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 12, n. 7, p. 1406–1417, jul. 2003.

LIU, L. et al. Newly Emerging Drugs of Abuse and Their Detection Methods: An ACLPS Critical Review. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 149, n. 2, p. 105–116, 29 jan. 2018.

MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104365, nov. 2020.

MARSH, J. A.; TEICHMANN, S. A. Relative solvent accessible surface area predicts protein conformational changes upon binding. **Structure (London, England: 1993)**, v. 19, n. 6, p. 859–867, 8 jun. 2011.

MAZOLA, Y. et al. A comparative molecular dynamics study of thermophilic and mesophilic  $\beta$ -fructosidase enzymes. **Journal of Molecular Modeling**, v. 21, n. 228, p. 1–11, 2015.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2012.

MILLS, B.; YEPES, A.; NUGENT, K. Synthetic Cannabinoids. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 350, n. 1, p. 59–62, jul. 2015.

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

MÜLLER, I. Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 73, n. 2, p. 1–14, 2017.

MURPHY, P. B.; BECHMANN, S.; BARRETT, M. J. Morphine. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

NGUYEN, D. D. et al. Rigidity Strengthening: A Mechanism for Protein-Ligand Binding. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 7, p. 1715–1721, 2017.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An Open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 10, p. 1–14, 2011.

OLIVEIRA, T. DROGAS PSICOTRÓPICAS E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL. p. 14, 2019.

PALLADINI, M. C. Indicação do uso de canabinoides. **Brazilian Journal Of Pain**, 2023.

PASTERNAK, G. W.; PAN, Y. X. Mu opioids and their receptors: Evolution of a concept. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 4, p. 1257–1317, 2013.

PETROVA, S. S.; SOLOV'EV, A. D. The Origin of the Method of Steepest Descent. **Historia Mathematica**, v. 24, n. 4, p. 361–375, 1997.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, 2004.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005.

QIN, X.; ZHONG, J.; WANG, Y. A mutant T1 lipase homology modeling, and its molecular docking and molecular dynamics simulation with fatty acids. **Journal of Biotechnology**, v. 337, n. February, p. 24–34, ago. 2021.

RAPPAS, M. et al. Comparison of Orexin 1 and Orexin 2 Ligand Binding Modes Using X-ray Crystallography and Computational Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 1528–1543, 27 fev. 2020.

RASTELLI, G. et al. Binding estimation after refinement, a new automated procedure for the refinement and rescoring of docked ligands in virtual screening. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 73, n. 3, p. 283–286, 2009.

REBER, E. et al. Management of Refeeding Syndrome in Medical Inpatients. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 12, p. 2202, 13 dez. 2019.

REHMAN, S.; RAHIMI, N.; DIMRI, M. Biochemistry, G Protein Coupled Receptors. Em: **StatPearls [Internet]**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2023.

ROE, D. R.; BROOKS, B. R. A protocol for preparing explicitly solvated systems for stable molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**, v. 153, n. 5, p. 1–9, 2020.

SCHIÖTH, H. B.; FREDRIKSSON, R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 1–2, p. 94–101, 15 maio 2005.

SCHULZ, V. et al. **Rational Phytotherapy: A Reference Guide for Physicians and Pharmacists**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, 2014.

SILVA, DIEGO DENIZ; MOURA, CLARICE DE CARVALHO VELOSO. Farmacologia e Toxicologia dos Canabinoides Sintéticos, “Drogas Emergentes”, e os seus Impactos na Saúde Pública. 29 jul. 2022.

SMALL, L. F. **Morphine derivative and processes for its preparation**. Charlottesville, [s.d.].

SRIMURUGAN, S. et al. A facile and improved synthesis of desomorphine and its deuterium-labeled analogue. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 143, n. 1, p. 171–174, 1 jan. 2012.

SUTTON, R. S.; MAHMOOD, A. R.; WHITE, M. An emphatic approach to the problem of off-policy temporal-difference learning. **Journal of Machine Learning Research**, v. 17, p. 1–29, 2016.

THIRUMALAI, D.; LORIMER, G. H.; HYEON, C. Iterative annealing mechanism explains the functions of the GroEL and RNA chaperones. **Protein Science**, v. 29, n. 2, p. 360–377, fev. 2020.

TOWNSEND, E. A. et al. A drug-vs-food “choice” self-administration procedure in rats to investigate pharmacological and environmental mechanisms of substance use disorders. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 354, p. 109110, 15 abr. 2021.

TROTT, O.; OLSON, A. NIH Public Access. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010a.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010b.

VAN KEMPEN, E. E. J.; BOSWINKEL, W. A.; BRAND, H. S. [Effects of krokodil (desomorphine) use on oral health]. **Nederlands Tijdschrift Voor Tandheelkunde**, v. 127, n. 1, p. 13–17, jan. 2020.

WAHL, J. et al. Accuracy evaluation and addition of improved dihedral parameters for the MMFF94s. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2019.

WALSH, K. B.; ANDERSEN, H. K. Molecular Pharmacology of Synthetic Cannabinoids: Delineating CB1 Receptor-Mediated Cell Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6115, 25 ago. 2020.

WANG, C. et al. Recent developments and applications of the MMPBSA method. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, n. 87, p. 1–18, 2018.

YAN, J. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 213–223, 2014.

YOUNG, A. C. et al. Cardiotoxicity associated with the synthetic cannabinoid, K9, with laboratory confirmation. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 7, p. 1320.e5–7, set. 2012.

YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2008.

ZHONG, W. et al. Mechanisms of Nausea and Vomiting: Current Knowledge and Recent Advances in Intracellular Emetic Signaling Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5797, 28 maio 2021.

ZOU, S.; KUMAR, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 833, 13 mar. 2018.