



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

LUANA CAMILLA CORDEIRO BRAZ

INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DA INTERAÇÃO DO MONOTERPENO
4-TERPINEOL COM O RECEPTOR GABA_A

SUMÉ-PB

2016

LUANA CAMILLA CORDEIRO BRAZ

**INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DA INTERAÇÃO DO MONOTERPENO
4-TERPINEOL COM O RECEPTOR GABA_A**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Trindade Maia

SUMÉ - PB

2016

B827i Braz, Luana Camilla Cordeiro.
Investigação in silico da interação do monoterpeno 4-terpineol com o receptor GABA_A. / Luana Camilla Cordeiro Braz. – Sumé – PB: [s.n], 2016.

82 f.

Orientador: Professor Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega.
Co-Orientador: Professor Dr. Rafael Trindade Maia.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Campina Grande.
Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido. Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Aminoácido GABA. 2. Modelagem comparativa. 3. Bioinformática. 4. Epilepsia. 5. Psicofarmacologia. I. Título.

CDU: 60(043.1)

LUANA CAMILLA CORDEIRO BRAZ

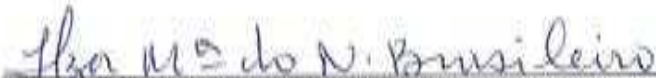
**INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DA INTERAÇÃO DO MONOTERPENO
4-TERPINEOL COM O RECEPTOR GABA_A**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA



Professor Dr. Franklin Ferreira de Farias Nobrega
UAEB/CDSA/UFCG
Orientador



Professora Dr^a. Iza Maria do Nascimento Brasileiro
UATEC/CDSA/UFCG
Examinadora



Professora Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento
UAEB/CDSA/UFCG
Examinadora

Trabalho aprovado em 19 de outubro de 2016.

SUMÉ - PB

**À minha querida família,
meus pais Socorro e Francisco
e meus irmãos Liliane e Lucas,
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por guiar meus passos possibilitando concluir mais essa etapa;

À minha mãe, Maria do Socorro Cordeiro de Araújo Braz, pelo exemplo de mulher guerreira que se tornou minha inspiração de vida, por todo amor, carinho e cuidado todos os anos de minha vida; por ter me compreendido, apoiado e aconselhado principalmente nas etapas mais difíceis dessa jornada;

A meu pai, Francisco de Assis Braz, pelo exemplo de pai carinhoso e amoroso comigo e com meus irmãos; pelas calorosas recepções a cada chegada minha e por ter suportado a saudade e permitido, sempre, que eu buscasse meu próprio caminho, mesmo que isso me levasse para um local distante;

À minha irmã, Liliane Karine Cordeiro Braz, por ter sido minha amiga e companheira, pela compreensão nos meus momentos de estresse e nos que estive mais afastada; minha irmãzinha mais nova que cresceu e, hoje, é meu motivo de orgulho;

A meu irmão, Anderson Lucas Cordeiro Braz, sempre hiperativo, porém se mantendo quieto (não tão facilmente) nas horas que precisei de concentração; por todo carinho e amor, demonstrado à sua maneira, nos períodos que estou em casa;

A toda a minha família, por todo o incentivo, em especial minha madrinha e segunda mãe, Judite Barbosa de Araújo, e minha tia, Helena Cordeiro de Araújo;

Aos Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega e ao Prof. Dr. Rafael Trindade Maia pela orientação acadêmica e na elaboração deste trabalho, sanando minhas dúvidas e instigando minha curiosidade científica, permitindo a condução desta pesquisa;

A Prof^a. Dra. Ilza Maria do Nascimento Brasileiro e a Prof^a. Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento, membros da banca examinadora, pelas importantes contribuições no aprimoramento deste trabalho;

Agradeço, também, aos demais professores que me orientaram em projetos de iniciação científica, Dr. Demerson Sanglard (Universidade Federal de Minas Gerais), PhD.

João Almeida (Universidade Nova de Lisboa) e Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos (Embrapa Algodão), por despertarem meu interesse pela pesquisa, instigando o raciocínio crítico e a busca do conhecimento e contribuindo enormemente na minha formação acadêmica;

Aos professores e funcionários do CDSA/UFCG, sem os quais não seria possível a conclusão desse curso, pelas contribuições de cada um para minha formação profissional, acadêmica e pessoal;

Aos professores e funcionários da FCT/UNL, pelo acolhimento no meu período de graduação sanduíche e pelas importantes contribuições à minha formação; aos colegas portugueses, Sara Pereira e Nelson Lima, pelo acolhimento em sua universidade;

À equipe e funcionários da Embrapa Algodão, pelo acolhimento, apoio, companheirismo e amizade, em especial: Terezinha, Marília, Nina, Silmara, Fátima e Carliane.

Às minhas amigas-irmãs, Rosilândia Almeida e Izabela Campos, pelos cinco anos de convivência diária, pela amizade, por todo apoio nas alegrias e nas dificuldades; Rose, agradeço a ti toda compreensão, todos os momentos bem humorados, todos os bons conselhos; Bel, obrigada pela amizade e por ter contribuído imensamente para o meu amadurecimento.

Aos amigos, Anderson Steyner, Fagner Oliveira, Thalita Neves, Débora Tavares e Renato Guimarães, por terem compartilhado comigo conversas, noites de estudo, trabalhos de equipe, dias de laboratório, eventos e festas, acompanhando de perto e caminhando em conjunto durante essa jornada, cada um conquistou seu lugar especial;

A Sendy Alves, Jessika Bandeira e Ozires Lima, pela amizade, pelos bons momentos e boas conversas e pelo apoio, principalmente, nesta etapa final; a todos os demais amigos da Turma Biotec 2011.1 que se manteve unida, apesar das discussões, durante todos esses anos de graduação; nossa caminhada é longa, mas todos merecemos e chegaremos à linha de chegada;

Às minhas amigas, sempre próximas e sempre distantes, Gersia Gonçalves e Júlia Carmona, por todas as conversas, pela compreensão dos meus dilemas e dramas e pelos momentos únicos e especiais compartilhados; Gersia, minha amiga e parceira científica,

obrigada por caminhar junto comigo desde nossa iniciação científica e por ter acompanhado, desde então, todas as etapas, desafios e conquistas na minha vida pessoal e acadêmica; Júlia, minha amiga e parceira mochileira, nós vivemos momentos únicos em terras distantes, obrigada por ter me acolhido, como a uma irmã, numa das fases mais especiais e mais desafiadoras de minha vida, e por manter até hoje esse vínculo especial de amizade;

Agradeço, também, a Fábio Barbosa, pelo carinho, amizade e apoio; a Vinicius Costa Amador pela amizade e pela disponibilidade a responder, prontamente, dúvidas na execução da metodologia deste trabalho; a Darlyson Guimarães, que se tornou um amigo e parceiro desde nossos trabalhos no laboratório do CDSA;

Às minhas amigas, mais que especiais, Erineide Sousa, Eliana Alves e Hevillyane Lima, por compreenderem minha ausência durante esse período de graduação, por manterem vivo nosso vínculo de amizade e por continuarem compartilhando comigo momentos especiais e etapas importantes das nossas vidas;

A Nádson Ricardo e Karla Menezes, pela amizade, por terem sido extremamente compreensivos e prestativos nestas últimas semanas dedicadas, quase integralmente, à escrita deste trabalho e por esses últimos meses de agradável convivência que me permitem considerar o ap. 23 do Edifício Alvorada, meu segundo lar;

Por fim, agradeço às cidades de Sumé, Lisboa e Campina Grande, onde vivi, aprendi e amadureci nos últimos anos.

“If you want to change the world in some big way, that’s where you should start – biological molecules.”

Bill Gates

"O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

Considerando a lacuna atualmente existente nos tratamentos da Epilepsia, que são ineficazes em 30% dos casos, é necessária a busca de novos compostos. O monoterpeneo 4-terpineol (4TRP) demonstra ação anticonvulsivante, sendo um potencial fármaco antiepiléptico. O surgimento de novas ferramentas da Bioinformática e da Biologia Computacional tem possibilitado avaliar *in silico* prováveis interações entre biomoléculas, tais como candidatos a fármacos e proteínas-alvo. Vários anticonvulsivantes atuam por meio de receptores do ácido γ -aminobutírico (aminoácido GABA) e, além disso, o sistema GABAérgico constitui um dos principais alvos estudados na Psicofarmacologia. A partir do indicativo experimental da interação do 4TRP com essa via, este trabalho teve como objetivo contribuir no estudo dos mecanismos de ação do 4TRP por meio do *docking* molecular com modelos tridimensionais de receptores do GABA tipo A (GABA_ARs). As estruturas dos enantiômeros do 4TRP foram obtidas na ZINC Database e foram utilizadas estruturas dos GABA_ARs obtidas por meio de modelagem comparativa. As simulações de *docking* molecular foram realizadas pelo programa AutoDock 4.2 configurado para uso do algoritmo genético lamarckiano com os parâmetros padrão. Os complexos gerados foram ranqueados em ordem crescente de energia, selecionados os dez primeiros para cada *docking* e analisados no programa *Visual Molecular Dynamics*. Para o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, o (-)4TRP exibiu a menor energia livre de ligação de -6,25 kcal/mol, enquanto o (+)4TRP, -5,89 kcal/mol. Os melhores complexos sugeriram a interação do 4TRP na porção extracelular da subunidade $\gamma 2$, indicando um possível sítio de ligação. Em concordância com dados experimentais previamente existentes, o sítio mostrou-se diferente daquele dos benzodiazepínicos. No *docking* molecular com a subunidade δ , foram obtidas para o (-) e (+)4TRP menores energias livres de ligação de -6,06 e -5,94 kcal/mol, respectivamente. A subunidade $\gamma 2$ é expressa em seis subtipos do GABA_AR já identificados, enquanto a subunidade δ forma quatro subtipos extrassinápticos do receptor e, a partir desses resultados, espera-se a interação do 4TRP com esses subtipos. A interação *in silico* do 4TRP com os GABA_ARs, em conjunto com a evidência experimental da relação do fármaco com o sistema GABAérgico e da sua atividade anticonvulsivante indicam que um possível mecanismo de ação do 4TRP no sistema nervoso relaciona-se às subunidades $\gamma 2$ e δ dos GABA_ARs. Esses resultados poderão nortear futuros ensaios de investigação da ação do 4TRP e de outros anticonvulsivantes.

Palavras-chave: Aminoácido GABA. Modelagem comparativa. Bioinformática. Epilepsia. Psicofarmacologia.

ABSTRACT

Considering the current gap in Epilepsy treatments, which are ineffective in 30% of cases, it is necessary to search for new compounds. The monoterpeneoid terpinen-4-ol (4TRP) has demonstrated anticonvulsant activity, becoming a potential antiepileptic drug. The emergence of new tools from Bioinformatics and Computational Biology has made it possible to evaluate *in silico* interactions between biomolecules, such as drug candidates and target proteins. Several anticonvulsant drugs act through γ -aminobutyric acid receptors (GABA_ARs), the major inhibitory neurotransmitter in nervous system. In addition, the GABAergic system is one of the main targets studied in Psychopharmacology. There is an experimental evidence of the 4TRP interaction with this pathway. This work aimed to contribute to the study of the pharmacodynamics of 4TRP through molecular docking with three-dimensional models of the GABA_ARs. The 4TRP enantiomers structures were obtained from ZINC database. GABA_ARs models obtained by comparative modeling were used in the docking simulations. Those were performed by AutoDock 4.2 configured to use the Lamarckian Genetic Algorithm with default parameters. The generated complexes were ranked in order of increasing energy, selected the top ten for each docking and analyzed in Visual Molecular Dynamics. In the docking with the GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ subtype, (-)4TRP showed the lowest free binding energy of -6.25 kcal/mol. Whereas (+)4TRP had the lower free binding energy of -5.89 kcal/mol. The best complex showed the interaction of 4TRP with the $\gamma 2$ subunit extracellular portion. This suggests a putative binding site which is different from the benzodiazepine binding site, in accordance with existing experimental data. In the molecular docking with the δ subunit were obtained for (-) and (+) 4TRP lower free binding energies of -6.06 and -5.94 kcal/mol, respectively. The $\gamma 2$ subunit is expressed in six identified GABA_AR subtypes whereas the δ subunit forms four GABA_AR extrasynaptic subtypes. 4TRP is expected to interact with these subtypes. The 4TRP *in silico* interaction with GABA_ARs subtypes, as well as the experimental evidence of its relationship with the GABAergic pathway and its anticonvulsant activity indicates that a putative mechanism of action of 4TRP relates to the GABA_ARs $\gamma 2$ and δ subunits. These results will guide future research on 4TRP pharmacodynamics and other anticonvulsants.

Keywords: Terpinen-4-ol. γ -aminobutyric acid. Comparative modeling. Bioinformatics. Epilepsy. Psychopharmacology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécies vegetais cujo óleo essencial tem a presença do monoterpeneo 4-terpineol	26
Figura 2. Árvore filogenética dos genes identificados que codificam as subunidades constituintes dos GABA _A Rs	30
Figura 3. Níveis de organização na estrutura molecular de uma proteína	32
Figura 4. Representação da formação do complexo proteína-ligante no <i>docking</i> molecular	34
Figura 5. Visualização do modelo do GABA _A R subtipo $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no <i>Visual Molecular Dynamics</i>	37
Figura 6. Visualização primeiro resultado melhor ranqueado do <i>docking</i> do (-)-4-terpineol contra o modelo do GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no <i>Visual Molecular Dynamics</i>	45
Figura 7. Visualização dos <i>pockets</i> (sítios de ligação) previstos pelo GHECOM 1.0 (Rinaccess ≤ 3) na subunidade $\gamma 2$	45
Figura 8. Visualização dos complexos melhor ranqueados gerados no <i>docking</i> do (-)-4TRP com o receptor GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (primeiro <i>cluster</i>)	46
Figura 9. Visualização dos complexos melhor ranqueados gerados no <i>docking</i> do (+)-4TRP com o receptor GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (primeiro <i>cluster</i>)	46
Figura 10. Representação do sítio de ligação do (-)-4-terpineol com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no primeiro complexo do <i>rank</i>	47
Figura 11. Representação do sítio de ligação do (-)-4-terpineol com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no segundo complexo do <i>rank</i>	48
Figura 12. Representação do sítio de ligação do (-)-4-terpineol com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no terceiro complexo do <i>rank</i>	49
Figura 13. Representação do sítio de ligação do (+)-4-terpineol com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no primeiro complexo do <i>rank</i>	50

Figura 14. Representação do sítio de ligação do (+)-4-terpineol com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no segundo complexo do <i>rank</i>	51
Figura 15. Representação do sítio de ligação do (+)-4-terpineol com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no terceiro complexo do <i>rank</i>	52
Figura 16. Visualização no VMD do modelo obtido para a subunidade δ do GABA _A R.	54
Figura 17. Visualização primeiro resultado ranqueado do <i>docking</i> do (-)-4-terpineol contra o modelo da subunidade δ do GABA _A R no <i>Visual Molecular Dynamics</i>	61
Figura 18. Visualização dos <i>pockets</i> (sítios de ligação) previstos pelo GHECOM 1.0 no modelo da subunidade δ	61
Figura 19. Representação do sítio de ligação entre (-)-4-terpineol e subunidade δ no primeiro complexo do <i>rank</i>	62
Figura 20. Representação do sítio de ligação entre (-)-4-terpineol e subunidade δ no segundo complexo do <i>rank</i>	63
Figura 21. Representação do sítio de ligação entre (-)-4-terpineol e subunidade δ no terceiro complexo do <i>rank</i>	64
Figura 22. Representação do sítio de ligação entre (+)-4-terpineol e subunidade δ no primeiro complexo do <i>rank</i>	65
Figura 23. Representação do sítio de ligação entre (+)-4-terpineol e subunidade δ no segundo complexo do <i>rank</i>	66
Figura 24. Representação do sítio de ligação entre (+)-4-terpineol e subunidade δ no terceiro complexo do <i>rank</i>	67
Figura 25. Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias dos três tipos de subunidade γ humanos identificados	70
Gráfico 1. Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo teórico da subunidade δ	55
Gráfico 2. Gráfico de distribuição do QMEAN <i>Z-score</i>	56
Gráfico 3. Gráfico do <i>Z-score</i> global obtido no ProSA para o modelo da subunidade δ relacionado a estruturas depositadas no PDB	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estrutura química de alguns monoterpenos com atividade no Sistema Nervoso	25
Quadro 2. Estrutura química de compostos que atuam por meio de GABA _A Rs	28
Quadro 3. Estruturas tridimensionais dos ligantes utilizadas para simulação de <i>docking</i> molecular	36
Quadro 4. Resíduos a uma distância inferior a 4,0 Å do (-)-4-terpineol nos complexos com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ melhor ranqueados pelo AutoDock 4.2	43
Quadro 5. Resíduos a uma distância inferior a 4,0 Å do (+)-4-terpineol nos complexos com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ melhor ranqueados pelo AutoDock 4.2	44
Quadro 6. Resíduos a uma distância inferior a 4,0 Å do (-)-4-terpineol nos complexos com a subunidade δ melhor ranqueados pelo AutoDock 4.2	59
Quadro 7. Resíduos a uma distância inferior a 4,0 Å do (+)-4-terpineol nos complexos com a subunidade δ melhor ranqueados pelo AutoDock 4.2	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem relativa do monoterpeneo 4-terpineol na composição do óleo essencial de algumas espécies vegetais	25
Tabela 2. Lista dos genes identificados que codificam subunidades dos GABA _A Rs em <i>Homo sapiens</i> na base de dados de proteínas UniProtKB	29
Tabela 3. Resultado dos dez melhores complexos do (-)-4-terpineol com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	41
Tabela 4. Resultado dos dez melhores complexos do (+)-4-terpineol com o GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	42
Tabela 5. Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (-)4TRP no primeiro complexo do <i>rank</i>	47
Tabela 6. Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (-)4TRP no segundo complexo do <i>rank</i>	48
Tabela 7. Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (-)4TRP no terceiro complexo do <i>rank</i>	49
Tabela 8. Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (+)4TRP no primeiro complexo do <i>rank</i>	50
Tabela 9. Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (+)4TRP no segundo complexo do <i>rank</i>	51
Tabela 10. Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (+)4TRP no terceiro complexo do <i>rank</i>	52
Tabela 11. Resultado dos dez melhores complexos do (-)-4-terpineol com a subunidade δ	58
Tabela 12. Resultado dos dez melhores complexos do (+)-4-terpineol com a subunidade δ	59
Tabela 13. Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (-)4TRP no primeiro complexo do <i>rank</i>	62

Tabela 14. Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (-)4TRP no segundo complexo do <i>rank</i>	63
Tabela 15. Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (-)4TRP no terceiro complexo do <i>rank</i>	63
Tabela 16. Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (+)4TRP no primeiro complexo do <i>rank</i>	65
Tabela 17. Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (+)4TRP no segundo complexo do <i>rank</i>	66
Tabela 18. Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (+)4TRP no terceiro complexo do <i>rank</i>	67
Tabela 19. Menores energias livres de ligação estimadas nas simulações de <i>docking</i> molecular entre os diferentes enantiômeros do 4TRP e diferentes subunidades	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
4TRP	4-terpineol
DAE	Drogas antiepilépticas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA_AR	Receptor do ácido gama-aminobutírico tipo A
GHECOM	<i>Grid-based HECOMi finder</i>
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PRANK	<i>Probabilistic Alignment Kit</i>
ProSA	<i>Protein Structure Analysis</i>
QMEAN	<i>Qualitative Model Energy Analysis</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
UniProtKB	Base de dados de proteínas
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

\AA	Angstrom	Referente à unidade de medida
α	Alfa	Referente à subunidade dos GABA _A Rs
β	Beta	Referente à subunidade dos GABA _A Rs
γ	Gama	Referente à subunidade dos GABA _A Rs
δ	Delta	Referente à subunidade dos GABA _A Rs

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1 VISÃO GERAL SOBRE EPILEPSIA E TRATAMENTOS	23
3.2 DERIVADOS TERPENÓIDES	23
3.2.1 Monoterpeno 4-terpineol	24
3.3 RECEPTORES DO ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO	27
3.4 MODELOS TRIDIMENSIONAIS	31
3.5 DOCKING MOLECULAR	33
4 METODOLOGIA	36
4.1 ESTRUTURA DOS LIGANTES	36
4.2 MODELO TRIDIMENSIONAL DO GABA _A R ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$)	37
4.3 MODELAGEM DA SUBUNIDADE DELTA (δ)	38
4.4 BUSCA DE SÍTIOS ATIVOS	38
4.5 DOCKING MOLECULAR	39
4.6 ALINHAMENTO ENTRE SEQUÊNCIAS DAS SUBUNIDADES γ	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 DOCKING DO 4-TERPINEOL E O GABA _A R $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	41
5.1.1 Complexos com menor energia do (-)-4-terpineol e GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	47
5.1.2 Complexos com menor energia do (+)-4-terpineol e GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$	49
5.2 MODELO TEÓRICO DA SUBUNIDADE DELTA (δ)	54
5.3 DOCKING DO 4-TERPINEOL E SUBUNIDADE δ	58
5.3.1 Complexos com menor energia do (-)-4-terpineol e subunidade δ	62

5.3.2 Complexos com menor energia do (+)-4-terpineol e subunidade δ	64
5.4 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS SUBUNIDADES γ	69
6 CONCLUSÕES	72
7 PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICES	82

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais são uma potencial fonte de substâncias ativas e os benefícios de seu uso na medicina popular permitiram que muitos dos extratos ou substâncias purificadas fossem incorporados à terapêutica moderna (SOUZA *et al.*, 2009). Os terpenóides estão entre os principais componentes dos óleos essenciais de plantas aromáticas e têm apresentado diversas propriedades farmacológicas, inclusive com atividade demonstrada de vários monoterpenos no sistema nervoso central (SNC) (NÓBREGA, 2012). Isso tem despertado o interesse da comunidade científica no estudo dessas moléculas.

O monoterpeno álcool 4-terpineol (4TRP) é um metabólito secundário encontrado no óleo essencial de algumas espécies como *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (TIGHE; GAO; TSENG, 2013), *Croton argyrophylloides* Muell Arg (MORAIS *et al.*, 2006) e *Alpinia zerumbet* “Variegata” (MACEDO *et al.*, 2013). O 4TRP tem diversas atividades farmacológicas demonstradas como antimicrobiano (NINOMIYA *et al.*, 2013a), antioxidante (MORAIS *et al.*, 2006), anti-inflamatório (NINOMIYA *et al.*, 2013b) e antineoplásico (WU *et al.*, 2012).

No trabalho conduzido por Nóbrega e colaboradores (2014), foi demonstrada atividade anticonvulsivante do 4TRP por meio de ensaios comportamentais e eletrofisiológicos. Pôde-se inferir que essa atividade é relacionada direta ou indiretamente com a via de neurotransmissão mediada pelo ácido γ -aminobutírico (sistema GABAérgico), apresentando sítio de ligação diferente que o dos benzodiazepínicos.

Além disso, o 4TRP foi capaz de inibir significativamente a corrente através dos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) nos ensaios *in vitro* (NÓBREGA *et al.*, 2014). A relação com esses canais de sódio foi corroborada por meio de *docking* molecular *in silico* realizado por Kundaikar e colaboradores (2015), que revelou a ligação do 4TRP ao poro do canal Nav 1.2.

A partir desses resultados, observa-se que o 4TRP tem grande potencial de uso no tratamento de epilepsia, um conjunto de doenças resultantes de problemas na condução de impulsos elétricos no cérebro, normalmente tratada com drogas anticonvulsivantes. A epilepsia afeta de 0,5% a 1% da população, porém apenas 70% dos pacientes diagnosticados respondem bem aos tratamentos disponíveis (NINDS, 2016; WEBMD, 2016). Para o restante dos pacientes, as drogas atuais se mostram inefetivas ou apresentam muitos efeitos

indesejados, daí advém a grande necessidade de investigação de novos compostos (NÓBREGA *et al.*, 2014).

Entretanto, para comprovação do real potencial do 4TRP, muitos aspectos da farmacodinâmica dessa substância precisam ser melhor entendidos, bem como sua possível interação com o sistema GABAérgico e com os canais de sódio. A investigação do mecanismo de ação do 4TRP constitui, inclusive, uma estratégia para obtenção de um fármaco com menos efeitos adversos.

O ácido γ -aminobutírico (aminoácido GABA) prevalece no SNC como um neurotransmissor inibitório que medeia a maioria dos seus efeitos através dos canais de cloreto dependentes do GABA (GABA_AR) (HEVERS; LÜDDENS, 1998). Esses receptores, do tipo ionotrópico, são compostos por cinco subunidades idênticas ou homólogas envolvendo um canal seletivo para cloreto (Cl⁻) modulado pelo GABA. Os mesmos respondem a efeitos modulatórios de uma vasta gama de drogas como, por exemplo, os benzodiazepínicos (SIGEL; STEINMANN, 2012).

A partir da Biotecnologia Moderna, tem se tornado possível aprofundar os estudos envolvendo sistemas vivos focando-se em alterações a nível molecular. A Bioinformática é uma área de conhecimento em ascensão por disponibilizar ferramentas que permitem um detalhamento nos resultados que ainda não é possível por meio de ensaios laboratoriais e em intervalos de tempo mais curtos, são os chamados ensaios *in silico*.

Para prever *in silico* interações moleculares envolvendo biomoléculas, inicialmente é necessário ter o conhecimento de sua estrutura tridimensional. No caso de proteínas, essa estrutura pode ser obtida experimentalmente ou por modelagem comparativa com outra proteína homóloga, de estrutura tridimensional resolvida, que servirá como molde (JACKSON, 2003).

Quando conhecidas as estruturas, podem ser feitos ensaios de *docking* molecular com determinados ligantes, predizendo assim informações sobre afinidade, sítio de ligação e estrutura do complexo (JACKSON, 2003). De acordo com Guedes, Magalhães e Dardenne (2014), essa ferramenta é uma chave para o planejamento racional de fármacos, destacando-se nas pesquisas relacionadas à biotecnologia.

Este trabalho teve como objetivo utilizar de ferramentas como a modelagem por homologia e o *docking* molecular, para prever a interação do monoterpeneo 4-terpineol com receptores ionotrópicos GABA_AR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar ferramentas da Bioinformática de maneira a contribuir para o conhecimento do mecanismo de ação e possíveis sítios de ligação do monoterpeneo 4-terpineol, relacionados à sua atividade no sistema GABAérgico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar e construir modelos tridimensionais de diferentes subtipos e subunidades do receptor ionotrópico do ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_AR);
- Avaliar e validar o modelo tridimensional teórico da subunidade δ obtido por meio de modelagem comparativa;
- Com auxílio da ferramenta GHECOM (*Grid-based HECOMi finder*), fazer busca de possíveis sítios de ligação presentes no receptor;
- Realizar *docking* molecular semirrígido do GABA_AR, subtipo $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, com os dois enantiômeros do 4-terpineol;
- Simular *docking* molecular dos enantiômeros do 4-terpineol com a subunidade δ ;
- Analisar os resultados dos *dockings* com auxílio do programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD);
- Realizar alinhamento múltiplo de sequências para verificar a conservação de aminoácidos no provável sítio de ligação em outras subunidades dos GABA_ARs.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 VISÃO GERAL SOBRE EPILEPSIA E TRATAMENTOS

Epilepsia corresponde a um conjunto de desordens caracterizadas, principalmente, por uma tendência à apresentação de convulsões recorrentes. É causada por alterações no padrão de atividade elétrica cerebral que podem causar, além de convulsão, variações no comportamento e perda de consciência. Esses distúrbios afetam de 0,5% a 1% da população e causam diversos impactos negativos na qualidade de vida dos acometidos. Apenas 70% dos pacientes diagnosticados respondem bem aos tratamentos disponíveis (NINDS, 2016; WEBMD, 2016). Dessa forma, novos esforços para a descoberta de outras alternativas terapêuticas é imprescindível.

O tratamento dos sinais e sintomas da epilepsia resulta em custos econômicos significativos, principalmente por se tratar de uma doença crônica (BEGLEY *et al.*, 2000). O problema torna-se ainda maior em países em desenvolvimento e com grande desigualdade social, como o Brasil. A relevância do impacto econômico relacionado à doença justifica-se ainda pelo elevado custo das drogas antiepilépticas (DAE) mais recentemente descobertas quando comparadas às alternativas anteriores, as DAE de primeira e segunda geração (NÓBREGA, 2012).

Além do exposto, por se tratarem de drogas psicoativas, é importante o conhecimento do mecanismo de ação no Sistema Nervoso Central das DAE de maneira a desenvolver alternativas que causem menos problemas, como tolerância, dependência e efeitos colaterais.

3.2 DERIVADOS TERPENÓIDES

Os terpenóides estão entre os principais componentes dos óleos essenciais de algumas classes de plantas. De forma geral, esses óleos constituem-se principalmente de uma mistura de substâncias voláteis, lipofílicas e odoríferas (SIMÕES *et al.*, 2001). Na literatura são citadas várias propriedades dos óleos essenciais, como: adstringentes, analgésicos, antidepressivos, antipiréticos, antivirais, bactericidas, bacteriostáticos, béquicos, citofiláticos, desodorantes, estimulantes, fungicidas, fungistáticos, imunoestimulantes e inseticidas (KNAAK; FIUZA, 2010).

Nessa mistura, quimicamente composta principalmente por terpenóides ou fenilpropanóides, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações. Normalmente, o constituinte em maior concentração é denominado “composto majoritário”, enquanto os outros constituintes podem se apresentar em concentrações muito menores, menos de 1%, sendo considerados “elementos traços” (KNAAK; FIUZA, 2010; SIMÕES *et al.*, 2001).

O termo terpenóide é utilizado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética é derivada da condensação de unidades do isopreno que, por sua vez, é formado a partir do ácido mevalônico. Os terpenóides dividem-se em classes que são denominadas baseando no número de unidades de isopreno condensadas para sua formação, podendo ser: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e assim por diante (SIMÕES *et al.*, 2001).

Os monoterpenos, formados por duas unidades de isopreno, são os compostos terpenóides mais frequentes nos óleos voláteis, cerca de 90% da sua composição. Esses compostos apresentam algumas variações estruturais sendo classificados como acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. Além disso, segundo a classificação química podem ser hidrocarbonetos insaturados, alcoóis, aldeídos, cetonas, lactonas e tropolonas (SIMÕES *et al.*, 2001).

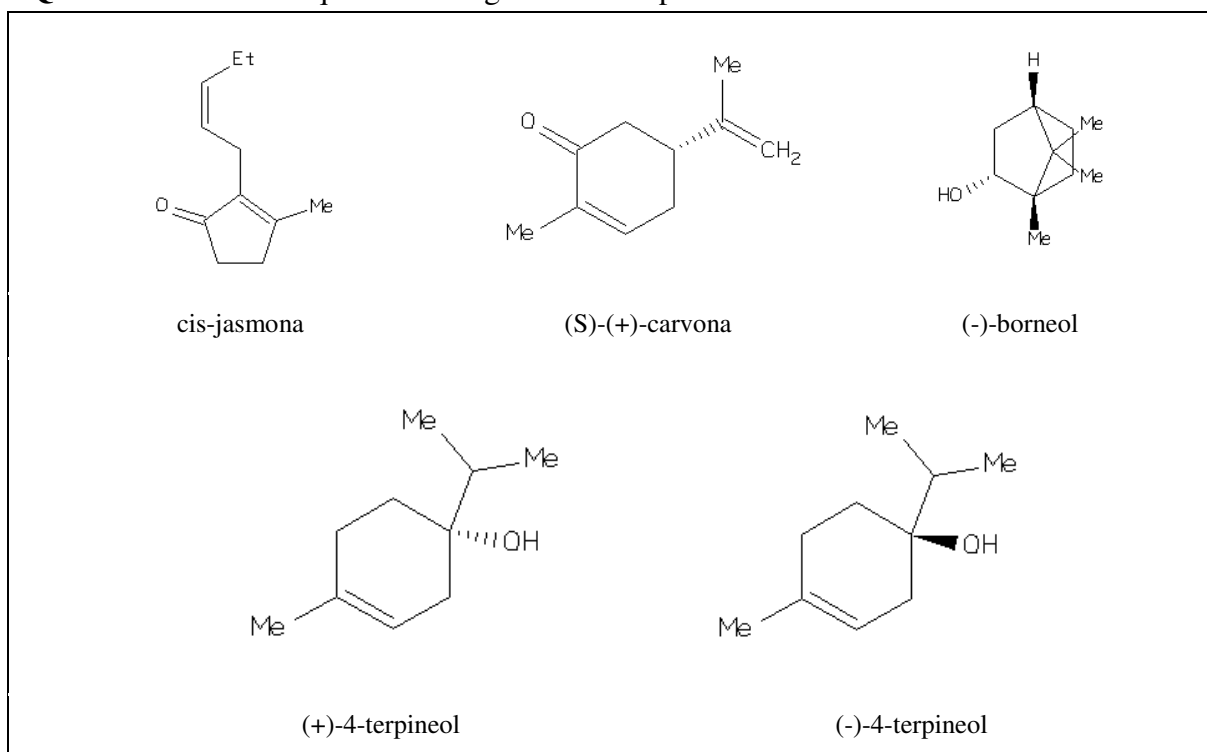
Muitos monoterpenos apresentam atividade sobre o SNC, variando desde sedativa, antinociceptiva e antidepressiva. Muitos se apresentam, inclusive, como potenciadores da neurotransmissão mediada pelo GABA tornando-se possíveis fármacos ansiolíticos ou anticonvulsivantes. Entre alguns exemplos podem ser citados os monoterpenos cis-jasmona, jasmim-lactona, óxido de linalol, metil-jasmonato, S-(+)-carvona, (+)- e (-)-borneol que atuam como potenciadores GABAérgicos (GRANGER *et al.*, 2005; HOSSAIN *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2007). Por outro lado, o monoterpeno α -tujona se apresenta como antagonista não-competitivo de receptores do GABA (HÖLD *et al.*, 2000 *apud* PASSOS *et al.*, 2009). No Quadro 1 estão representadas as estruturas químicas de alguns monoterpenos.

3.2.1 Monoterpeno 4-terpineol

O 4-terpineol (4TRP), cujos enantiômeros estão representados no Quadro 1, é um monoterpeno álcool encontrado no óleo essencial de algumas espécies (Tabela 1) como *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (TIGHE; GAO; TSENG, 2013), *Croton argyrophyllodes* Muell Arg (MORAIS *et al.*, 2006), *Alpinia zerumbet* (MACEDO *et al.*,

2013), *Alpinia speciosa* K. Schum (SANTOS *et al.*, 2011), *Artemisia phaeolepis* (HSOUNA *et al.*, 2013).

Quadro 1 - Estrutura química de alguns monoterpenos com atividade no Sistema Nervoso.



Fonte: ZINC Database (2016).

Tabela 1 - Porcentagem relativa do monoterpeneo 4-terpineol na composição do óleo essencial de algumas espécies vegetais.

Espécie	Porcentagem do 4TRP	Referência
<i>Melaleuca alternifolia</i>	30-48%	ISO 4730:2004
<i>Alpinia speciosa</i>	37,62%	SANTOS <i>et al.</i> (2011)
<i>Alpinia zerumbet</i>	17,43%	MACEDO <i>et al.</i> (2013)
<i>Artemisia phaeolepis</i>	7,32%	HSOUNA <i>et al.</i> (2013)
<i>Croton argyrophyloides</i>	2,34%	MORAIS <i>et al.</i> (2006)

Fonte: Autoria própria (2016).

Melaleuca alternifolia (Myrtaceae), mostrada na Figura 1, é uma planta originária da Austrália conhecida comumente como "árvore de chá" (Tea Tree). Seu principal produto é o óleo essencial que apresenta grande importância medicinal por ter ação bactericida e antifúngica comprovada, sendo utilizado principalmente por via tópica (OLIVEIRA *et al.*,

2011). O 4TRP é o componente majoritário e principal composto responsável por suas propriedades medicinais (NÓBREGA, 2012; TIGHE; GAO; TSENG, 2013).

Também exibida na Figura 1, a espécie *Alpinia speciosa* Schum (Zingiberaceae), conhecida popularmente como "colônia", é uma espécie vegetal originária da Ásia e com ampla distribuição também na América do Sul. Seu óleo essencial também apresenta o 4TRP como componente majoritário e a espécie apresenta um histórico de uso no Nordeste Brasileiro como um diurético no controle da hipertensão (MENDONÇA *et al.*, 1991).

O 4TRP também está presente no óleo essencial de *Alpinia zerumbet* "Variegata" (Zingiberaceae). A planta (Figura 1) é originária da Ásia e conhecida popularmente como gengibre-concha, cuité-açu, colônia, entre várias outras denominações, suas utilizações variam desde planta ornamental ou uso na medicina popular. Dentre as propriedades farmacológicas comprovadas destacam-se os efeitos hipotensor, antimicrobiano, estomáticas e vermífugas (CORREA; LIMA; COSTA, 2010).

Figura 1 - Espécies vegetais cujo óleo essencial tem a presença do monoterpeneo 4-terpineol.



Legenda: Exibidas na figura imagens da parte aérea das espécies: *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) em (a), *Alpinia speciosa* Schum (Zingiberaceae) em (b) e *Alpinia zerumbet* "Variegata" (Zingiberaceae) em (c).

Fonte: Planta medicinal (2016) e Top Tropicals (2016).

Existem diversas atividades farmacológicas demonstradas para o 4-terpineol como antimicrobiano (HSOUNA *et al.*, 2013; NINOMIYA *et al.*, 2013a), antioxidante (MORAIS *et al.*, 2006), anti-inflamatório (NINOMIYA *et al.*, 2013b), antineoplásico (WU *et al.*, 2012), anti-hipertensivo (LAHLOU *et al.*, 2003), além de apresentar atividade depressora no SNC e anticonvulsivante (SOUSA *et al.*, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2014).

A atividade anticonvulsivante do 4TRP foi demonstrada por Nóbrega e colaboradores (2014) através do teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) por meio de ensaios comportamentais e eletroencefalográficos. Os autores também investigaram os mecanismos moleculares envolvidos no efeito anticonvulsivante exercido pelo 4TRP através do teste de convulsões induzidas pelo ácido 3-mercaptopropiônico (3-MP), o qual é uma

metodologia bem estabelecida para avaliação de drogas com efeito relacionado ao sistema GABAérgico (MARES *et al.*, 1993 *apud* NÓBREGA *et al.*, 2014).

Em seguida, a atividade do 4TRP foi avaliada também na presença do flumazenil (FLU) que é um antagonista seletivo para o sítio dos benzodiazepínicos nos receptores GABA_A. Os resultados obtidos levaram a concluir que a ação do 4-terpineol está direta ou indiretamente relacionada ao sistema GABAérgico, porém sem atuar no mesmo sítio de ligação dos benzodiazepínicos (NÓBREGA *et al.*, 2014).

Além disso, o 4TRP foi capaz de inibir significativamente a corrente através dos canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) nos ensaios *in vitro* (NÓBREGA *et al.*, 2014). A relação com esses canais de sódio foi corroborada por meio de *docking* molecular *in silico* realizado por Kundaikar e colaboradores (2015), que revelou a ligação do 4TRP ao poro do canal Nav 1.2.

Ao se considerar a ampla diversidade de mecanismos envolvidos na neurotransmissão mediada pelo ácido gama-aminobutírico e sua extrema importância para o desenvolvimento de fármacos anticonvulsivantes, faz-se necessário o preenchimento dessa lacuna para o melhor entendimento do mecanismo de ação do monoterpeneo 4-terpineol.

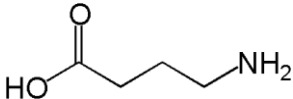
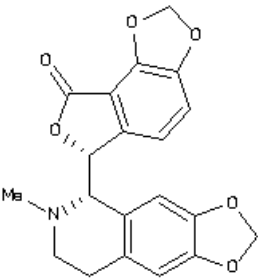
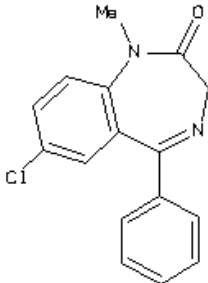
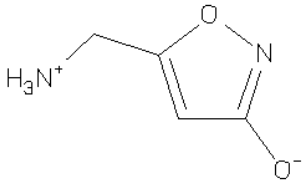
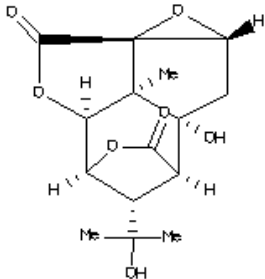
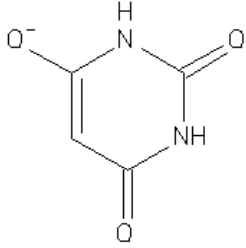
3.3 RECEPTORES DO ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO

O Ácido Gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório presente no sistema nervoso de mamíferos e atua por meio de dois tipos de receptores: tipo A e tipo B. Os receptores do GABA tipo A (GABA_ARs) são receptores ionotrópicos formados por cinco subunidades transmembrana idênticas ou homólogas. Consistem em canais de cloreto (Cl⁻) operados pela ligação de agonistas como o GABA. A abertura destes canais permite a entrada de íons Cl⁻ na célula, tornando a porção intracelular da membrana mais negativa, hiperpolarizando-a. Dessa forma, inibe a transmissão do impulso nervoso (BERGMANN *et al.*, 2013; CURI, 2011; SIGEL; STEINMANN, 2012).

Os GABA_ARs foram identificados inicialmente por serem ativados pelo GABA e pelo agonista seletivo muscimol, bloqueados por bicuculina e picrotoxina e modulados por benzodiazepínicos, barbitúricos e outros depressores do sistema nervoso central (OLSEN; SIEGHART, 2008). Esses receptores são envolvidos em várias funções importantes como cognição, aprendizagem e memória. Além disso, sua função também é relacionada a desordens no SNC como epilepsia, ansiedade, esquizofrenia e depressão (BERGMANN *et al.*,

2013). No Quadro 2 estão representadas alguns compostos que interagem com esse tipo de receptor.

Quadro 2 - Estrutura química de compostos que atuam por meio de GABA_ARs.

Agonistas	Antagonistas	Moduladores
 <p data-bbox="306 860 555 891">Ácido γ-aminobutírico</p>	 <p data-bbox="775 860 896 891">Bicuculina</p>	 <p data-bbox="1184 860 1299 891">Diazepam</p>
 <p data-bbox="373 1285 481 1317">Muscimol</p>	 <p data-bbox="772 1285 900 1317">Picrotoxina</p>	 <p data-bbox="1145 1285 1343 1317">Ácido barbitúrico</p>

Fonte: ZINC Database (2016).

A superfamília Cys-Loop de receptores operados por ligantes, que compreende os GABA_ARs, é caracterizada por bloquear a condução de íons no estado de repouso, por meio do bloqueio do canal no domínio transmembrana. A ligação dos agonistas na região extracelular induz uma mudança conformacional que ocasiona a abertura do canal, permitindo a condução de íons (BALI; AKABAS, 2007). A primeira estrutura tridimensional de um GABA_AR humano foi obtida por meio de cristalografia de raios-X por Miller e Aricescu (2014).

A complexidade dos receptores do GABA_A deve-se a existência de numerosas subunidades diferentes, como mostra a árvore filogenética na Figura 2. Essas subunidades, em humanos, são codificadas por 19 genes listados na Tabela 2, ignorando variantes de *splicing*, até o momento são conhecidas seis subunidades alfa (α 1 - 6), três subunidades beta (β 1 - 3),

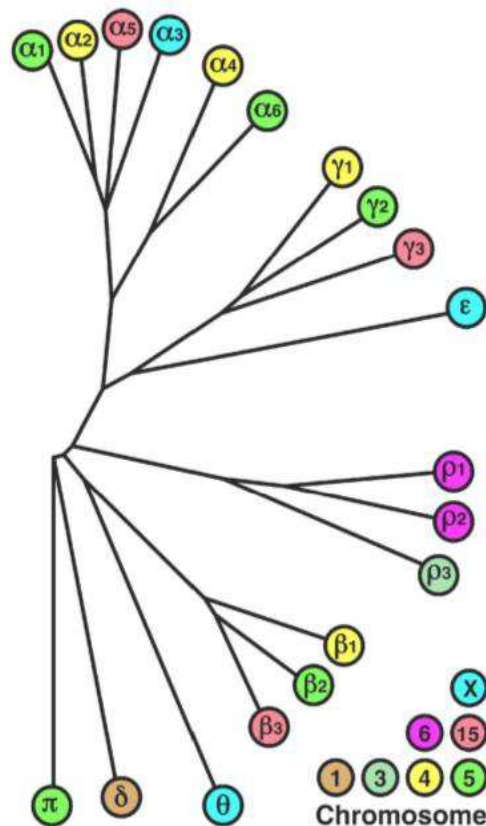
três subunidades gama ($\gamma 1 - 3$), três subunidades rho ($\rho 1 - 3$) e as subunidades épsilon (ϵ), delta (δ), theta (θ) e pi (π) (RICHTER *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Lista dos genes identificados que codificam subunidades dos GABA_ARs em *Homo sapiens* na base de dados de proteínas UniProtKB.

Subunidade	Gene	ID na UniProtKB
$\alpha 1$	GABRA1	P14867
$\alpha 2$	GABRA2	P47869
$\alpha 3$	GABRA3	P34903
$\alpha 4$	GABRA4	P48169
$\alpha 5$	GABRA5	P31644
$\alpha 6$	GABRA6	Q16445
$\beta 1$	GABRB1	P18505
$\beta 2$	GABRB2	P47870
$\beta 3$	GABRB3	P28472
$\gamma 1$	GABRG1	Q8N1C3
$\gamma 2$	GABRG2	P18507
$\gamma 3$	GABRG3	Q99928
$\rho 1$	GABRR1	O14764
$\rho 2$	GABRR2	P78334
$\rho 3$	GABRR3	Q9UN88
Δ	GABRD	O00591
ϵ	GABRE	P24046
Θ	GABRQ	P28476
Π	GABRP	A8MPY1

Fonte: Dados da UniProtKB (2016).

Figura 2 - Árvore filogenética dos genes identificados que codificam as subunidades constituintes dos GABA_ARs.



Legenda: A maioria dos 19 genes identificados é organizada em quatro *clusters* nos cromossomos 4, 5, 15 e X. A localização dos genes nos diferentes cromossomos está representada pelas cores na imagem. Acredita-se que o agrupamento dos genes contribui na coordenação da expressão gênica.

Fonte: Sigel e Steinmann (2012).

A composição dos GABA_AR como heteropentâmeros é o principal fator responsável por sua complexa diversidade. Os vários subtipos existentes diferem em abundância, localização intracelular e localização no sistema nervoso (OLSEN; SIEGHART, 2009).

O subtipo mais abundante do GABA_AR encontrado no SNC é α1β2γ2. Esse subtipo foi o primeiro a ser claramente identificado e a ter sua farmacologia conhecida (RENARD *et al.*, 1999). Existem vários registros de mutações na sequência das subunidades que formam esse subtipo, muitas delas são relacionadas ao desenvolvimento de epilepsia (MACDONALD; KANG; GALAGHER, 2010; WALLACE, 2001).

A imensa maioria (estima-se de 75-80%) dos GABA_ARs no SNC contém a subunidade γ2. As subunidades γ1 e γ3 são mais raras, mas tem papel importante em regiões específicas provavelmente acopladas com outras subunidades também específicas. A subunidade α1 é a mais expressa das subunidades α, frequentemente co-localizada com β2 e γ2. Juntas essas três subunidades formam um *cluster* no cromossomo 5 (Figura 2). Entre as subunidades β, a

subunidade $\beta 2$ é a mais expressa enquanto a $\beta 1$ é a menos comum. A $\beta 3$ é significativamente mais expressa no período perinatal do que no cérebro adulto (OLSEN; SIEGHART, 2008).

Enquanto subunidades como $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\gamma 2$ tem sido encontradas concentradas principalmente nas sinapses GABAérgicas (podem estar presentes nas membranas extrassinápticas em menor concentração), as subunidades δ foram detectadas exclusivamente em regiões extrassinápticas. Receptores contendo a subunidade δ apresentam uma menor condutância e um tempo aberto muito mais longo, o que indica que a inibição tônica presente deve-se a ativação persistente de GABA_ARs contendo a subunidade δ (OLSEN; SIEGHART, 2009).

Distúrbios na função sináptica e extrassináptica dos GABA_ARs, incluindo várias mutações pontuais (MACDONALD; KANG; GALAGHER, 2010), implica em muitas formas de epilepsia. Os δ -GABA_ARs constituem um importante alvo para o tratamento de formas específicas da epilepsia, devido à necessidade de se manter níveis apropriados de inibição tônica para o controle do comportamento elétrico no sistema nervoso (BRICKLEY; MODY, 2012).

Essa diversidade, característica dos GABA_ARs, oferece numerosas possibilidades de intervenção farmacológica refinada (SIGEL; STEINMANN, 2012), podendo levar ao desenvolvimento de fármacos específicos para atuar em subtipos do receptor pré-determinados.

3.4 MODELOS TRIDIMENSIONAIS

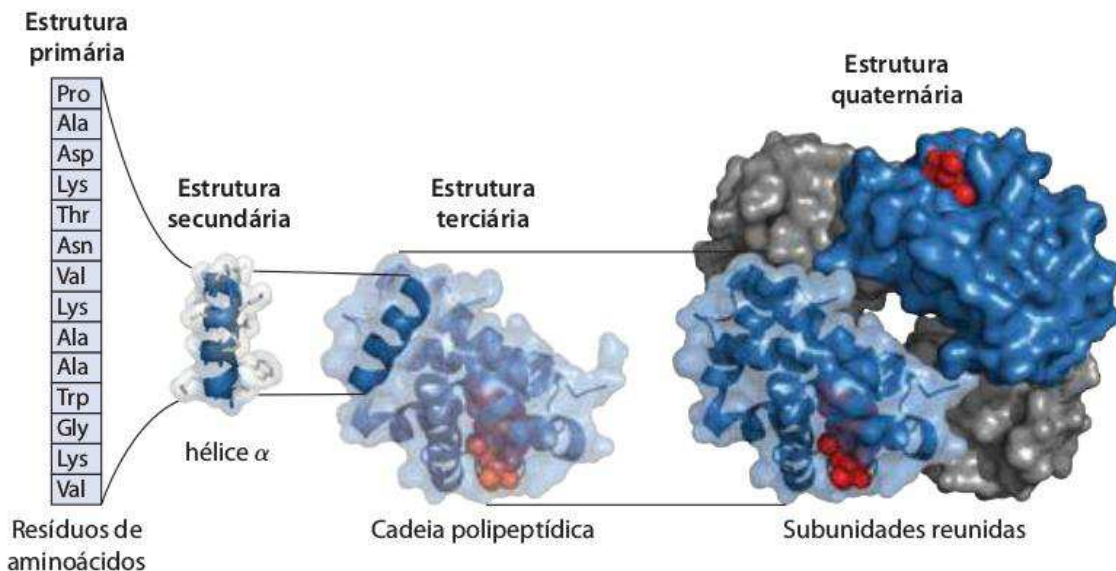
O número de proteínas com estrutura tridimensional (3D) conhecida tem aumentado rapidamente, além disso, estruturas obtidas por meio da genômica estrutural têm se tornado disponíveis em domínio público. Esse aumento na quantidade de alvos estruturais deve-se, inclusive, ao aperfeiçoamento de técnicas para determinação de estruturas, como a cristalografia de raios-X de alta resolução. A partir de vários projetos de determinação massiva das estruturas tridimensionais, muitas proteínas vêm sendo selecionadas a partir do seu potencial terapêutico (KITCHEN *et al.*, 2004).

A partir do sequenciamento dos genomas de diversas espécies e da identificação de sequências de aminoácidos de inúmeras proteínas, tem-se buscado maneiras de prever a estrutura nativa de uma proteína a partir de sua sequência disponível. De acordo com Capriles e colaboradores (2014), “a função de uma proteína está intimamente associada à sua estrutura

tridimensional”. Dessa forma, um método que possibilite prever a estrutura a partir da sequência é fundamental para o aproveitamento da imensa quantidade de informação biológica disponível (CAPRILES *et al.*, 2014).

Uma proteína, em sua forma nativa, apresenta vários níveis de organização que constituem sua estrutura, como mostrado na Figura 3 (NELSON; COX, 2014). A estrutura primária consiste na sequência de aminoácidos, traduzida a partir do RNA mensageiro. Ferramentas da bioinformática para prever genes e traduzir a sequência incluem o GeneMark (Borodovsky Group, GaTech, USA). A estrutura secundária de uma proteína é formada por hélices- α , folhas- β e regiões de loop. O PsiPred (UCL) é um exemplo de ferramenta de predição da estrutura secundária. A estrutura terciária da proteína é a estrutura tridimensional de uma subunidade e a estrutura quaternária consiste na junção de subunidades em proteínas multiméricas, como é o caso dos GABA_ARs. Programas e servidores como o SWISS-MODEL (ExPASy), MODELLER (WEBB; SALI, 2014) e outros, foram implementados com esse intuito de construir a estrutura tridimensional da proteína a partir da sequência primária por meio de modelagem comparativa ou “por homologia”.

Figura 3 - Níveis de organização na estrutura molecular de uma proteína.



Legenda: A estrutura primária é constituída da sequência de resíduos de aminoácidos codificada pelo RNAm, a cadeia peptídica. A estrutura secundária é formada pelo enovelamento da cadeia peptídica em α -hélices (mostrado na figura) e folhas- β pregueadas. A estrutura terciária forma-se a partir do dobramento da estrutura secundária, formando uma subunidade da proteína. Algumas proteínas são multiméricas, formadas por mais de uma subunidade, apresentado a estrutura quaternária que é formada pela junção das subunidades. As estruturas terciária e quaternária compõem a estrutura tridimensional da proteína, essencial para a sua função no organismo.

Fonte: Nelson e Cox (2014).

Segundo Martin (2003), a modelagem comparativa permite a construção de um modelo tridimensional de uma proteína cuja sequência de aminoácidos é conhecida, porém a estrutura é desconhecida. Para isso, é usada como molde (*template*) outra proteína de sequência e estrutura conhecida. São utilizadas como molde proteínas homólogas à proteína alvo em questão. Em virtude disso, a modelagem comparativa também é denominada modelagem por homologia (CAPRILES *et al.*, 2014; MARTIN, 2003).

A principal razão da utilização da modelagem comparativa resulta do fato de que os métodos experimentais disponíveis para determinação das estruturas, cristalografia de raios-X e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), utilizam equipamentos caros e consomem muito tempo (6 a 12 meses). Nesses métodos, é necessária uma grande quantidade de proteína purificada capaz de formar cristais de alta qualidade, para que seja possível a difração com alta resolução. As proteínas transmembrana (20% dos genomas eucarióticos) são imensamente difíceis de cristalizar (MARTIN, 2003).

Por outro lado, a partir da sequência da proteína um modelo por homologia pode ser obtido em pouco tempo utilizando servidores disponíveis *on line*. Determinar a qualidade do modelo e refiná-lo demora um tempo maior, mas ainda assim pode ser feito em semanas (MARTIN, 2003).

Esse tipo de modelagem é ainda justificado pelo fato de que proteínas com sequências primárias com 30% de identidade podem ter sobreposição de cadeias principais com ótima qualidade, com desvios de mínimos quadrados (*rmsd*) de 2 Å. Para proteínas idênticas, em diferentes formas cristalinas, os valores de *rmsd* podem chegar a 0,7 Å (CHOTHIA C. *et al.*, 1986 *apud* AMADOR, 2015). Essa conservação existente entre proteínas homólogas é perceptível e assume-se que é devido ao pressuposto que a conservação da estrutura tridimensional é fundamental para a manutenção da função das proteínas (HÖLTJE *et al.*, 2008).

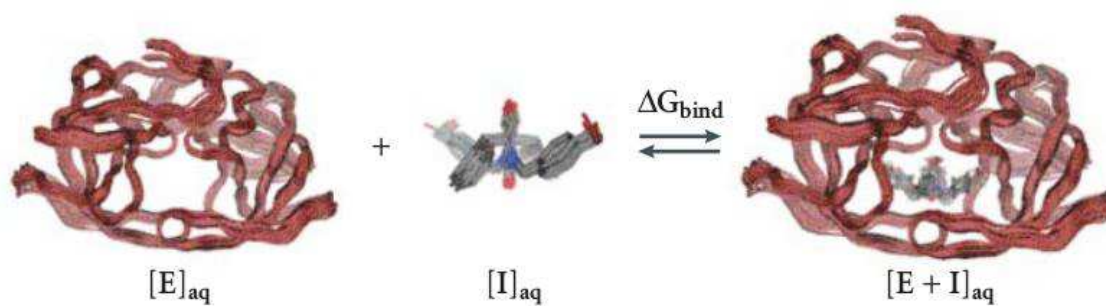
3.5 DOCKING MOLECULAR

Segundo Jackson (2003), interações são a chave para entender os processos biológicos, incluindo todos os processos metabólicos e regulatórios. Determinar a estrutura das interações entre biomoléculas é muito importante para a compreensão dos processos biológicos a nível molecular. O conhecimento das estruturas tridimensionais abre um leque de possibilidades para intervenção e manipulação de interações moleculares, através do *design*

de fármacos com base em sua estrutura, mutagênese sítio-dirigida e engenharia da estrutura de proteínas.

O processo de uma simulação de *docking* envolve a predição da conformação e posicionamento do ligante no sítio de ligação em uma biomolécula alvo (KITCHEN *et al.*, 2004). Jorgensen (1991) utiliza uma analogia da chave e fechadura para descrever o *docking* molecular, no qual se busca descobrir a correta orientação da chave para obtenção do melhor encaixe, mais favorável. No entanto, ao se levar em consideração a flexibilidade das moléculas envolvidas no processo de *docking*, que geralmente se moldam uma a outra, uma analogia mais adequada seria de um modelo semelhante ao encaixe mão e luva.

Figura 4 - Representação da formação do complexo proteína-ligante no *docking* molecular.



Legenda: Essa figura ilustra a ligação do inibidor Dmp323 a uma protease do HIV (PBD ID: 1BVE). A energia livre de ligação (ΔG) é relacionada à constante de afinidade de ligação (K_A) e é utilizada para ranquear as melhores soluções no processo de *docking in silico*.

Fonte: Kitchen e colaboradores (2004).

Simulações de *docking* molecular *in silico* são amplamente utilizadas para a predição de complexos de biomoléculas na análise da relação estrutura-função e no *design* molecular (Figura 4). Existem dezenas de métodos efetivos para a realização da simulação de *docking*, incorporando diferentes maneiras de representação molecular, de avaliação de energia de ligação e de busca no espaço conformacional. As ferramentas disponíveis possibilitam a solução desse problema computacional complexo a partir de um tempo e esforço computacional razoável e viável (MORRIS *et al.*, 2009).

Existem vários tipos de busca no espaço conformacional utilizados para realização da simulação de *docking*. Os algoritmos de busca sistemática são baseados em métodos incrementais nos quais são adicionados graus de liberdade (radicais) à molécula do ligante. Os métodos estocásticos incluem algoritmos de Monte Carlo e algoritmos genéticos, por exemplo. Na busca estocástica são feitas mudanças aleatórias no ligante ou em uma população de ligantes e as novas conformações obtidas passam por funções de avaliação como forma de seleção. Outro método de realização de *docking* são os métodos de simulação

que incluem dinâmica molecular e minimização de energia (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014; KITCHEN *et al.*, 2004).

O programa AutoDock utiliza o método de busca estocástica (KITCHEN *et al.*, 2004), por meio da implementação de algoritmos genéticos para realização da busca por conformações. Esse tipo de algoritmo baseia-se em conceitos provenientes do princípio de seleção natural para abordar o problema computacional (LUCAS, 2002). O algoritmo é iniciado com uma população de indivíduos, que representam diferentes soluções. Cada membro da população é classificado a partir de um *score* e, a cada geração, novos indivíduos são gerados por meio da recombinação entre aqueles com melhor *score*, mais bem adaptados. A variabilidade na população também é obtida por meio de mudanças aleatórias (mutações). A cada repetição do processo há uma nova geração de soluções, seguida de avaliação e seleção de tal maneira que a população evolua para as melhores soluções (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014; JACKSON, 2003).

O Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) compõe um híbrido com um método de busca local, em uma alusão à teoria de Lamarck, sobre a hereditariedade de características adquiridas durante o tempo de vida de um indivíduo. Neste algoritmo, uma porcentagem predefinida da população é aleatoriamente escolhida para execução de uma busca por ótimos locais, de forma que a solução resultante substitui a solução original na população (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

4 METODOLOGIA

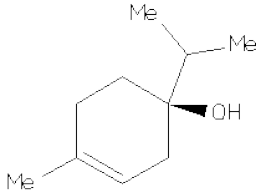
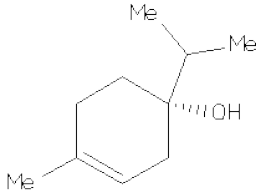
A metodologia utilizada consistiu dos seguintes passos: obtenção da estrutura dos ligantes e dos subtipos do receptor; preparo das estruturas e simulação de *docking* molecular; busca de sítios ativos e avaliação dos complexos gerados.

Os ensaios de *docking* molecular *in silico* foram realizados em plataforma computacional com processador Intel Core i5-4200U 1.60 GHz, memória RAM de 6GB, utilizando o sistema operacional Ubuntu 16.04.

4.1 ESTRUTURA DOS LIGANTES

As estruturas tridimensionais de ambos os enantiômeros do 4-terpineol foram obtidas na base de dados de pequenas moléculas, *ZINC database*, no formato de arquivo *.mol2* e estão representadas no Quadro 3 com seus respectivos códigos de acesso.

Quadro 3 - Estruturas tridimensionais dos ligantes utilizadas para simulação de docking molecular.

Ligante	Estrutura	Código de acesso
(-)-terpinen-4-ol		ZINC04262096
(+)-terpinen-4-ol		ZINC03861537

Fonte: *ZINC database* (2016).

Para realização da simulação de *docking* molecular no programa Autodock Tools 1.5.6, é necessário que o ligante e a proteína estejam no formato de arquivo *.pdbqt*. Dessa

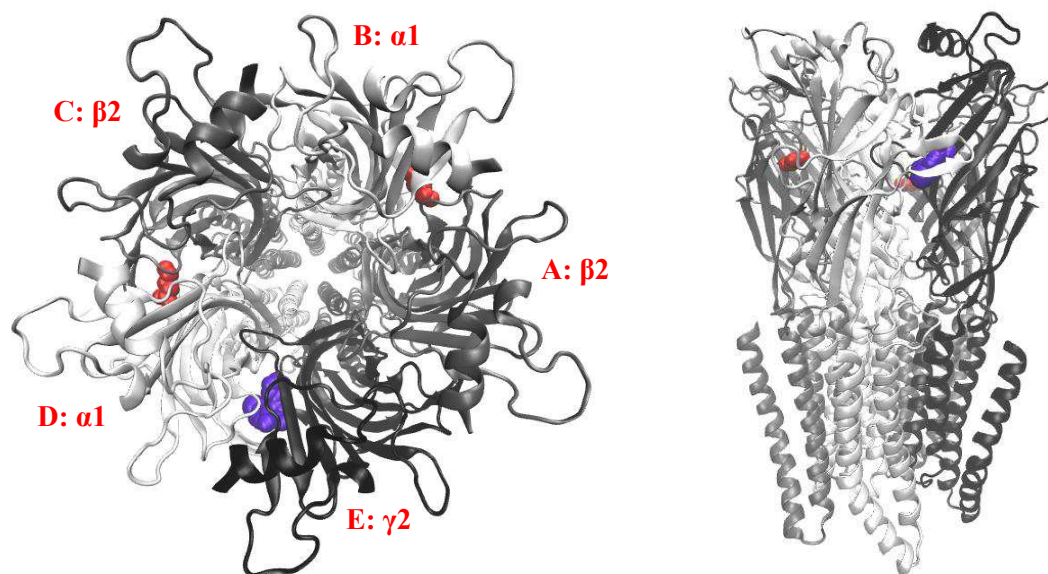
forma, os arquivos *.mol2* de ambos os ligantes foram convertidos para *.pdbqt* com o auxílio do referido programa. Foram mantidas as cargas do arquivo *.mol2*, mesclados os hidrogênios apolares e detectadas duas ligações rotacionáveis.

4.2 MODELO TRIDIMENSIONAL DO GABA_AR ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$)

Como ponto de partida para a realização das simulações de *docking* foi utilizado o modelo de Bergmann *et al.* (2013) que representa a estrutura tridimensional de cadeia completa do receptor de GABA_A, subtipo $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, cuja visualização é mostrada na Figura 5. O modelo foi obtido por meio de modelagem por homologia com a estrutura de raios-X do canal de cloreto operado por glutamato (GluCl1) de *Caenorhabditis elegans* (PDB ID: 3RIF) e inclui informações adicionais da estrutura do canal iônico dependente de ligante de *Erwinia chrysanthemii* (ELIC) (PDB ID: 2VL0).

O modelo selecionado, que representa a estrutura do canal no estado aberto, apresentou 98,8% dos resíduos em regiões favoráveis ou adicionalmente permitidas pelo gráfico de Ramachandran obtido no Procheck.3.5.4. Além disso, o mesmo foi validado pelos autores a partir de dados experimentais de mutagênese sítio-dirigida (BERGMANN *et al.*, 2013).

Figura 5 - Visualização do modelo do GABA_AR subtipo $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no *Visual Molecular Dynamics*.



Legenda: À esquerda: vista superior do receptor mostrando as duas subunidades $\alpha 1$ (cinza claro), as duas subunidades $\beta 2$ (cinza escuro), a subunidade $\gamma 2$ (preto), o diazepam (azul escuro) e o GABA (vermelho). À

direita: vista lateral do receptor na qual podem ser visualizados o domínio extracelular (parte superior) constituído principalmente por folhas beta, e o domínio transmembrana (parte inferior) formado por alfa-hélices.
Fonte: Autoria própria (2016).

O arquivo PDB com as coordenadas atômicas do modelo foi disponibilizado para *download* como anexo na publicação do artigo. O modelo foi então convertido para o formato *.pdbqt* no programa Autodock Tools 1.5.6. Nessa etapa, foram adicionados os hidrogênios polares normalmente omitidos nos arquivos *.pdb* e parâmetros de carga Kollman (WEINER *et al.*, 1984).

4.3 MODELAGEM DA SUBUNIDADE DELTA (δ)

A sequência primária da subunidade delta δ , obtida na base de dados UniProtKB (ID: O00591), foi submetida a modelagem no ModWeb (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>). Foi selecionado o melhor modelo, que utilizou como *template* a estrutura do GABA_AR β 3 humano obtida por Miller e Aricescu (2014) por meio cristalografia de raios-X, com uma resolução de 2.97 Å. O *template* encontra-se depositado na base de dados *Protein Data Bank* (PDB ID: 4COF). As sequências primárias do alvo e do *template* compartilham 47% de identidade.

As coordenadas atômicas do modelo foram salvas em arquivo *.pdb* e a estrutura foi avaliada por meio do QMEAN6 (BENKERT; SCHWEDE; TOSATTO, 2009), PROCHEK (LASKOWSKI *et al.*, 1993) e ProSA-web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Após avaliado e refinado, o modelo foi então convertido para o formato *.pdbqt* no programa Autodock Tools 1.5.6. Nessa etapa, foram adicionados os hidrogênios polares e parâmetros de carga Kollman (WEINER *et al.*, 1984), características essenciais para os cálculos de *docking*.

4.4 BUSCA DE SÍTIOS ATIVOS

A partir do arquivo *.pdb* dos modelos foi feita uma busca por possíveis sítios ativos presentes na estrutura com o auxílio do GHECOM 1.0 (*Grid-based HECOMi finder*). Os resultados gerados foram comparados com os resultados obtidos no *docking* molecular.

4.5 DOCKING MOLECULAR

Foram realizadas simulações de *docking* semirrígido, no qual o receptor foi considerado na sua estrutura rígida e os ligantes como flexíveis. Os cálculos da simulação de *docking* foram realizados pelo programa AutoDock 4.2 a partir dos arquivos *.pdbqt* do receptor e dos ligantes.

O programa utilizado, AutoDock, compreende um conjunto de ferramentas para *docking* concebidas para prever como moléculas pequenas, tais como substratos ou candidatos a fármacos, se ligam a um receptor da estrutura tridimensional conhecida. Consiste em dois programas principais: AutoGrid que calcula os *grids* que descrevem mapas de afinidade na proteína alvo e o AutoDock que realiza o *docking* da molécula do ligante ao *grid* (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2016).

Outro aspecto importante do AutoDock é que o mesmo tem se mostrado útil para realizar o *blind docking*, quando se conhece as estruturas do ligante e do receptor, mas a localização do sítio de ligação é desconhecida (HETENYI; SPOEL, 2006; IORGA, 2006; THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2016). Assim, como não havia informação prévia da localização do sítio foi realizado esse tipo de *docking*.

O *grid* utilizado pelo AutoDock permite a pesquisa no grande espaço conformacional a partir da avaliação rápida da energia de ligação das conformações testadas. O *grid* corresponde a uma discretização do espaço tridimensional em uma série de elementos cúbicos. Uma sonda é colocada sequencialmente em cada ponto do *grid* e a energia de interação entre a sonda e a proteína alvo é calculada. Esses valores são armazenados no *grid* gerando um mapa de energia que é utilizado durante a simulação de *docking* (JACKSON, 2003; MORRIS *et al.*, 2009).

Na simulação de *docking* realizada, o *grid* foi configurado para abranger o máximo de pontos (126x126x126) e foi posicionado de maneira a proporcionar uma cobertura do domínio extracelular do receptor. Foram consideradas duas ligações rotacionáveis no ligante, 30 graus de liberdade vibracionais e 2 graus de liberdade torcionais.

A partir da combinação de um campo de força empírico de energia livre com o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), o AutoDock proporciona uma previsão rápida de conformações dos complexos com a predição das energias livres de associação (MORRIS *et al.*, 2009). O campo de força utilizado calcula a energia de interação do ligante e da proteína e a energia interna do ligante (KITCHEN *et al.*, 2004).

Os cálculos realizados para *docking* e obtenção dos complexos com menor energia foram realizados por meio do LGA com os seguintes parâmetros: 10 000 réplicas, população de 150 indivíduos, 2500000 avaliações de energia, 27000 gerações. As taxas de mutação e cruzamento foram 0,02 e 0,8 respectivamente. Foram, então, gerados 10 melhores complexos e ordenados com base no *ranking* de menor energia.

4.6 ALINHAMENTO ENTRE SEQUÊNCIAS DAS SUBUNIDADES γ

Sabe-se que a conservação dos resíduos de uma família de proteínas frequentemente é relacionada a sua função, podendo envolver um sítio ativo ou de ligação. A informação evolucionária pode indicar um epitopo funcional permitindo a identificação de resíduos importantes (JACKSON, 2003). A busca por essas regiões de identidade, que se repetem, frequentemente é feita por meio do alinhamento das sequências primárias das proteínas.

A partir da identificação por meio do *docking* da ligação do 4TRP com resíduos específicos na subunidade γ_2 , foi feito o alinhamento múltiplo da sequência dessa subunidade com as outras subunidades γ . Para isso, foi utilizado a ferramenta de alinhamento múltiplo webPRANK (Goldman Group Software). Foi feito o *download* do alinhamento múltiplo obtido e analisado no BioEdit v7.2.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DOCKING DO 4-TERPINEOL E O GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$

A partir da simulação de *docking* entre o (-)-4-terpineol e o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, foram gerados os dados mostrados na Tabela 3, ranqueados em ordem crescente de energia. A partir desses resultados pode-se observar que a menor energia livre de ligação calculada para o (-)-4-terpineol foi -6,25 kcal/mol, valor negativo que implica na afirmação que é mais termodinamicamente favorável a existência das moléculas em um complexo do que separadas.

Tabela 3 - Resultado dos dez melhores complexos do (-)-4-terpineol com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$.

Complexo	Energia livre de ligação	Energia intermolecular	Ki	Pontes de hidrogênio
1	-6,25 kcal/mol	-6,85 kcal/mol	26,21 μ M	E: ASN101 OD1 - <0> H18 E: ASN101 HD21 - <0> O1
2	-6,23 kcal/mol	-6,83 kcal/mol	27,19 μ M	E: ASN101 OD1 - <0> H18 E: ASN101 HD21 - <0> O1
3	-6,22 kcal/mol	-6,82 kcal/mol	27,45 μ M	E: ASN101 OD1 - <0> H18 E: ASN101 HD21 - <0> O1
4	-6,22 kcal/mol	-6,82 kcal/mol	27,50 μ M	E: ASN101 OD1 - <0> H18 E: ASN101 HD21 - <0> O1
5	-6,18 kcal/mol	-6,78 kcal/mol	29,30 μ M	B: THR206 OG1 - <0> H18 B: SER204 HG - <0> O1
6	-5,94 kcal/mol	-6,54 kcal/mol	44,22 μ M	B: THR206 OG1 - <0> H18 B: SER204 HG - <0> O1
7	-5,63 kcal/mol	-6,22 kcal/mol	75,27 μ M	B: LEU88 O - <0> H18 B: LEU118 HN - <0> O1
8	-5,56 kcal/mol	-6,15 kcal/mol	84,58 μ M	B: LEU88 O - <0> H18 B: LEU118 HN - <0> O1
9	-5,48 kcal/mol	-6,07 kcal/mol	96,67 μ M	D: ASN110 OD1 - <0> H18
10	-5,23 kcal/mol	-5,82 kcal/mol	147,57 μ M	B: THR95 O - <0> H18 B: THR95 - H <0> O1

Fonte: Autoria própria (2016).

A análise do *docking* no programa AutoDock Tools 1.5.6 permitiu ainda prever ligações de hidrogênios com aminoácidos do receptor, também exibidas na Tabela 3. Dessa forma, os quatro resultados mais bem ranqueados indicam a formação de duas pontes de

hidrogênio entre o (-)4TRP e o resíduo ASN101 da cadeia E, que no modelo de Bergmann *et al.* (2013) corresponde a subunidade $\gamma 2$.

Análise semelhante foi feita para a simulação de *docking* entre o outro enantiômero (+)-4-terpineol e o mesmo modelo do receptor (Tabela 4). O resultado também evidencia uma termodinâmica favorável do complexo, porém com um valor maior de energia livre de ligação, de -5,89 kcal/mol. Da mesma forma que o (-)4TRP, os resultados melhor ranqueados do (+)4TRP indicam a formação de pontes de hidrogênio com o resíduo ASN101 da subunidade $\gamma 2$.

Tabela 4 - Resultado dos dez melhores complexos do (+)-4-terpineol com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$.

Complexo	Energia livre de ligação	Energia intermolecular	Ki	Pontes de hidrogênio
1	-5,89 kcal/mol	-6,49 kcal/mol	47,81 μ M	E: ASN101 OD1 - <0>H18 E: ASN101 HD21 - <0> O1
2	-5,88 kcal/mol	-6,48 kcal/mol	49,0 μ M	E: ASN101 OD1 - <0>H18 E: ASN101 HD21 - <0> O1
3	-5,7 kcal/mol	-6,3 kcal/mol	66,01 μ M	E: ASN101 OD1 - <0>H18 E: ASN101 HD21 - <0> O1
4	-5,6 kcal/mol	-6,2 kcal/mol	78,33 μ M	E: LYS 105 O - <0> H18 E: ASN101 HD21 - <0> O1
5	-5,59 kcal/mol	-6,19 kcal/mol	79,25 μ M	E: ASN101 HD21 - <0> O1
6	-5,3 kcal/mol	-5,9 kcal/mol	129,63 μ M	B: ALA108 O - <0> H18 B: ASN110 HG - <0> O1
7	-5,29 kcal/mol	-5,89 kcal/mol	131,53 μ M	B: ALA108 O - <0> H18 B: ASN110 HG - <0> O1
8	-5,28 kcal/mol	-5,88 kcal/mol	134,95 μ M	B: LEU88 O - <0> H18 B: LEU118 HN - <0> O1
9	-5,24 kcal/mol	-5,84 kcal/mol	143,23 μ M	B: LEU88 O - <0> H18 B: LEU118 HN - <0> O1
10	-5,15 kcal/mol	-5,74 kcal/mol	168,84 μ M	C: SER104 O - <0> H18 C: SER104 HN - <0> O1

Fonte: Autoria própria (2016).

Nas Tabelas 3 e 4 são mostradas as constantes de dissociação (Ki) calculadas para os complexos gerados. Segundo Kitchen e colaboradores (2004), o Ki não é essencial para predição da correta estrutura do complexo proteína-ligante, mas é uma importante informação para prever a atividade biológica. É possível observar que a menor constante obtida para o (-)4TRP foi de 26,21 μ M, enquanto que para o (+)4TRP foi 47,81 μ M. Esse resultado pode sugerir que existe uma maior atividade do (-)4TRP em relação ao GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$.

No trabalho de Amador e colaboradores (2016), foi evidenciada *in silico* a detoxificação do herbicida Metsulfuron por uma enzima da superfamília das Glutathione-S-transferases (GST) de arroz, através de uma metodologia semelhante, obtendo uma menor energia livre de ligação entre o Metsulfuron e o modelo da OsGSTU4 de -3,74 kcal/mol.

O *docking* simulado no AutoDock 4.2 também foi utilizado anteriormente por Maia (2013), para simular a interação entre algumas GST de *Anopheles gambiae* com inseticidas, tais como Malation, DDT (Dicloro Difetil Tricloroetano), carbaril, cipermetrina e CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), obtendo menores energias entre -9,16 e -3,24 kcal/mol.

Abreu (2015) também utilizou essa metodologia para avaliar atividade de uma proteína PR-5 de *Poncirus trifoliata*, que teve atividade de beta-glucanase demonstrada pelo *docking* com diferentes glucanas. Esses trabalhos reforçam a ideia da ampla gama de aplicações da metodologia de *docking in silico* utilizada.

Os dez complexos gerados no *docking* de cada enantiômero foram salvos em formato *.pdbqt* e visualizados no programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), foram então listados os resíduos de aminoácidos encontrados a uma distância inferior a 4,0 Å da molécula do ligante, conforme mostrado nos Quadros 4 e 5.

Quadro 4 - Resíduos a uma distância inferior a 4,0 Å do (-)-4-terpineol nos complexos com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ melhor ranqueados pelo AutoDock 4.2.

Complexo 1		Complexo 2		Complexo 3		Complexo 4		Complexo 5	
A.a.	Cad.	A.a.	Cad.	A.a.	Cad.	A.a.	Cad.	A.a.	Cad.
LEU31	E	LEU31	E	LEU31	E	LEU31	E	PHE99	B
LEU34	E	LEU34	E	LEU34	E	LEU34	E	HIS101	B
LEU35	E	LEU35	E	LEU35	E	LEU35	E	SER158	B
TYR38	E	TYR38	E	TYR38	E	TYR38	E	TYR159	B
LEU87	E	LEU87	E	LEU87	E	LEU87	E	SER204	B
ASN101	E	ASN101	E	ASN101	E	ASN101	E	THR206	B
MET102	E	MET102	E	MET102	E	MET102	E	TYR209	B
VAL103	E	VAL103	E	VAL103	E	VAL103	E	TYR62	C
GLY104	E	GLY104	E	GLY104	E	GLY104	E	GLN64	C
LYS105	E	LYS105	E	LYS105	E	LYS105	E	MET105	C

Fonte: Autoria própria (2016).

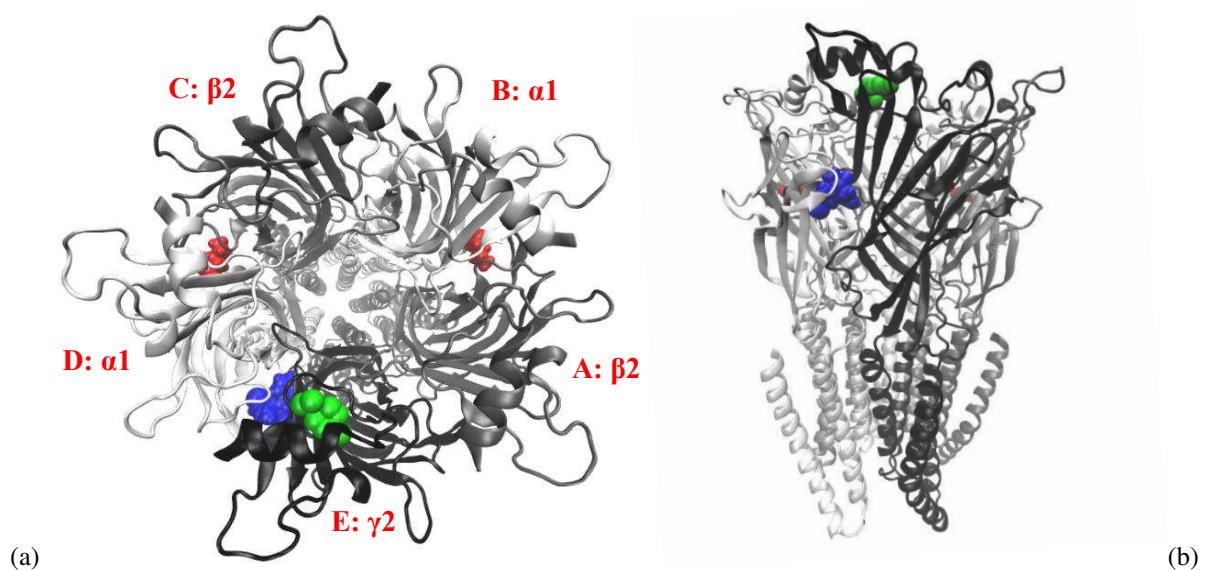
Quadro 5 - Resíduos a uma distância inferior a 4,0 Å do (+)-4-terpineol nos complexos com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ melhor ranqueados pelo AutoDock 4.2.

Complexo 1		Complexo 2		Complexo 3		Complexo 4		Complexo 5	
A.a.	Cad.	A.a.	Cad.	A.a.	Cad.	A.a.	Cad.	A.a.	Cad.
LEU31	E	LEU31	E	LEU31	E	LEU31	E	LEU31	E
LEU34	E	LEU34	E	LEU34	E	LEU34	E	LEU34	E
LEU35	E	LEU35	E	LEU35	E	LEU35	E	LEU35	E
TYR38	E	TYR38	E	TYR38	E	TYR38	E	TYR38	E
LEU87	E	LEU87	E	LEU87	E	LEU87	E	LEU87	E
ASN101	E	ASN101	E	ASN101	E	ASN101	E	ASN101	E
MET102	E	MET102	E	MET102	E	VAL103	E	VAL103	E
VAL103	E	VAL103	E	VAL103	E	GLY104	E	GLY104	E
GLY104	E	GLY104	E	GLY104	E	LYS105	E	LYS105	E
LYS105	E	LYS105	E	LYS105	E	ILE106	E	ILE106	E
				ILE106	E			ILE133	E

Fonte: Autoria própria (2016).

Os quatro melhores complexos sugerem a interação do (-)-4TRP na porção extracelular da subunidade $\gamma 2$, conforme mostrado na Figura 6, com uma distância inferior a 4,0 Å dos aminoácidos Leu31, Leu34, Leu35, Tyr38, Leu87, Asn101, Met102, Val103, Gly104, Lys105, maioria de natureza hidrofóbica indicando um possível sítio de ligação. Esses aminoácidos encontram-se em um sítio de ligação diferente daquele dos benzodiazepínicos, isso condiz com dados experimentais obtidos por Nóbrega e colaboradores (2014). A Figura 7 mostra um dos sítios previstos pelo GHECOM 1.0, o gráfico dos resíduos que compõem cada *pocket* na estrutura da subunidade $\gamma 2$ pode ser visualizado no Apêndice A (KAWABATA, 2010), este sítio coincide com o sítio de ligação previsto pelo *docking* molecular para o 4-terpineol.

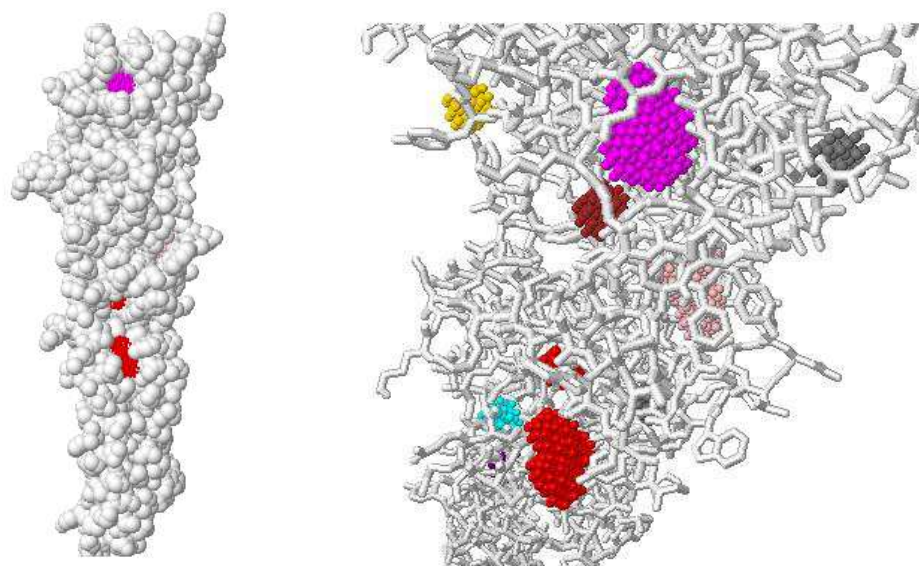
Figura 6 - Visualização primeiro resultado melhor ranqueado do *docking* do (-)-4-terpineol contra o modelo do GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no *Visual Molecular Dynamics*.



Legenda: As imagens mostram a vista superior (a) e lateral (b) do complexo formado entre o 4-terpineol e o receptor GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Na imagem é evidenciado o possível sítio de ligação do 4TRP (verde) na subunidade $\gamma 2$ (mais escura), diferente dos sítios do diazepam (azul) e do GABA (vermelho).

Fonte: Autoria própria (2016).

Figura 7 - Visualização dos *pockets* (sítios de ligação) previstos pelo GHECOM 1.0 (Rinaccess ≤ 3) na subunidade $\gamma 2$.



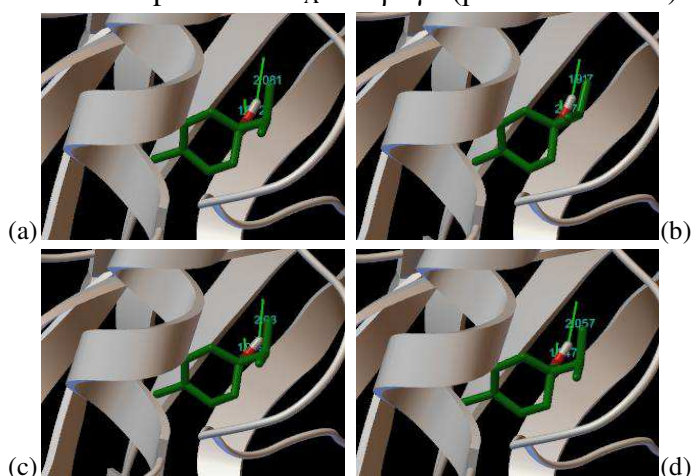
Legenda: O *pocket* destacado na cor lilás corresponde ao local de ligação para o 4TRP previsto pelo *docking* molecular.

Fonte: Dados da pesquisa (2016).

As melhores conformações geradas puderam ser agrupadas em *clusters*. A visualização em detalhes das mesmas foi obtida com auxílio da interface gráfica *Pymol*, conforme mostrado nas Figuras 8 e 9.

Na Figura 8 pode ser observado que no *cluster* mais bem ranqueado para o (-)4TRP foram agrupadas quatro conformações, nas quais parece haver pouca variação no posicionamento do ligante. Na Figura 9, por outro lado, observa-se uma maior variação no posicionamento do (+)4TRP no sítio, nas cinco conformações agrupadas no primeiro *cluster*. Esse tipo de variação foi então melhor analisada por meio da medição de distâncias entre os átomos no complexo.

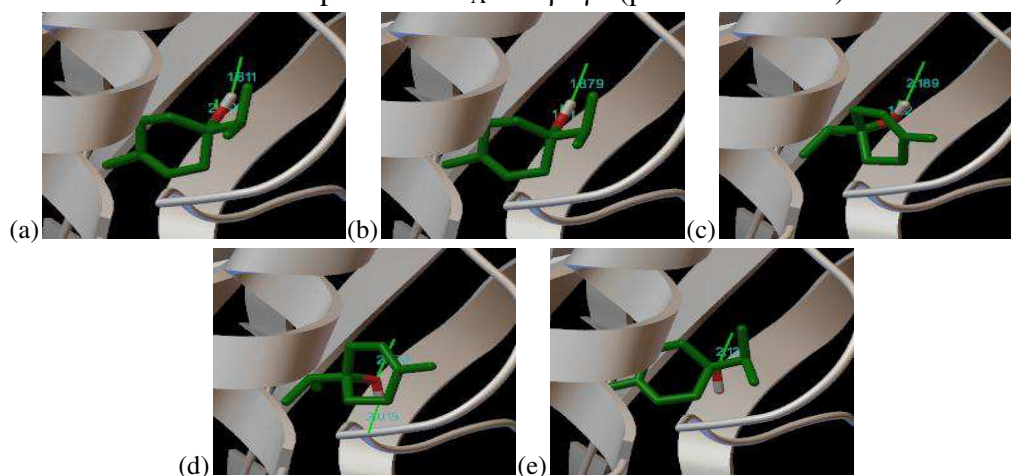
Figura 8 - Visualização dos complexos melhor ranqueados gerados no *docking* do (-)4TRP com o receptor GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (primeiro *cluster*).



Legenda: Imagens geradas a partir da mesma perspectiva na interface gráfica *Pymol*. O primeiro complexo ranqueado é exibido em (a), o segundo em (b), o terceiro em (c) e o quarto em (d). Ocorrem apenas mudanças tênues na conformação do ligante (-)4TRP.

Fonte: Autoria própria (2016).

Figura 9 - Visualização dos complexos melhor ranqueados gerados no *docking* do (+)4TRP com o receptor GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (primeiro *cluster*).



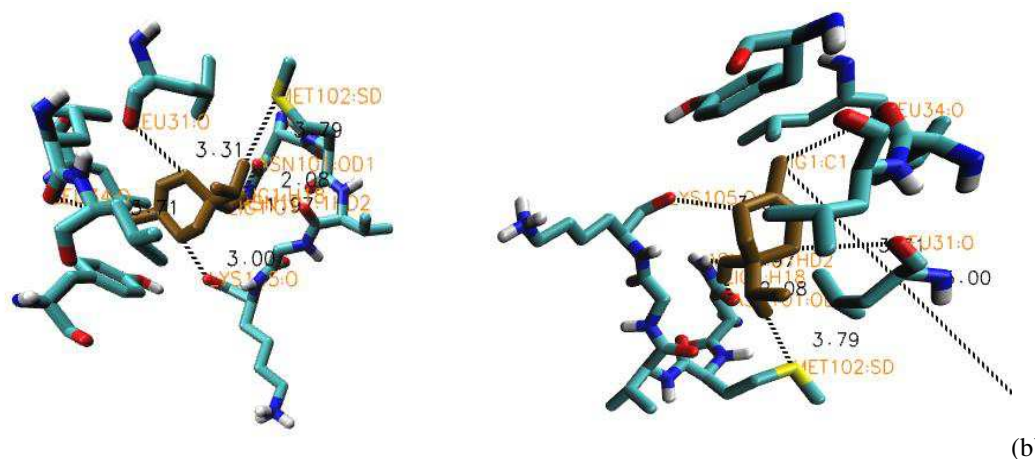
Legenda: Imagens geradas a partir da mesma perspectiva na interface gráfica *Pymol*. O primeiro complexo ranqueado é exibido em (a), o segundo em (b), o terceiro em (c), o quarto em (d) e o quinto em (e). Nas imagens pode-se observar que o (+)4TRP apresentou maior variação de conformações que o (-) 4TRP.

Fonte: Autoria própria (2016).

5.1.1 Complexos com menor energia do (-)-4-terpineol e GABA_AR α 1 β 2 γ 2

O primeiro dos complexos com menor energia do (-)-4-terpineol, ranqueado pelo AutoDock, foi visualizado e avaliado no VMD (Figura 10).

Figura 10 - Representação do sítio de ligação do (-)-4-terpineol com o GABA_AR α 1 β 2 γ 2 no primeiro complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio (a) e (b), aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria (2016).

A Figura 10 mostra detalhes do sítio de ligação, por meio da visualização do (-)4TRP no formato de bastões, na cor ocre, assim como dos resíduos de aminoácidos com átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As distâncias atômicas calculadas são exibidas na Tabela 5.

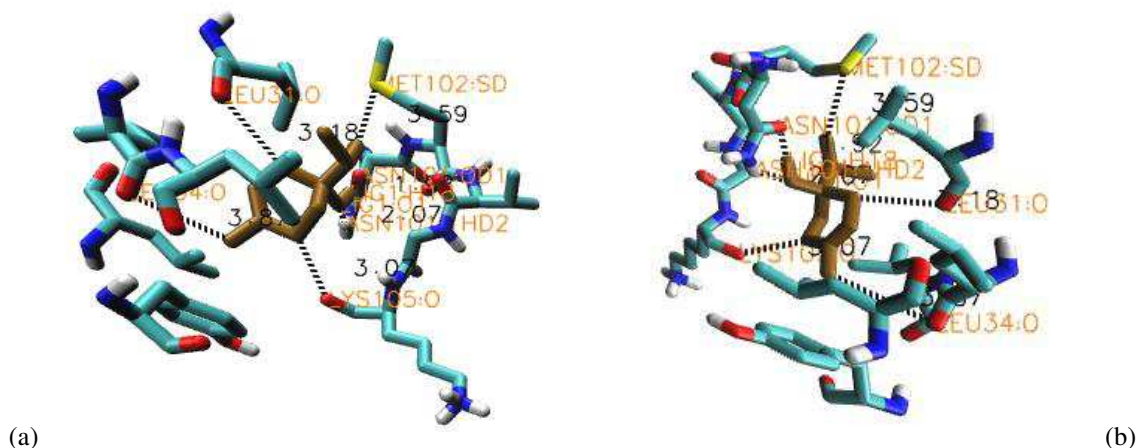
Tabela 5 - Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA_AR α 1 β 2 γ 2 com relação ao (-)4TRP no primeiro complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
ASN101: OD1	H18	2,08
ASN101: 1HD2	O1	1,97
LYS105: O	C7	3,00
LEU34: O	C1	3,70
MET102: SD	C9	3,79
LEU31: O	C4	3,31

Fonte: Autoria própria (2016).

O mesmo procedimento foi feito para o segundo complexo do *rank*. Como pode ser visualizado na Figura 11, que mostra detalhes do sítio de ligação, por meio da visualização do (-)4TRP, na cor ocre, assim como dos resíduos de aminoácidos contendo átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As distâncias atômicas calculadas são exibidas na Tabela 6.

Figura 11 - Representação do sítio de ligação do (-)-4-terpineol com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no segundo complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria (2016).

Tabela 6 - Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (-)4TRP no segundo complexo do *rank*.

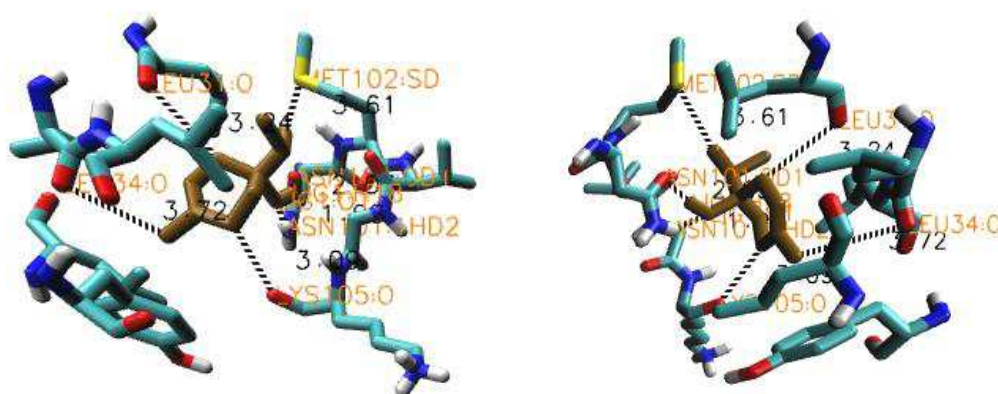
Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
ASN101: OD1	H18	1,92
ASN101: 1HD2	O1	2,07
LYS105: O	C7	3,07
LEU34: O	C1	3,87
MET102: SD	C9	3,59
LEU31: O	C4	3,18

Fonte: Autoria própria (2016).

Na Figura 12 são mostrados detalhes do sítio de ligação no terceiro complexo do *rank*, por meio da visualização do (-)4TRP no formato de bastões assim como dos resíduos de

aminoácidos com átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As distâncias atômicas calculadas com referência a aminoácidos circunvizinhos são exibidas na Tabela 7.

Figura 12 - Representação do sítio de ligação do (-)-4-terpineol com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no terceiro complexo do *rank*.



(a)

(b)

Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria (2016).

Tabela 7 - Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (-)-4TRP no terceiro complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
ASN101: OD1	H18	2,03
ASN101: 1HD2	O1	1,97
LYS105: O	C7	3,09
LEU34: O	C1	3,71
MET102: SD	C9	3,61
LEU31: O	C4	3,23

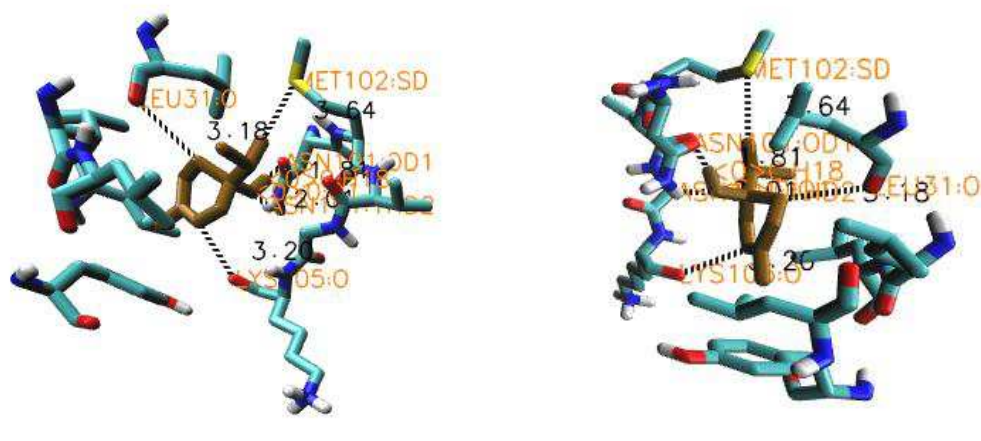
Fonte: Autoria própria (2016).

5.1.2 Complexos com menor energia do (+)-4-terpineol e GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$

A mesma avaliação no VMD foi feita para os três resultados melhor ranqueados no *docking* do (+)-4-terpineol com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. A Figura 13 mostra detalhes do sítio de

ligação do primeiro complexo ranqueado, por meio da visualização do (+)4TRP no formato de bastões (cor ocre) e dos resíduos de aminoácidos com átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As distâncias atômicas calculadas são exibidas na Tabela 8.

Figura 13 - Representação do sítio de ligação do (+)-4-terpineol com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no primeiro complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi calculada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria (2016).

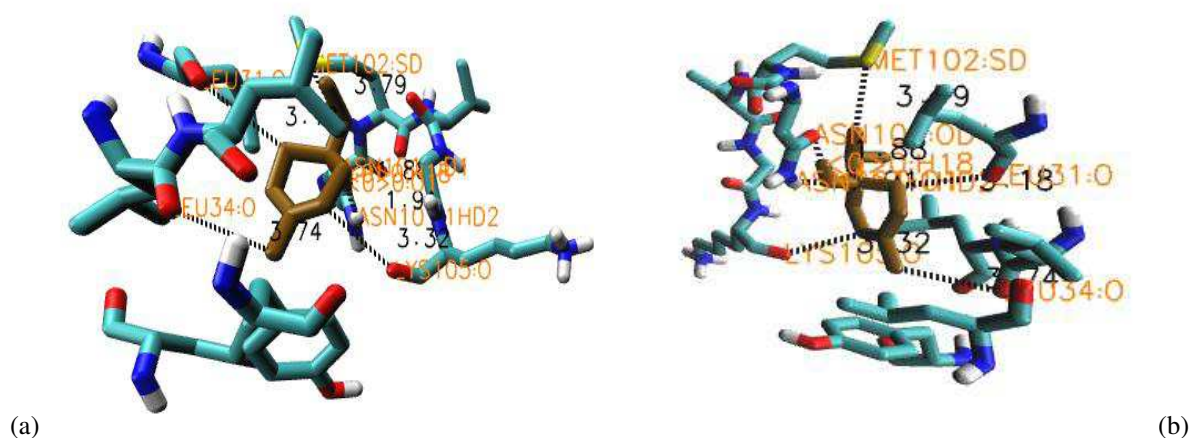
Tabela 8 - Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (+)4TRP no primeiro complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
ASN101: OD1	H18	1,81
ASN101: 1HD2	O1	2,01
LYS105: O	C3	3,20
MET102: SD	C10	3,64
LEU31: O	C6	3,18

Fonte: Autoria própria (2016).

O mesmo procedimento foi feito para o segundo complexo do *rank*. Como pode ser visualizado na Figura 14, que mostra detalhes do sítio de ligação. O (+)4TRP e os resíduos com átomos a uma distância inferior a 4 Å podem ser visualizados no formato de bastões. As distâncias com relação a átomos de aminoácidos circunvizinhos calculadas tendo como referência átomos do ligante são exibidas na Tabela 9.

Figura 14 - Representação do sítio de ligação do (+)-4-terpineol com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no segundo complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria (2016).

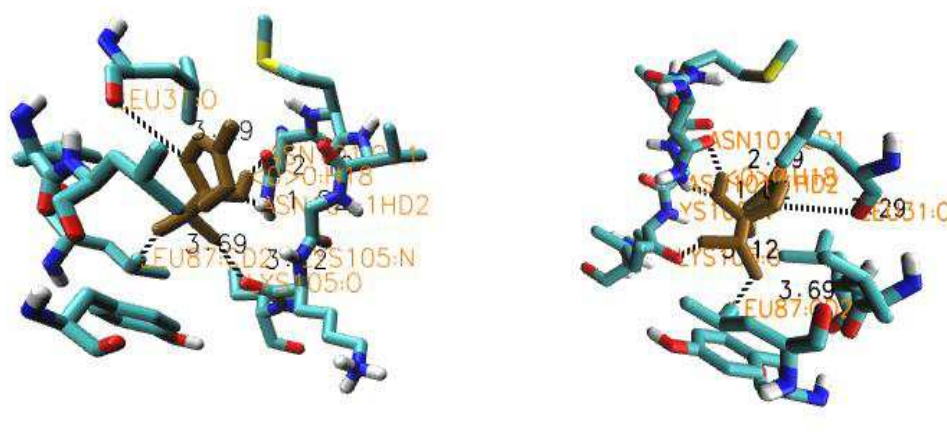
Tabela 9 - Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (+)4TRP no segundo complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
ASN101: OD1	H18	1,87
ASN101: 1HD2	O1	1,91
LYS105: O	C3	3,32
LEU34: O	C1	3,73
MET102: SD	C10	3,79
LEU31: O	C6	3,18

Fonte: Autoria própria (2016).

Na Figura 15 são mostrados detalhes do sítio de ligação no terceiro complexo do *rank*, por meio da visualização do (+)4TRP no formato de bastões assim como dos resíduos com átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As distâncias com relação a átomos de aminoácidos circunvizinhos calculadas tendo como referência átomos do ligante são exibidas na Tabela 10.

Figura 15 - Representação do sítio de ligação do (+)-4-terpineol com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ no terceiro complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria (2016).

Tabela 10 - Distâncias entre os átomos de resíduos do GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ com relação ao (+)4TRP no terceiro complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
ASN101: OD1	H18	2,18
ASN101: 1HD2	O1	1,82
LYS105: O	C10	3,12
LEU87: CD2	C9	3,69
LEU31: O	C4	3,28

Fonte: Autoria própria (2016).

Os resultados das distâncias atômicas previstas nos complexos analisados para ambos enantiômeros indica uma melhor adaptação do (-)-4-terpineol ao sítio de ligação previsto, pela robustez na previsão da conformação. O (+)-4-terpineol, também se ligou ao mesmo sítio hidrofóbico, porém apresentou uma conformação diferente no terceiro complexo (rotação).

Nos complexos avaliados foi observada a interação dos átomos do radical (-OH), em ambos enantiômeros, com átomos de hidrogênio e oxigênio da asparagina 101 a distâncias de aproximadamente 2 Å, indicando a formação de duas pontes de hidrogênio com esse resíduo, assim esse resíduo pode ser assumido como um resíduo âncora para a formação do complexo (AMADOR, 2015; BUENO; OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2012).

Dentre os demais aminoácidos que compõem o sítio, encontram-se leucinas 31, 34, 35, 87, glicina 104 e valina 103 que apresentam cadeias laterais apolares (MORAES *et al.*, 2013), caracterizando um sítio de natureza hidrofóbica. De acordo com Kitchen e colaboradores (2004), sítios de ligação hidrofóbicos são os alvos mais promissores para os cálculos de *docking*. Isso ocorre, principalmente, devido à ligação nesses sítios poder ser prevista pela complementaridade de forma entre ligante e receptor e à existência metodologias robustas disponíveis para esses casos.

Os resultados evidenciados por essas simulações de *docking* molecular permitiram prever um possível sítio de ligação do 4TRP na porção extracelular da subunidade $\gamma 2$. Estima-se que essa subunidade é expressa na imensa maioria dos receptores, de 75-80% dos GABA_ARs presentes no sistema nervoso. Segundo Olsen e Sieghart (2008), além do GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, já foi identificada a presença de pelo menos cinco outros subtipos cuja formação envolve a subunidade $\gamma 2$: $\alpha 2\beta\gamma 2$, $\alpha 3\beta\gamma 2$, $\alpha 4\beta\gamma 2$, $\alpha 5\beta\gamma 2$, $\alpha 6\beta\gamma 2$. Assim, espera-se que o 4TRP interaja com esses outros subtipos.

Entretanto, tomando em consideração as interações alostéricas que influenciam a abertura desse tipo de canal, o efeito e a potência da possível ligação do 4TRP pode ser variável, dependendo das outras subunidades formadoras do receptor. Pode-se ter como referência o trabalho de Hammer e colabores (2015), que avaliou a atividade da metaqualona em diferentes subtipos de receptores GABA_A. A metaqualona, embora possivelmente possa atuar num sítio comum entre as subunidades α e β , apresentou diferentes efeitos dependendo das outras subunidades que compõem o receptor, podendo ter atuação de agonista, modulador alostérico ou mesmo antagonista.

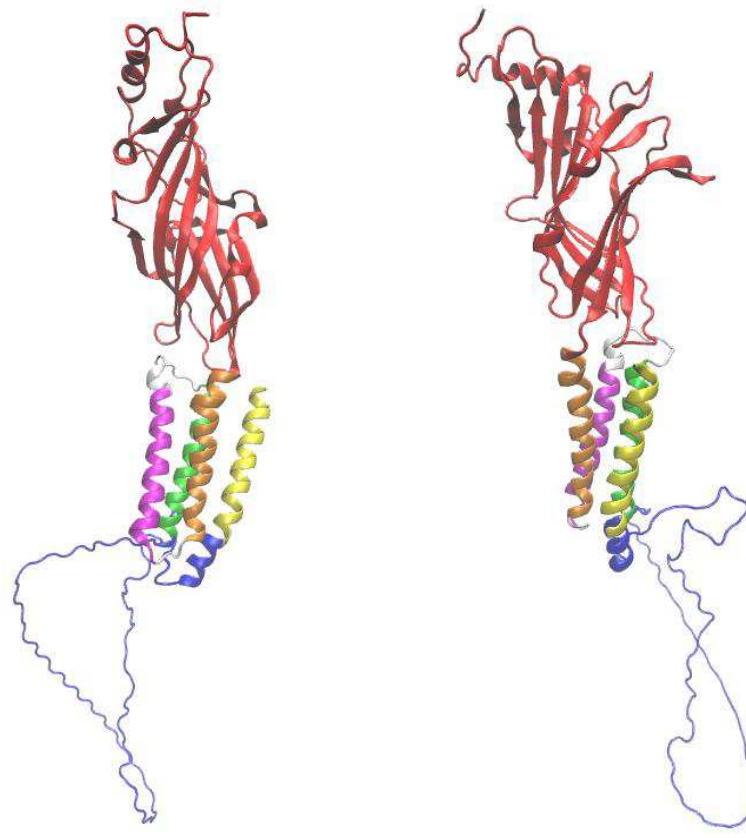
Levando em consideração o efeito inibitório no sistema nervoso da neurotransmissão mediada pelo GABA (BERGMANN *et al.*, 2013; CURI, 2011; SIGEL; STEINMANN, 2012), o efeito demonstrado do (-)-4-terpineol como anticonvulsivante com mecanismo de ação relacionado a via GABAérgica (NOBREGA *et al.*, 2014), esses resultados de *docking* molecular indicam que um possível mecanismo de ação do 4TRP no Sistema Nervoso é relacionado à subunidade $\gamma 2$ dos GABA_ARs, por meio da ativação ou modulação positiva de pelo menos um subtipo dos GABA_ARs que contenha o sítio na $\gamma 2$.

Adicionalmente, foi feita uma busca de mutações presentes na sequência da subunidade $\gamma 2$ relacionadas a quadros de epilepsia (MACDONALD; KANG; GALLAGER, 2010). Contudo, nenhuma das mutações listadas envolve aminoácidos do sítio ativo previsto para o 4-terpineol. Investigações da influência dessas mutações na interação do 4TRP com o sítio podem ser feitas posteriormente por meio de Dinâmica Molecular.

5.2 MODELO TEÓRICO DA SUBUNIDADE DELTA (δ)

Por meio da metodologia de modelagem comparativa, foi possível obter um modelo teórico para a estrutura tridimensional da subunidade δ do GABA_AR, exibido na Figura 16. O modelo gerado é fiel à organização topológica apresentada pelas subunidades dos GABA_ARs. De acordo com Sigel e Steinmann (2012), aproximadamente metade dos aminoácidos da subunidade formam um domínio N-terminal hidrofílico extracelular (vermelho), seguido de quatro sequências transmembrana (M1 - laranja; M2 - magenta; M3 - verde e M4 - amarelo). Existe um *loop* intracelular (azul) envolvido em modulação por fosforilação e interação com proteínas, situado entre as sequências M3 e M4. Ambas as extremidades, N-terminal e C-terminal, são localizadas extracelularmente.

Figura 16 - Visualização no VMD do modelo obtido para a subunidade δ do GABA_AR.



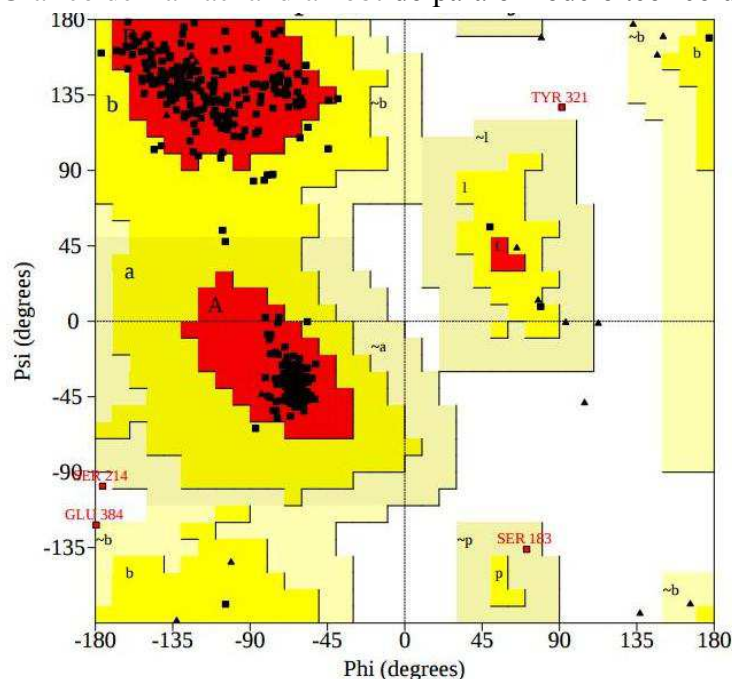
Legenda: Visualização em duas perspectivas (a) e (b) do modelo obtido para a subunidade δ , por meio de modelagem comparativa. Em vermelho, está representado o domínio N-terminal extracelular, em azul, a região de *loop* intracelular e nas cores laranja, magenta, verde e amarelo, as sequências transmembrana M1 a M4, respectivamente.

Fonte: Autoria própria (2016).

Na avaliação do modelo, por meio do PROCHEK (LASKOWSKI *et al.*, 1993), foi obtido o gráfico de Ramachandran, mostrado no Gráfico 1. O modelo obtido apresentou

93,7% dos resíduos em regiões energeticamente favoráveis, 5,3% em regiões permitidas, 0,5% em regiões generosamente permitidas e apenas 0,5% em regiões proibidas. Segundo Laskowski *et al.* (1993), por meio gráfico de Ramachandran, pode ser considerado um bom modelo aquele que obtiver mais de 90% de seus resíduos de aminoácidos situados nas regiões favoráveis (A, B e L).

Gráfico 1 - Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo teórico da subunidade δ .



Legenda: No gráfico os resíduos do modelo, exibidos como pequenos quadrados pretos, são classificados em regiões energeticamente favoráveis (vermelho), regiões permitidas (amarelo), regiões generosamente permitidas (creme) e regiões proibidas (branco). No modelo avaliado 93,7% dos resíduos encontram-se em regiões energeticamente favoráveis.

Fonte: Dados da pesquisa.

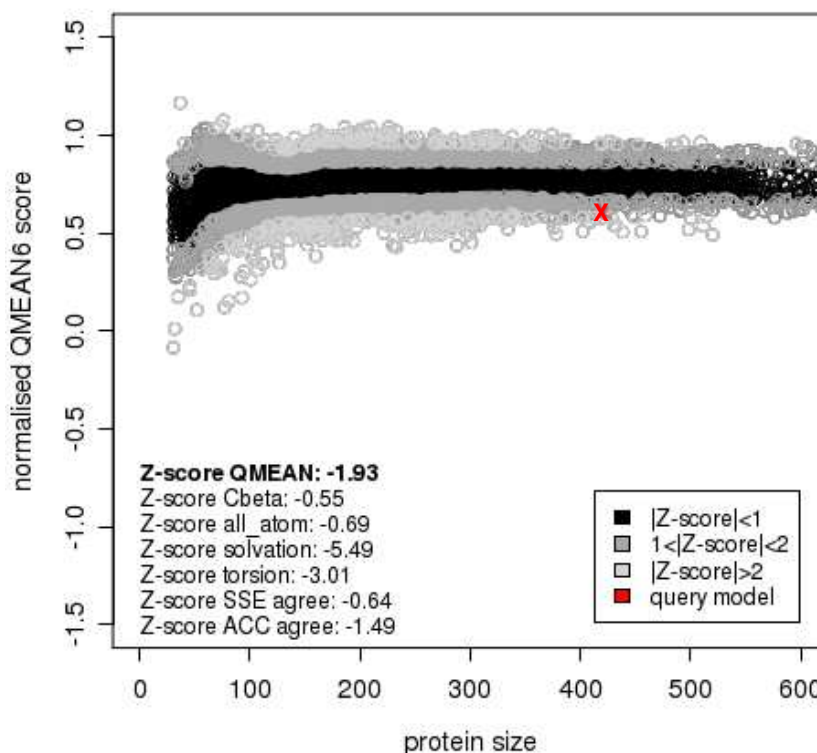
A qualidade da estrutura obtida, estimada pelo gráfico de Ramachandran, se apresentou semelhante a do modelo de Bergmann *et al.* (2013), também utilizado em simulações de *docking* neste trabalho.

Além do gráfico acima representado, a qualidade do modelo foi também avaliada por meio do QMEAN6, no qual o *score* obtido foi 0,604. O QMEAN6 é uma função de avaliação da qualidade absoluta do modelo por meio da relação de várias características estruturais do mesmo com estruturas obtidas experimentalmente de proteínas de tamanho semelhante. De acordo com Benkert e colaboradores (2008), quanto mais próximo de 1 for o valor do QMEAN, melhor a qualidade do modelo.

No cálculo do “QMEAN Z score”, mostrado no Gráfico 2, as características do modelo são comparadas com as de estruturas de cristalografia de raios-X de alta resolução,

não redundantes, depositadas no PDB. Assim, QMEAN *Z score* permite estimar o grau de proximidade do modelo com estruturas nativas, indicando se a qualidade é comparável à de estruturas experimentais (BENKERT *et al.*, 2008; 2009).

Gráfico 2 - Gráfico de distribuição do QMEAN *Z-score*.



Legenda: Os círculos em escala de cinza representam os *scores* do QMEAN para estruturas diferentes tamanhos depositadas no PDB. O “x” em vermelho representa a plotagem do modelo da subunidade δ próximo a estruturas experimentais no PDB de tamanho similar.

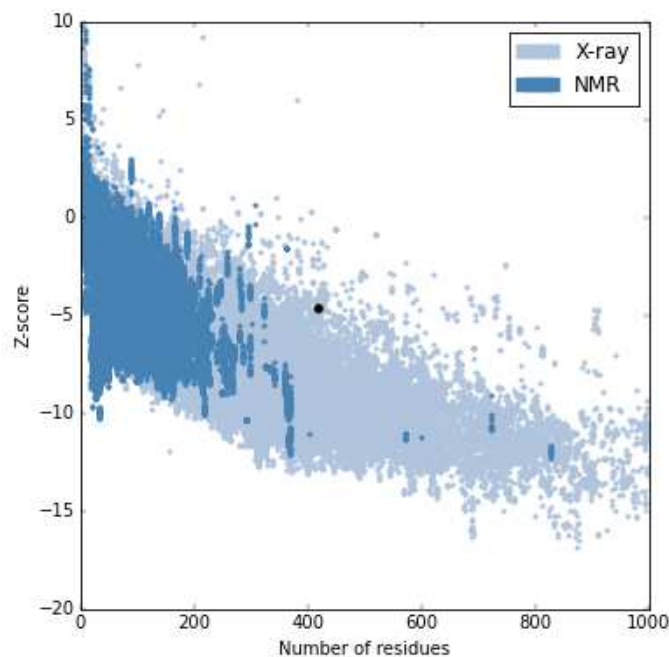
Fonte: Dados da pesquisa.

A localização do modelo no Gráfico 2 e o QMEAN *Z score* de -1,93 condizem com o comportamento das estruturas de proteínas transmembrana, que tendem a localizar-se em regiões de valores negativos do gráfico. Essas proteínas, como é o caso da subunidade modelada, apresentam propriedades (interações atômicas e solvatação) diferentes daquelas apresentadas pelas proteínas solúveis, não seguindo a mesma distribuição (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011).

No Gráfico 3, é mostrado o resultado de *Z-score* obtido pela avaliação do ProSA (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) que estima a qualidade global do modelo e mensura o desvio da energia total da estrutura, sendo que valores que ultrapassam a variação de estruturas nativas de proteínas indicam a presença de erros no modelo. Como pode ser observado no

Gráfico 3, o modelo apresenta valores dentro do padrão das estruturas obtidas por cristalografia de raios-X de proteínas com número de resíduos, depositadas no PDB.

Gráfico 3 - Gráfico do Z-score global obtido no ProSA para o modelo da subunidade δ relacionado a estruturas depositadas no PDB.



Legenda: O modelo da subunidade δ é representado no gráfico como o ponto na cor preta. As zonas sombreadas representam a plotagem de todas as estruturas experimentais atualmente no PDB, a região mais escura mostra as estruturas de RMN e a mais clara as de cristalografia de raios-X.

Fonte: Dados da pesquisa.

As proteínas integrais de membrana, como o receptor estudado, são uma importante classe de proteínas incluindo vários outros tipos de receptores que atuam na sinalização celular e transdução de sinais, sendo alvos de várias drogas. Infelizmente, ainda existem muitos desafios para determinação de sua estrutura através de metodologias como cristalografia de raios-X ou por RMN. Essa classe de proteínas é igualmente difícil de modelar *in silico*, devido a existência de poucas estruturas conhecidas, disponíveis como molde (MARTIN, 2003).

Dessa forma, a obtenção do modelo com essa qualidade foi apenas possível a partir da obtenção recente da estrutura experimental do GABA_AR homopentâmero $\beta 3$ humano (MILLER; ARICESCU, 2014).

5.3 DOCKING DO 4-TERPINEOL E SUBUNIDADE δ

Os dados mostrados na Tabela 11 foram gerados a partir da simulação de *docking* entre o (-)-4-terpineol e a subunidade δ do receptor do GABA_A e ranqueados em ordem crescente de energia. A partir desses resultados pode-se observar que a menor energia livre de ligação calculada para o (-)-4-terpineol foi -6,06 kcal/mol, valor negativo que indica que é mais termodinamicamente favorável a existência das moléculas em um complexo. Esse valor de energia é maior que o obtido para a interação com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, no qual a menor energia de ligação na interação do (-)4TRP com a subunidade $\gamma 2$ foi -6,25 kcal/mol.

Tabela 11 - Resultado dos dez melhores complexos do (-)-4-terpineol com a subunidade δ .

Complexo	Energia livre de ligação	Energia intermolecular	Ki	Pontes de hidrogênio
1	-6,06 kcal/mol	-6,65 kcal/mol	36,24 μ M	-
2	-6,05 kcal/mol	-6,65 kcal/mol	36,70 μ M	-
3	-6,02 kcal/mol	-6,61 kcal/mol	38,79 μ M	-
4	-5,99 kcal/mol	-6,58 kcal/mol	40,87 μ M	-
5	-5,97 kcal/mol	-6,56 kcal/mol	42,35 μ M	-
6	-5,93 kcal/mol	-6,53 kcal/mol	44,81 μ M	-
7	-5,89 kcal/mol	-6,49 kcal/mol	47,86 μ M	-
8	-5,85 kcal/mol	-6,45 kcal/mol	51,24 μ M	-
9	-4,53 kcal/mol	-5,12 kcal/mol	479,71 μ M	ASN49 O - <O> H18 ASN49 HN - <O> O1
10	-4,46 kcal/mol	-5,05 kcal/mol	541,93 μ M	GLU167 OE2 - <O> H18

Fonte: Autoria própria (2016).

A partir da análise do *docking* no programa AutoDock Tools 1.5.6 não foi prevista a formação de pontes de hidrogênios com aminoácidos do receptor nos primeiros oito complexos do *rank*, diferentemente dos resultados do *docking* com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, no qual o (-)4TRP formou pontes de hidrogênio com o resíduo ASN101 da subunidade $\gamma 2$.

Análise semelhante foi feita para a simulação de *docking* entre o outro enantiômero (+)-4-terpineol e o modelo da subunidade δ (Tabela 12). O resultado também evidencia uma termodinâmica favorável do complexo, porém com um valor maior de energia livre de ligação, de -5,94 kcal/mol. Essa energia de ligação mostra-se próxima da obtida para a interação do (+)4TRP com a subunidade $\gamma 2$, que foi de -5,89 kcal/mol. Não foi prevista a formação de pontes de hidrogênio nos quatro primeiros complexos do *rank*.

Tabela 12 - Resultado dos dez melhores complexos do (+)-4-terpineol com a subunidade δ .

Complexo	Energia livre de ligação	Energia intermolecular	Ki	Pontes de hidrogênio
1	-5,94 kcal/mol	-6,54 kcal/mol	44,36 μ M	-
2	-5,89 kcal/mol	-6,49 kcal/mol	48,37 μ M	-
3	-5,88 kcal/mol	-6,48 kcal/mol	48,85 μ M	-
4	-5,52 kcal/mol	-6,12 kcal/mol	90,04 μ M	-
5	-5,2 kcal/mol	-5,8 kcal/mol	154,0 μ M	ILE200 HN - <0> O1 ILE200 O - <0> H18
6	-5,13 kcal/mol	-5,73 kcal/mol	172,58 μ M	ILE200 HN - <0> O1 ILE200 O - <0> H18
7	-4,72 kcal/mol	-5,32 kcal/mol	346,61 μ M	LEU193 O - <0> H18
8	-4,72 kcal/mol	-5,32 kcal/mol	345,79 μ M	LEU193 O - <0> H18
9	-4,62 kcal/mol	-5,22 kcal/mol	407,94 μ M	THR199 HG1 - <0> O1
10	-4,56 kcal/mol	-5,16 kcal/mol	455,2 μ M	GLU167 OE2 - <0> H18

Fonte: Autoria própria (2016).

Quadro 6 - Resíduos a uma distância inferior a 4,0 Å do (-)-4-terpineol nos complexos com a subunidade δ melhor ranqueados pelo AutoDock 4.2.

Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3	Complexo 4	Complexo 5
LEU 52	LEU 52	LEU 52	LEU 52	LEU 52
ALA 53	ALA 53	ALA 53	ALA 53	ALA 53
LEU 54	LEU 54	LEU 54	LEU 54	LEU 54
LEU 75	LEU 75	LEU 75	LEU 75	LEU 75
HIS 76	HIS 76	HIS 76	HIS 76	HIS 76
LEU 164	LEU 164	LEU 164	LEU 164	GLN 77
LEU 166	LEU 166	LEU 166	LEU 166	LEU 164
TRP 180	TRP 180	TRP 180	TRP 180	LEU 166
HIS 186	HIS 186	HIS 186	HIS 186	TRP 180
ILE 187	ILE 187	LEU 221	ILE 187	HIS 186
LEU 221	LEU 221	LEU 223	LEU 221	ILE 187
SER 222	LEU 223		SER 222	LEU 221
LEU 223			LEU 223	LEU 223

Fonte: Autoria própria (2016).

Os dez complexos gerados no *docking* de cada enantiômero foram salvos em formato *.pdbqt* e visualizados no programa VMD, foram então listados os resíduos de aminoácidos encontrados a uma distância inferior a 4,0 Å da molécula do ligante (Quadros 6 e 7).

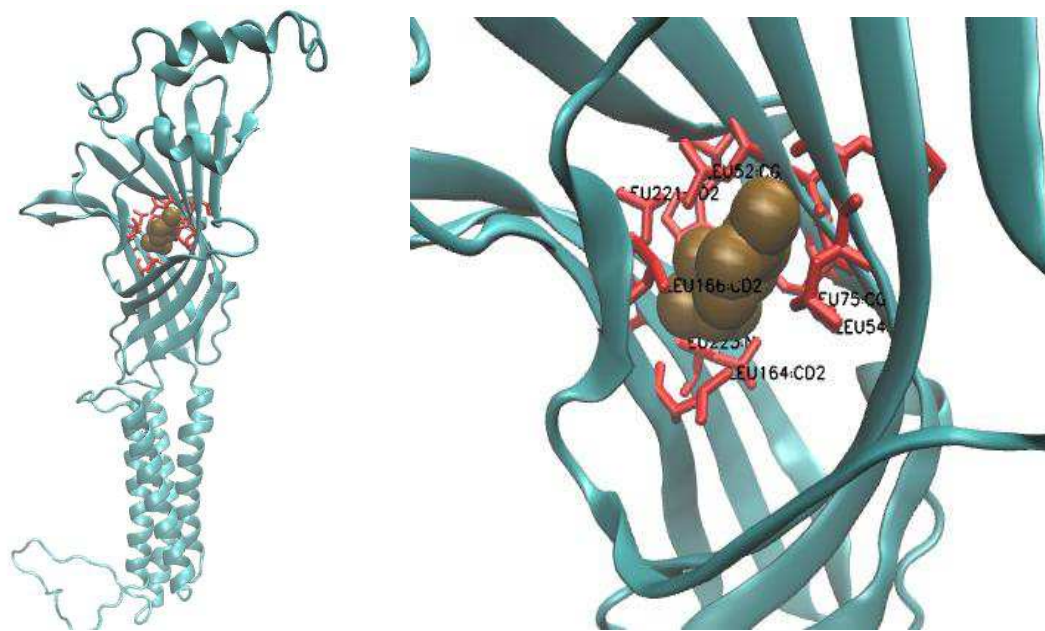
Quadro 7 - Resíduos a uma distância inferior a 4,0 Å do (+)-4-terpineol nos complexos com a subunidade δ melhor ranqueados pelo AutoDock 4.2.

Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3	Complexo 4	Complexo 5
LEU 52	LEU 52	LEU 52	LEU 52	LEU 190
ALA 53	ALA 53	ALA 53	ALA 53	ASP 191
LEU 54	LEU 54	LEU 54	LEU 54	LEU 193
LEU 75	LEU 75	LEU 75	LEU 75	GLN 194
HIS 76	HIS 76	HIS 76	HIS 76	LEU 195
GLN 77	LEU 164	LEU 164	LEU 164	PHE 198
LEU 164	LEU 166	LEU 166	LEU 166	THR 199
LEU 166	TRP 180	TRP 180	TRP 180	ILE 200
TRP 180	HIS 186	HIS 186	HIS 186	
HIS 186	ILE 187	LEU 221	ILE 187	
ILE 187	LEU 223	SER 222	LEU 223	
LEU 221		LEU 223		
LEU 223				

Fonte: Autoria própria (2016).

Nos cinco melhores complexos é sugerida a interação do (-)-4TRP com a subunidade δ (Figura 17) a uma distância inferior a 4,0 Å dos aminoácidos Leu52, Ala53, Leu54, Leu75, His76, Leu164, Leu166, Trp180, His186, Leu221, Leu223, maioria de natureza hidrofóbica indicando um possível sítio de ligação. Conforme a Figura 18, o sítio coincide com um dos sítios previstos pelo GHECOM 1.0. O gráfico dos resíduos que compõem cada *pocket* na estrutura da subunidade δ pode ser visualizado no Apêndice B (KAWABATA, 2010).

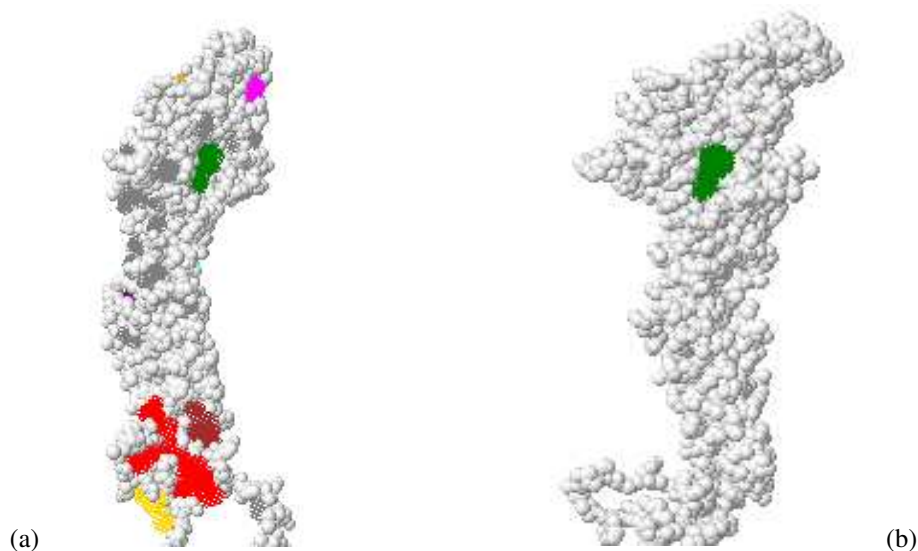
Figura 17 - Visualização primeiro resultado ranqueado do *docking* do (-)-4-terpineol contra o modelo da subunidade δ do GABA_AR no *Visual Molecular Dynamics*.



Legenda: Visualização do sítio do 4TRP: localização na subunidade (a) e em detalhes (b). O (-)-4-terpineol é exibido na representação de van der Waals, na cor ocre, a subunidade representada na sua estrutura de hélices- α e folhas- β , em azul. Os aminoácidos com átomos que circundam o 4TRP numa distância inferior a 4Å são exibidos em vermelho.

Fonte: Autoria própria (2016).

Figura 18 - Visualização dos *pockets* (sítios de ligação) previstos pelo GHECOM 1.0 no modelo da subunidade δ .



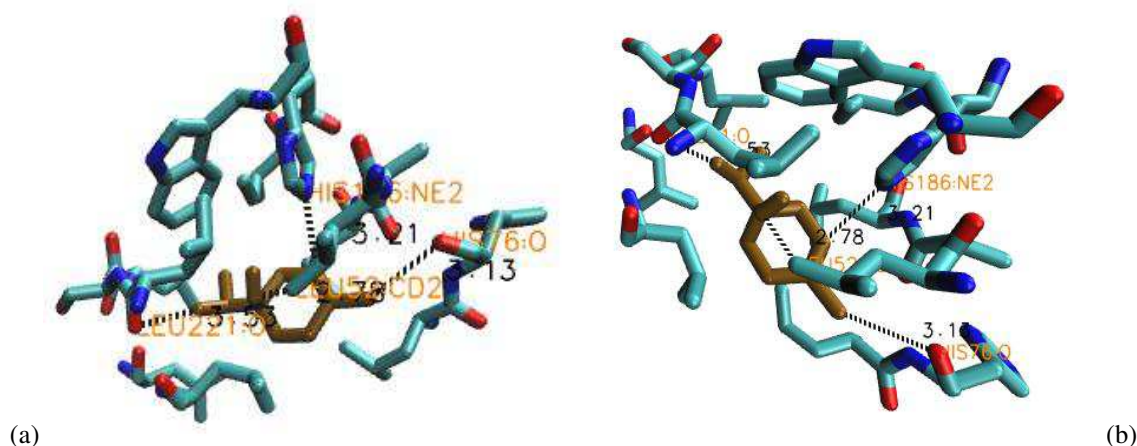
Legenda: Em (a) são mostrados possíveis sítios de ligação previstos no GHECOM. Em (b) o *pocket* destacado na cor verde corresponde ao local de ligação para o 4TRP previsto pelo *docking* molecular.

Fonte: Autoria própria (2016).

5.3.1 Complexos com menor energia do (-)-4-terpineol e subunidade δ

O primeiro dos complexos com menor energia do (-)-4-terpineol, ranqueado pelo AutoDock, foi visualizado e avaliado no VMD (Figura 19).

Figura 19 - Representação do sítio de ligação entre (-)-4-terpineol e subunidade δ no primeiro complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio (a) e (b), aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 19 mostra detalhes do sítio de ligação, por meio da visualização do (-)4TRP no formato de bastões assim como dos resíduos de aminoácidos com átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As distâncias atômicas calculadas são exibidas na Tabela 13.

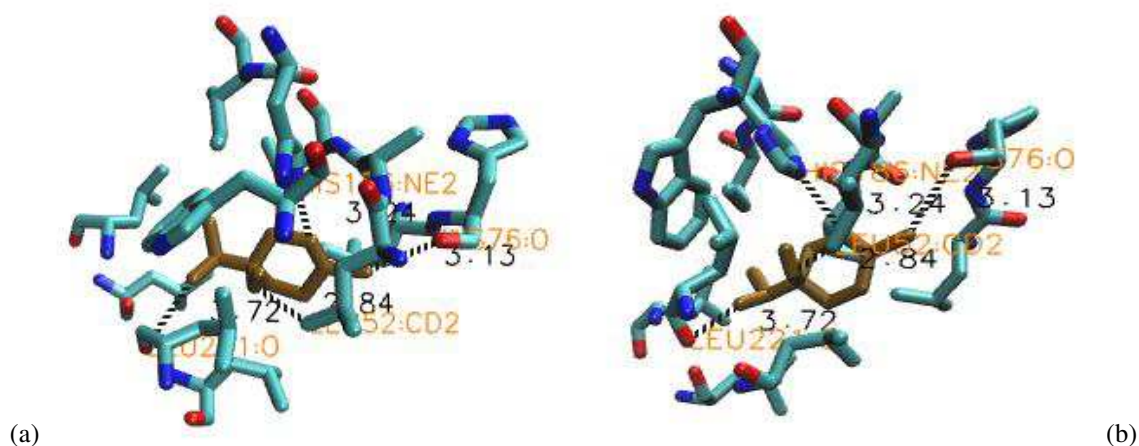
Tabela 13 - Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (-)4TRP no primeiro complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
HIS186: NE2	C3	3,21
HIS76: O	C1	3,13
LEU221: O	C9	3,53
LEU52: CD2	O1	2,78

Fonte: Autoria própria (2016).

O mesmo procedimento foi feito para o segundo complexo do *rank*, como pode ser visualizado na Figura 20, que mostra detalhes do sítio de ligação. As distâncias atômicas calculadas são exibidas na Tabela 14.

Figura 20 - Representação do sítio de ligação entre (-)-4-terpineol e subunidade δ no segundo complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 14 - Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (-)-4TRP no segundo complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
HIS186: NE2	C3	3,24
HIS76: O	C1	3,13
LEU221: O	C9	3,72
LEU52: CD2	O1	2,84

Fonte: Autoria própria (2016).

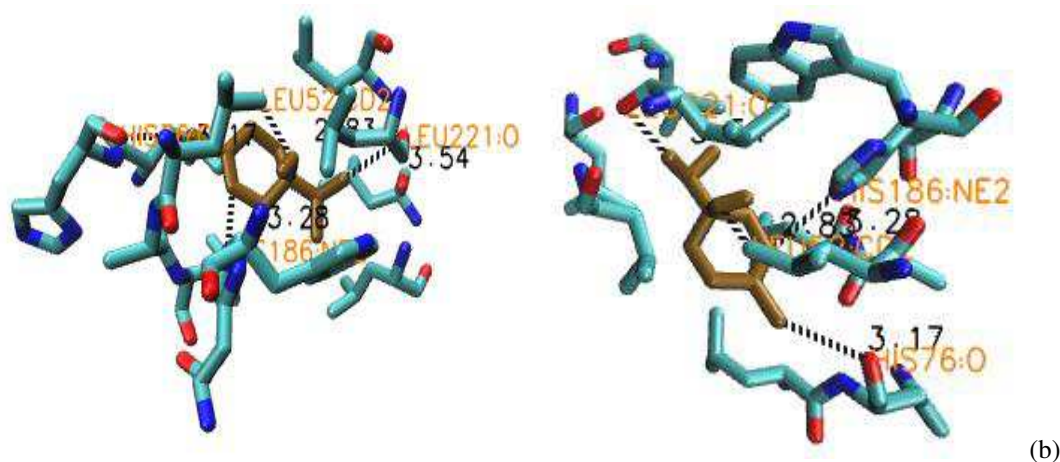
Na Figura 21 são mostrados detalhes do sítio de ligação no terceiro complexo do *rank*, do (-)-4TRP no formato de bastões assim como dos resíduos de aminoácidos com átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As distâncias atômicas são exibidas na Tabela 15.

Tabela 15 - Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (-)4TRP no terceiro complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
HIS186: NE2	C3	3,28
HIS76: O	C1	3,17
LEU221: O	C9	3,54
LEU52: CD2	O1	2,83

Fonte: Autoria própria (2016).

Figura 21 - Representação do sítio de ligação entre (-)-4-terpineol e subunidade δ no terceiro complexo do *rank*.



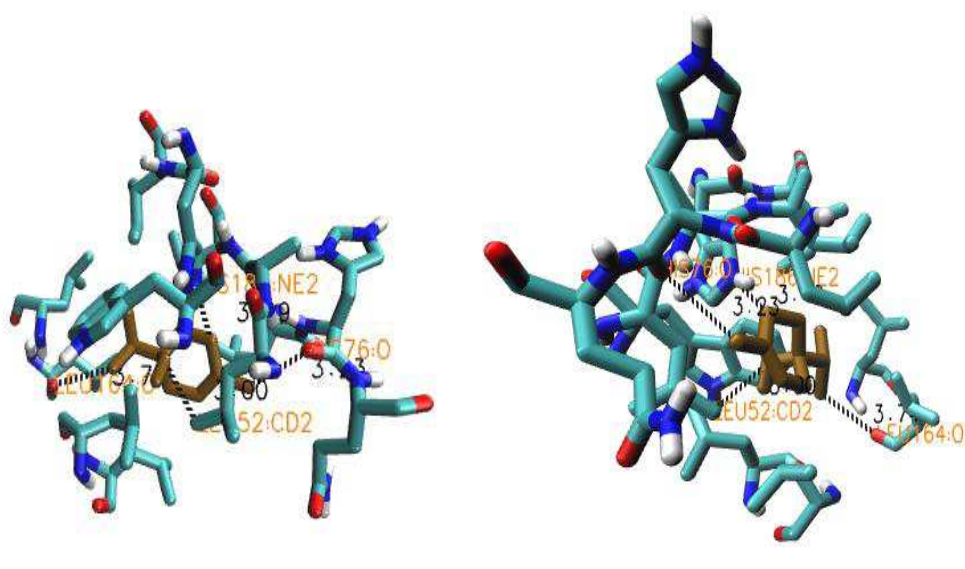
Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Complexos com menor energia do (+)-4-terpineol e subunidade δ

A mesma avaliação no VMD foi feita para os três resultados melhor ranqueados no *docking* do (+)-4-terpineol com a subunidade δ do GABA_AR. A Figura 22 mostra detalhes do sítio de ligação do primeiro complexo ranqueado, por meio da visualização do (+)4TRP no formato de bastões assim como dos resíduos de aminoácidos com átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As distâncias atômicas calculadas são exibidas na Tabela 16.

Figura 22 - Representação do sítio de ligação entre (+)-4-terpineol e subunidade δ no primeiro complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi calculada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria.

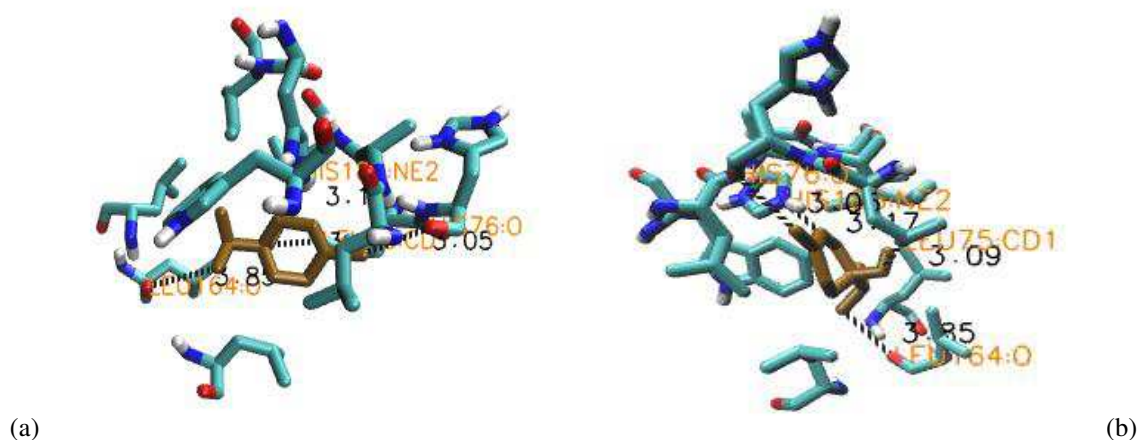
Tabela 16 - Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (+)4TRP no primeiro complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
HIS186: NE2	C7	3,49
HIS76: O	C1	3,23
LEU164: O	C10	3,74
LEU52: CD2	O1	3,00

Fonte: Autoria própria (2016).

O mesmo procedimento foi feito para o segundo complexo do *rank*. Como pode ser visualizado na Figura 23, que mostra detalhes do sítio de ligação, por meio da visualização do (+)4TRP e dos resíduos de aminoácidos circunvizinhos. As distâncias atômicas calculadas são exibidas na Tabela 17.

Figura 23 - Representação do sítio de ligação entre (+)-4-terpineol e subunidade δ no segundo complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor ocre, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria.

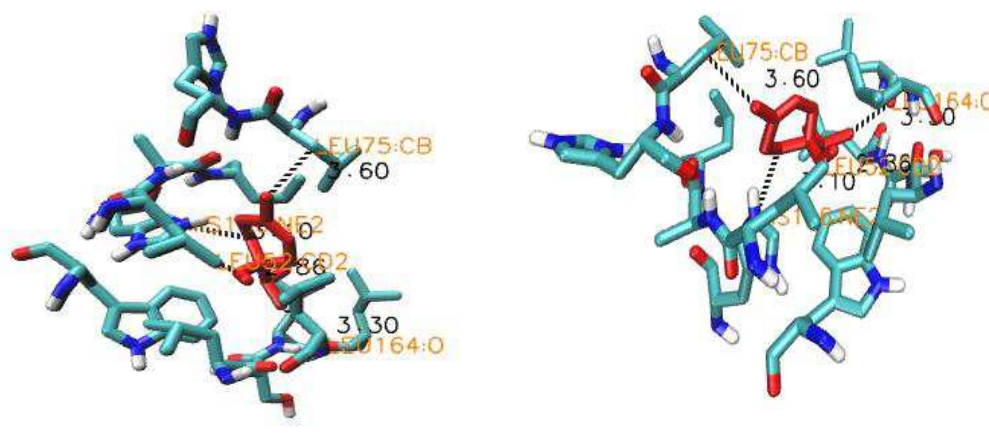
Tabela 17 - Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (+)4TRP no segundo complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
HIS186: NE2	C7	3,17
HIS76: O	C1	3,05
LEU164: O	C9	3,85
LEU75: CD1	O1	3,09

Fonte: Autoria própria (2016).

Na Figura 24 são mostrados detalhes do sítio de ligação no terceiro complexo do *rank*, por meio da visualização do (+)4TRP no formato de bastões assim como dos resíduos de aminoácidos com átomos a uma distância inferior a 4 Å do ligante. As respectivas distâncias atômicas calculadas são exibidas na Tabela 18.

Figura 24 - Representação do sítio de ligação entre (+)-4-terpineol e subunidade δ no terceiro complexo do *rank*.



Legenda: Podem ser observadas duas perspectivas do sítio, aminoácidos circunvizinhos e os átomos cuja distância foi avaliada. O 4TRP é representado na visualização de bastões, na cor vermelha, e os aminoácidos circunvizinhos, também em bastões coloridos segundo o elemento químico.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 18 - Distâncias entre os átomos de resíduos da subunidade δ com relação ao (+)4TRP no terceiro complexo do *rank*.

Átomos de resíduos próximos	Átomo do Ligante	Distância respectiva (Å)
HIS186: NE2	C6	3,10
LEU75: CB	C1	3,60
LEU164: O	C9	3,30
LEU52: CD2	O1	2,86

Fonte: Autoria própria (2016).

Segundo Olsen e Sieghart (2008), foi identificada a presença de quatro subtipos diferentes de receptores do GABA_A que apresentam a subunidade δ na formação do canal: $\alpha 4\beta 2\delta$, $\alpha 4\beta 3\delta$, $\alpha 6\beta 2\delta$, $\alpha 6\beta 3\delta$. Esses receptores, diferentemente daqueles que tem a subunidade $\gamma 2$ na sua formação, apresentam localização exclusivamente extrassináptica (BRICKLEY; MODY, 2012). Outra característica importante dos receptores formados pela subunidade δ , é a de não serem sensíveis aos benzodiazepínicos, por não apresentarem o sítio de ligação na interface α - $\gamma 2$ (SIGEL, 2002).

Os subtipos dos GABA_ARs $\alpha 4\beta \delta$ e $\alpha 6\beta \delta$ apresentam uma modulação significativa por drogas não benzodiazepínicas e existem evidências que tanto os GABA_ARs com a subunidade $\gamma 2$ como os GABA_ARs com a subunidade δ estão claramente presentes e são fisiologicamente relevantes. Um aspecto importante dos receptores extrassinápticos, como os δ -GABA_ARs, é

que muitos deles apresentam uma alta afinidade para o GABA e são resistentes a dessensibilização, isso determina seu papel na inibição tônica (OLSEN; SIEGHART, 2008).

Adicionalmente, o neurotransmissor GABA tem uma menor eficácia nesses receptores, o que os torna mais suscetíveis à modulação alostérica por drogas não benzodiazepínicas (BELELLI *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2002; OLSEN; SIEGHART, 2008). Essas drogas promovem, através dos canais extrassinápticos, uma maior transferência de cargas que provocam a hiperpolarização. Assim, diferentemente do que se acreditava, a ação de algumas importantes drogas parece envolver, em maior grau, a modulação dos receptores extrassinápticos ao invés daqueles presentes nas sinapses (OLSEN; SIEGHART, 2008).

Similarmente ao realizado para o possível sítio na $\gamma 2$, foi feita uma busca por mutações relacionadas à epilepsias genéticas que envolvem alterações na sequência de aminoácidos da subunidade δ (MACDONALD; KANG; GALLAGER, 2010). Não foram encontradas mutações nos aminoácidos do possível sítio de ligação do monoterpeneo 4-terpineol previsto nem na subunidade $\gamma 2$ nem na subunidade δ .

Na Tabela 19 são exibidas as menores energias livres de ligação obtidas pelo AutoDock 4.2 nas diferentes simulações de *docking* molecular realizadas. Pode-se observar que a menor energia foi obtida no complexo do (-)4TRP com a subunidade $\gamma 2$, de -6,25 kcal/mol. No geral o (+)4TRP apresentou energias de ligação mais altas que o outro enantiômero, com ambas as subunidades. Contudo, o complexo entre o (+)4TRP e a subunidade δ apresentou energia livre de ligação ligeiramente menor, -5,94 kcal/mol, que seu complexo com a subunidade $\gamma 2$. Esses valores influenciam na afinidade dos ligantes.

Tabela 19 - Menores energias livres de ligação estimadas nas simulações de *docking* molecular entre os diferentes enantiômeros do 4TRP e diferentes subunidades.

Enantiômero	Menor energia livre de ligação estimada	
	Subunidade $\gamma 2$	Subunidade δ
(-)-4-terpineol	-6,25 kcal/mol	-6,06 kcal/mol
(+)-4-terpineol	-5,89 kcal/mol	-5,94 kcal/mol

Fonte: Autoria própria (2016).

Essa metodologia de simulação de *docking* no AutoDock também foi utilizada por Iorga e colaboradores (2006), por meio do *blind docking* dos moduladores alostéricos

galantamina, codeína e eserina contra modelos dos receptores nicotínicos da acetilcolina, obtendo diferentes sítios de ligação mostrando diferentes afinidades para os ligantes.

Hetenyi e van der Spoel (2006) utilizaram o AutoDock para o *docking* entre vários ligantes e diferentes proteínas com conformações depositadas no PDB. A partir da comparação do modo de ligação determinado experimentalmente para os ligantes, os autores observaram que, na maioria dos casos, as conformações melhor ranqueadas pelo AutoDock corresponderam ao modo de ligação "nativo" entre ligante e proteína.

O exposto reforça a ideia do potencial do 4-terpineol como droga antiepiléptica, indicando que o mecanismo de ação pode envolver tanto os receptores extrassinápticos δ -GABA_ARs, como os receptores de localização sináptica e extrassináptica cuja formação envolve a subunidade γ 2.

De acordo com Hetenyi e van der Spoel (2006), o *blind docking*, em combinação com técnicas experimentais como mutagênese sítio-dirigida, pode ser uma ferramenta útil no mapeamento de sítios de ligação de candidatos a fármacos ou, até mesmo, para a seleção de novas proteínas alvos para as drogas já existentes.

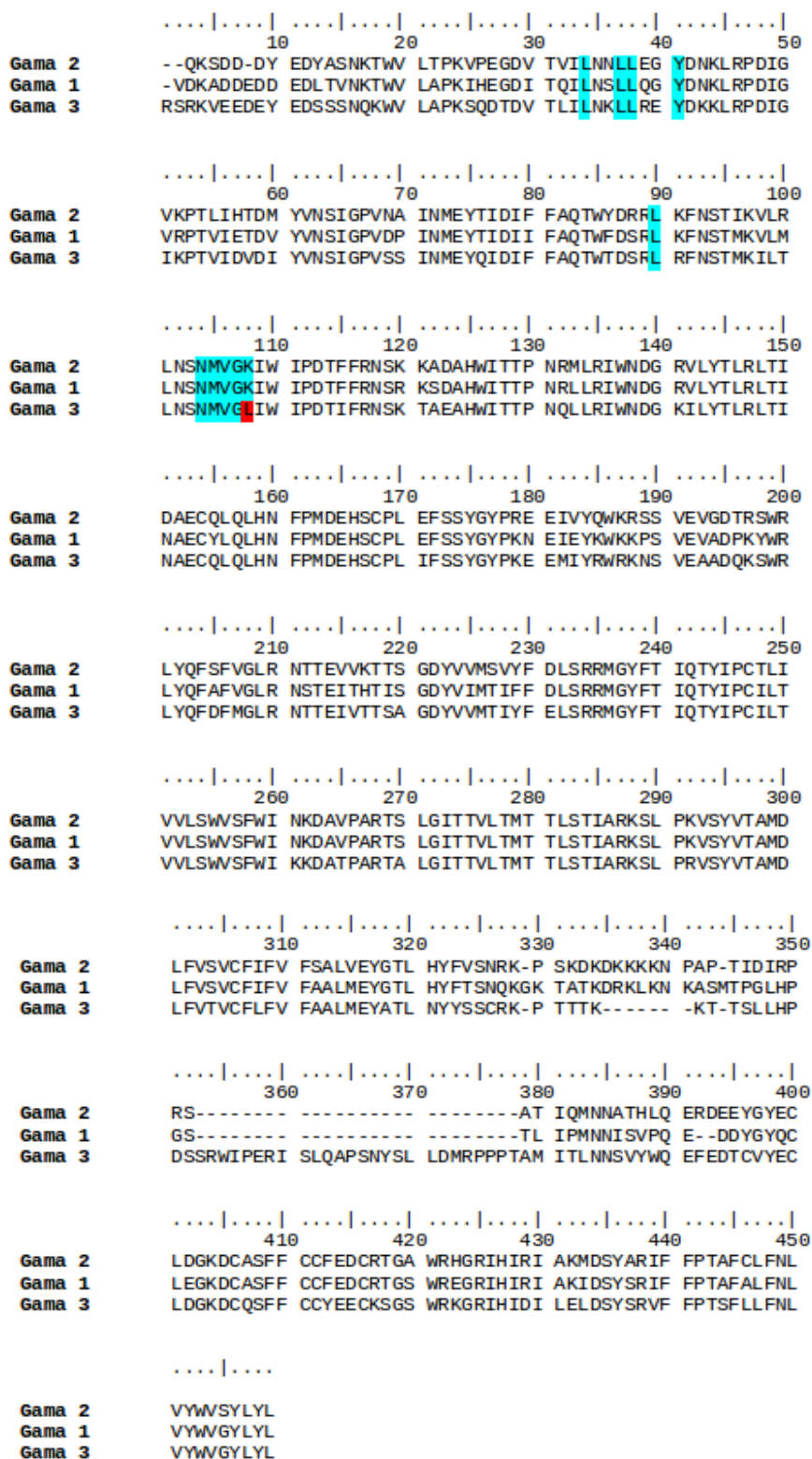
Outros ensaios de *docking in silico* poderão ser realizados futuramente, para investigação de outros possíveis sítios para o 4-terpineol e outros compostos candidatos a fármacos. Adicionalmente, por meio de experimentos de mutagênese sítio-dirigida, os resultados teóricos obtidos neste trabalho poderão ser confirmados.

5.4 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS SUBUNIDADES γ

Segundo Jackson (2003), a conservação dos resíduos em proteínas de uma mesma família é frequentemente relacionada a manutenção da função. Podendo ser sítio ativo em uma enzima ou sítio de ligação em um receptor. Dessa forma, a informação evolucionária, muitas vezes obtida por meio de alinhamento de sequências primárias, pode delinear um epitopo funcional permitindo a identificação de resíduos importantes para ligação de pequenas moléculas e função da enzima ou receptor.

A Figura 25 mostra um alinhamento obtido entre as sequências primárias das três subunidades γ , com destaque para o sítio de ligação do 4TRP evidenciado pela simulação de *docking* molecular.

Figura 25 - Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias dos três tipos de subunidade γ humanos identificados.



Legenda: Os resíduos destacados em azul correspondem aos resíduos que se mostraram a uma distância inferior a 4,0 Å com relação ao 4TRP no *docking* com o GABA_AR $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Observa-se que os mesmos resíduos são conservados na sequência da subunidade $\gamma 1$, porém há troca de uma lisina por uma leucina (destacada em vermelho) na subunidade $\gamma 3$ na posição 108 do alinhamento.

Fonte: Autoria própria (2016).

Embora os níveis de expressão, localização e função das subunidades γ diferirem de forma significativa (OLSEN; SIEGHART, 2008), por meio do alinhamento, pode ser observado um alto grau de identidade entre suas sequências primárias. A identidade entre as subunidades γ_1 e 2 é de 79% e similaridade de 88%. Enquanto que as subunidades γ_2 e 3 compartilham 67% de identidade e 83% de similaridade.

Com relação ao sítio de ligação previsto para o 4TRP na subunidade γ_2 , o alinhamento exhibe que os aminoácidos que o compõem se conservam na estrutura primária da subunidade γ_1 . A subunidade γ_3 , entretanto, apresenta na sua sequência primária a troca de uma lisina por uma leucina na posição 108 das sequências alinhadas. A influência dessa alteração na ligação do 4TRP poderá ser posteriormente investigada por meio de ferramentas bioinformáticas, bem como a manutenção de um modo de ligação semelhante na subunidade γ_1 , cujos resíduos do sítio são conservados.

6 CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados obtidos, considerando os aspectos da metodologia utilizada e do sistema em estudo, pode ser concluído:

- Por meio da metodologia de modelagem comparativa, baseada na homologia, foi possível obter um modelo teórico válido da estrutura tridimensional da subunidade delta (δ) dos receptores de GABA tipo A ($GABA_A$ Rs);
- Ambos os enantiômeros do monoterpeneo 4-terpineol se ligaram às subunidades $\gamma 2$ e δ dos $GABA_A$ Rs;
- O (-)-4-terpineol apresentou menores valores de energia livre de ligação estimadas nas simulações de *docking* molecular, o que pode indicar uma melhor afinidade desse enantiômero com relação aos subtipos e subunidades dos $GABA_A$ Rs estudados;
- Nas simulações de *docking* realizadas, foi observada a ligação do 4-terpineol a sítios predominantemente hidrofóbicos;
- Em concordância com dados experimentais previamente existentes, o 4-terpineol apresentou sítio de ligação diferente daquele dos benzodiazepínicos;
- A interação *in silico* do 4-terpineol com os $GABA_A$ Rs, em conjunto com a evidência experimental da sua atividade anticonvulsivante relacionada ao sistema GABAérgico, indica que um possível mecanismo de ação do 4-terpineol no sistema nervoso relaciona-se às subunidades $\gamma 2$ e δ dos $GABA_A$ Rs.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho complementam o estudo anterior realizado por Nóbrega (2012), na avaliação do potencial do 4-terpineol como fármaco antiepiléptico. Contudo, ainda há muito que ser investigado nos mecanismos moleculares que levam ao efeito anticonvulsivante demonstrado pelo 4-terpineol nos ensaios com modelos experimentais. A partir disso, tem-se a perspectiva de continuação a partir de futuros ensaios a serem realizados *in silico*, *in vitro* ou *in vivo*.

Este trabalho demonstrou o potencial da utilização das metodologias aqui descritas para modelagem comparativa e *docking* molecular, com sucesso, mesmo em um alvo de elevada complexidade como os receptores ionotrópicos do GABA tipo A (GABA_ARs). Isto abre um leque de possibilidades para busca de novos compostos que atuem nesses receptores.

REFERÊNCIAS

- ABREU, R. A. **Caracterização funcional e estrutural comparativa in silico de uma proteína PR-5 do tipo taumatina de *Poncirus trifoliata***. 2015. 48 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé - PB. 2015.
- AMADOR, V. C. **Análise estrutural funcional “in silico” de uma proteína Glutathione-S-Transferase de arroz, com potencial aplicação na resistência de plantas a herbicidas**. 2015. 96 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé-PB. 2015.
- AMADOR, V. C.; MELO, G. G.; CAMPOS, I. C. P.; BRAZ, L. C. C.; MAIA, R. T. Evidência *in silico* de detoxificação do herbicida Metsulfuron por uma GST de arroz. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO EM CIÊNCIAS, 1, 2016, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Editora Realize, 2016.
- BALI, M. AKABAS, M. H. The location of a closed channel gate in the GABAA receptor channel. **J Gen Physiol.**, v. 129, n. 2, p. 145-159, 2007.
- BEGLEY, C.E.; FAMULARI, M.; ANNEGERS, J.F.; LAIRSON, D.R.; REYNOLDS, T.F.; COAN, S.; DUBINSKY, S.; NEWMARK, M.E.; LEIBSON, C.; SO, E.L.; ROCCA, W.A. The cost of epilepsy in the United States: an estimate from population-based clinical and survey data. **Epilepsia**, n. 41, n. 3, p. 342-351, 2000.
- BELELLI, D.; PEDEN, D. R.; ROSAHL, T. W.; WAFFORD, K. A.; LAMBERT, J. J. Extrasynaptic GABAA receptors of thalamocortical neurons: a molecular target for hypnotics. **J Neurosci**, v. 25, p. 11513–11520, 2005.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-50, 2011.
- BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Res.**, v. 37(Web Server issue): W510-4, 2009.
- BENKERT, P.; SCHWEDE, T.; TOSATTO, S. C. E. QMEANclust: Estimation of protein model quality by # combining a composite scoring function with structural density information. **BMC Struct Biol.**, 9:35, 2009.
- BERGMANN, R.; KONGSBK, K.; SØRENSEN, P. L.; SANDER, T.; BALLE, T. A Unified Model of the GABAA Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites. **Plos One**, v. 8, n. 1, e52323, p. 1-13, 2013.

BIOEDIT v7.2.5 General information. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>> Acesso em: 20 ago. 2016.

BRICKLEY, S. G.; MODY, I. Extrasynaptic GABAA receptors: Their function in the CNS and implications for disease. **Neuron.**, v. 73, n. 1, p. 23–34, 2012.

BROWN, N.; KERBY, J.; BONNERT, T. P.; WHITING, P. J.; WAFFORD, K. A. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human $\alpha 4\beta 3\delta$ GABAA receptors. **Br J Pharmacol**, v. 136, p. 965–974, 2002.

BUENO, M. A.; OLIVEIRA, B. G. A influência da ligação de hidrogênio em reações químicas: a reação de Prileschajew. **Quim. nova**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2015.

CAPRILES, P. V. S. Z.; TREVIZANI, R.; ROCHA, G. K.; DARDENNE, L. E.; CUSTÓDIO, F. L. Modelos tridimensionais. In: VERLI, H. (Org.) **Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo : SBBq, 2014. Cap. 7, p. 148-171.

CHPC - Center of High Performance Computing. Autodock. Disponível em: <<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

CORREA, A. J. C; LIMA, C. E; COSTA, M. C. C. D. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burt & R. M. Sm. (Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. **Rev. bras. plantas med.**, v. 12, n. 1, p. 113-119, 2010.

CURI, R. **Fisiologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

GENEMARK. Free gene prediction software. Disponível em: <<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>>. Acesso em: 24 jul. 2016.

GHECOM 1.0: Grid-based HECOMi finder. Disponível em: <<http://strcomp.protein.osaka-u.ac.jp/ghecom/>> Acesso em: 13 mar. 2016.

GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E.L.; JOHNSTON, G.A.R. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 69, n. 7, p. 1101-1111, 2005.

GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S. ; DARDENNE, L. E. Atracamento Molecular. In: VERLI, H. (Org.) **Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo : SBBq, 2014. Cap. 9, p. 189-208.

HAMMER, H.; BADER, B. M.; EHNERT, C.; BUNDGAARD, C.; BUNCH, L.; HOESTGAARD-JENSEN, K.; SCHROEDER, O. H. U.; BASTLUND, J. F.; GRAMOWSKI, A.; JENSEN, A. A. A Multifaceted GABAA Receptor Modulator: Functional Properties and

Mechanism of Action of the Sedative-Hypnotic and Recreational Drug Methaqualone (Quaalude). **Molecular Pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 401-420, 2015.

HETENYI, C.; van der SPOEL, D. Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues. **FEBS Letters**, v. 580, n. 5, p. 1447-1450, 2006.

HEVERS, W.; LÜDDENS, H. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. **Mol Neurobiol.**, v. 18, n. 1, p. 35-86, 1998.

HÖLTJE, H. D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. **Molecular Modeling: Basic principles and applications** (3rd Ed). Weinheim: Wiley-VCH, 2008. 320 p.

HOSSAIN, S.J.; AOSHIMA, H.; KODA, H.; KISO, Y. Fragrances in Oolong tea that enhance the response of GABAA receptors. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, n. 9, p. 1842-1848, 2004.

HSOUNA, A. B.; HALIMA, N. B.; ABDELKAFI, S., HAMDY, N. Essential oil from *Artemisia phaeolepis*: chemical composition and antimicrobial activities. **J Oleo Sci.**, v. 62, n. 12, p. 973-980, 2013.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. **J. Molec. Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

IORGA, B.; HERLEM, D.; BARRE, E.; GUILLOU, C. Acetylcholine nicotinic receptors: finding the putative binding site of allosteric modulators using the "blind docking" approach. **Journal of Molecular Modeling**, v. 12, n. 3, p. 366-372, 2006.

JACKSON, R. M. Predicting the structure of protein-biomolecular Interactions. In: ORENKO, C.; JONES, D.; THORNTON, J. **Bioinformatics: genes, proteins and computers**. Oxford (UK): BIOS Scientific Publishers, 2003. Cap. 13, p. 203-216.

JORGENSEN, W. L. Rusting of the lock and key model for protein ligand binding. **Science**, v. 254, p. 954-955, 1991.

KAWABATA, T. Detection of multi-scale pockets on protein surfaces using mathematical morphology. **Proteins**, v. 78, n. 5, p. 1195-1121, 2010.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949, 2004.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

KUNDAIKAR, H. S.; SANCHETI, J. S.; JAIN, P. D. *et al.* Docking studies and pharmacological evaluation of antiepileptic activity of phytoconstituents. **Med Chem Res**, v. 24, n. 8, p. 3296–3304, 2015.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LUCAS, D. C. **Algoritmos Genéticos**: uma Introdução. Apostila UFRGS, 2002. 48 p.

MACDONALD, R. L.; KANG, J. Q.; GALLAGER, M. J. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. **J Physiol**, v. 588, n. 11, p. 1861–1869, 2010.

MACEDO, I. T. F. *et al.* In vitro effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 4, p. 463-469, 2013.

MAIA, R. T. **Análise *in silico* e polimorfismo genético das glutationa-S-transferases da classe epsilon de *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): possíveis implicações na resistência a inseticidas químicos.** 2013. 153 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE. 2013.

MARTIN, A. C. R. Comparative modeling. In: ORENCO, C.; JONES, D.; THORNTON, J. **Bioinformatics**: genes, proteins and computers. Oxford (UK): BIOS Scientific Publishers, 2003. Cap. 8, p. 119-133.

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A.; RAO, V. S., FONTELES, M. C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, supl. 2, p. 93-97, 1991.

MILLER, P. S.; ARICESCU, A. R. Crystal structure of a human GABAA receptor. **Nature**, v. 512, p. 270-275, 2014.

MODELLER. About MODELLER. Disponível em: <<https://salilab.org/modeller/>>. Acesso em: 3 ago. 2016.

MODWEB. A Server for Protein Structure Modeling. Disponível em: <<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>>. Acesso em: 13 set. 2016.

MORAES, C. S. *et al.* **Métodos experimentais no estudo de proteínas.** Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2013. 84 p. - (Série em biologia celular e molecular).

MORAIS, S. M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J. Comput. Chem.**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.

NINDS - National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Epilepsy Information Page. Disponível em: <<http://www.ninds.nih.gov/disorders/epilepsy/epilepsy.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

NINOMIYA, K. *et al.* Effects of Inhibitory Activity on Mycelial Growth of *Candida albicans* and Therapy for Murine Oral Candidiasis by the Combined Use of Terpinen-4-ol and a Middle-chain Fatty Acid, Capric Acid. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 133, n. 1, p. 133-140, 2013.

NINOMIYA, K. *et al.* Suppression of Inflammatory Reactions by Terpinen-4-ol, a Main Constituent of Tea Tree Oil, in a Murine Model of Oral Candidiasis and Its Suppressive Activity to Cytokine Production of Macrophages in Vitro. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 838-844, 2013.

NÓBREGA, F. F. F. **Monoterpeno 4-terpineol — uma molécula com atividade anticonvulsivante: estudos comportamentais e eletrofisiológicos**. 2012. 161 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

NÓBREGA, F. F.; SALVADORI, M. G.; MASSON, C. J. *et al.* Monoterpenoid Terpinen-4-ol exhibits anticonvulsant activity in behavioural and electrophysiological studies. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2014, 2014.

OLIVEIRA, A. C. M.; FONTANA, A.; NEGRINI, T. C.; NOGUEIRA, M. N. M.; BEDRAN, T. B. L.; ANDRADE, C. R.; SPOLIDORIO, L. C.; SPOLIDORIO, D. M. P. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev. Bras. plantas Med.**, v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011.

OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, R. C. M. U. SAPT: Ligação de hidrogênio ou interação de van der Waals? **Quím. Nova**, v. 35, n. 10, p. 2002-2012, 2012.

OLSEN, R.W.; SIEGHART, W. GABAA Receptors: Subtypes Provide Diversity of Function and Pharmacology, **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 141–148, 2009.

OLSEN, R.W.; SIEGHART, W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. **Pharmacol Rev.**, v. 60, n. 3, p. 243-260, 2008.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; POSER, G. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Rev. bras. farmacogn.**, v. 19, n. 1, p. 140-149, 2009.

PDB. Protein Data Bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4cof>>. Acesso em: 5 set. 2016.

PLANTA MEDICINAL. Melaleuca alternifolia. Disponível em: <<http://www.plantasmedicinasefitoterapia.com/plantas-medicinais-melaleuca.html>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

PSIPRED. The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench. Disponível em: <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

RENARD, S.; OLIVIER, A.; GRANGER, P.; AVENET, P.; GRAHAM, D.; SERVIN, M.; GEORGE, P.; BESNARD, F. Structural elements of the gamma-aminobutyric acid type A receptor conferring subtype selectivity for benzodiazepine site ligands. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 19, 13370-4, 1999.

RICHTER, L.; DE GRAAF, C.; SIEGHART, W.; VARAGIC, Z.; MÖRZINGER, M.; DE ESCH, I. J.; ECKER, G. F.; ERNST, M. Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. **Nat Chem Biol.**, v. 8, n. 5, p. 455-464, 2012.

SANTOS, B. A.; ROMAN-CAMPOS, D.; CARVALHO, M.S.; MIRANDA, F.M., CARNEIRO, D.C.; CAVALCANTE, P.H.; C NDIDO, E.A.; XAVIER-Filho, L.; CRUZ, J.S.; GONDIM, A.N. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca(2+) current blockade. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 539-543, 2011.

SIGEL, E. Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors. **Curr Top Med Chem.**, v. 2, n. 8, p. 833-839, 2002.

SIGEL, E.; STEINMANN, M. E. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. **J Biol Chem**, v. 287, n. 48, pp. 40224-40231, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; ALMEIDA, R.N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. **Chirality**, v. 19, n. 4, p. 264-268, 2007.

SOUSA, O. V.; FIORAVANTE, I. A.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; CANESCHI, C. A. Investigação das atividades antinociceptiva e antiedematogênica do extrato etanólico das folhas de *Joannesia princeps* Vellozo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, vol. 30, n. 1, p. 91-97, 2009.

SWISS-MODEL. Automated mode workspace. Disponível em: <<https://swissmodel.expasy.org/interactive>>. Acesso em: 3 ago. 2016.

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. Autodock. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/>>. Acesso em: 28 jul. 2016.

TIGHE, S; GAO, Y. Y.; TSENG, S. C. Terpinen-4-ol is the Most Active Ingredient of Tea Tree Oil to Kill Demodex Mites. **Transl Vis Sci Technol.** v. 2, n. 7, art. 2, 2013.

TOP TROPICALS. Online Tropical Plant Catalog. Disponível em: <<https://toptropicals.com/html/toptropicals/catalog/catalog.htm>>. Acesso em: 27 jun. 2016.

UniProtKB. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 28 jul. 2016.

WALLACE, R. H.; MARINI, C.; PETROU, S.; HARKIN, L. A.; BOWSER, D. N.; PANCHAL, R. G.; WILLIAMS, D. A.; SUTHERLAND, G. R.; MULLEY, J. C.; SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S. F. Mutant GABA_A receptor γ 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. **Nature Genetics**, v. 28, p. 49 - 52, 2001.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, 5.6.1-5.6.32, 2014.

WEBMD. Understanding seizures and Epilepsy. Disponível em: <<http://www.webmd.com/epilepsy/guide/understanding-seizures-and-epilepsy>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

WEBPRANK. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/goldman-srv/webPRANK/>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

WEINER, S. J. *et al.* A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 106, p. 765-784, 1984.

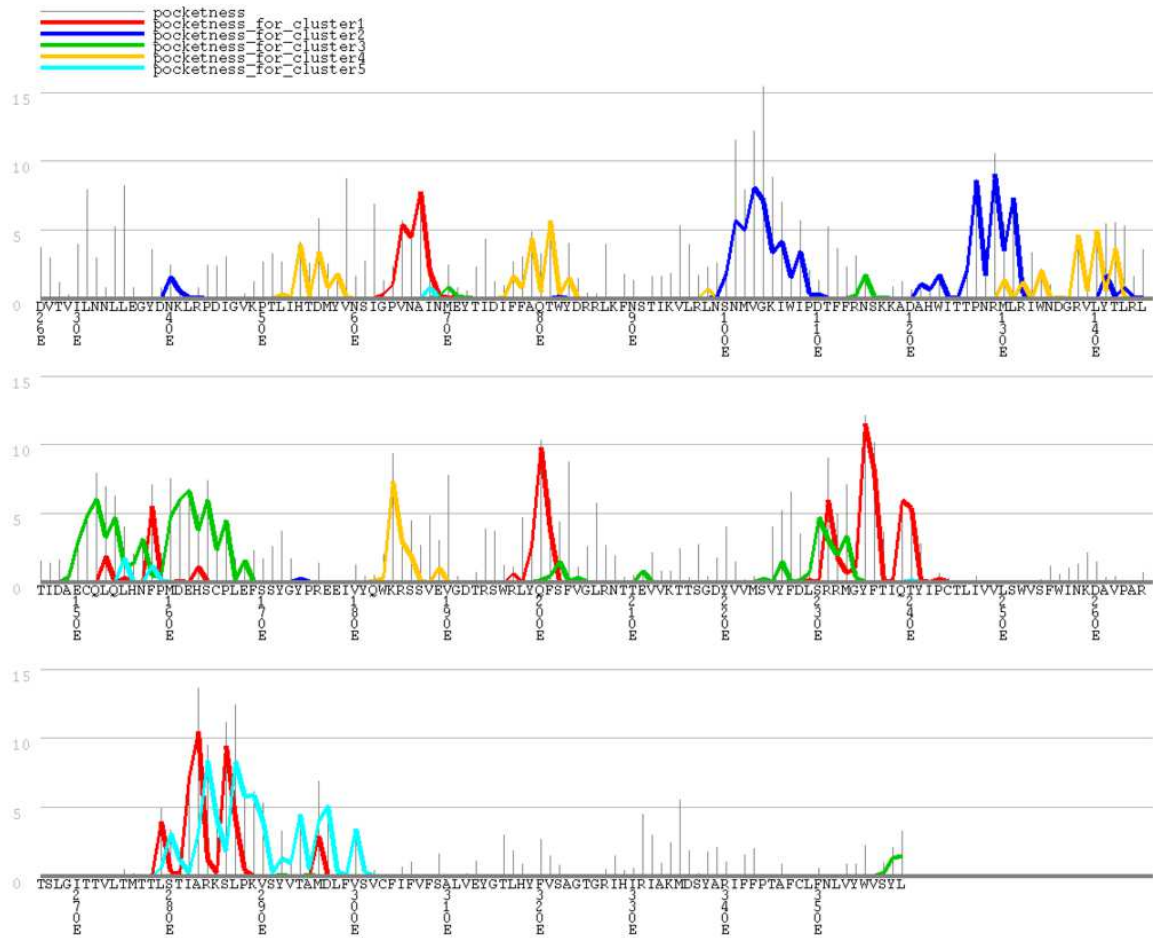
WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35(Web Server issue):W407-10, 2007.

WU, C. S. *et al.* Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-13, 2012.

ZINC. A database of commercially available compounds. Disponível em: <<http://zinc.docking.org/>>. Acesso em: 24 fev. 2016.

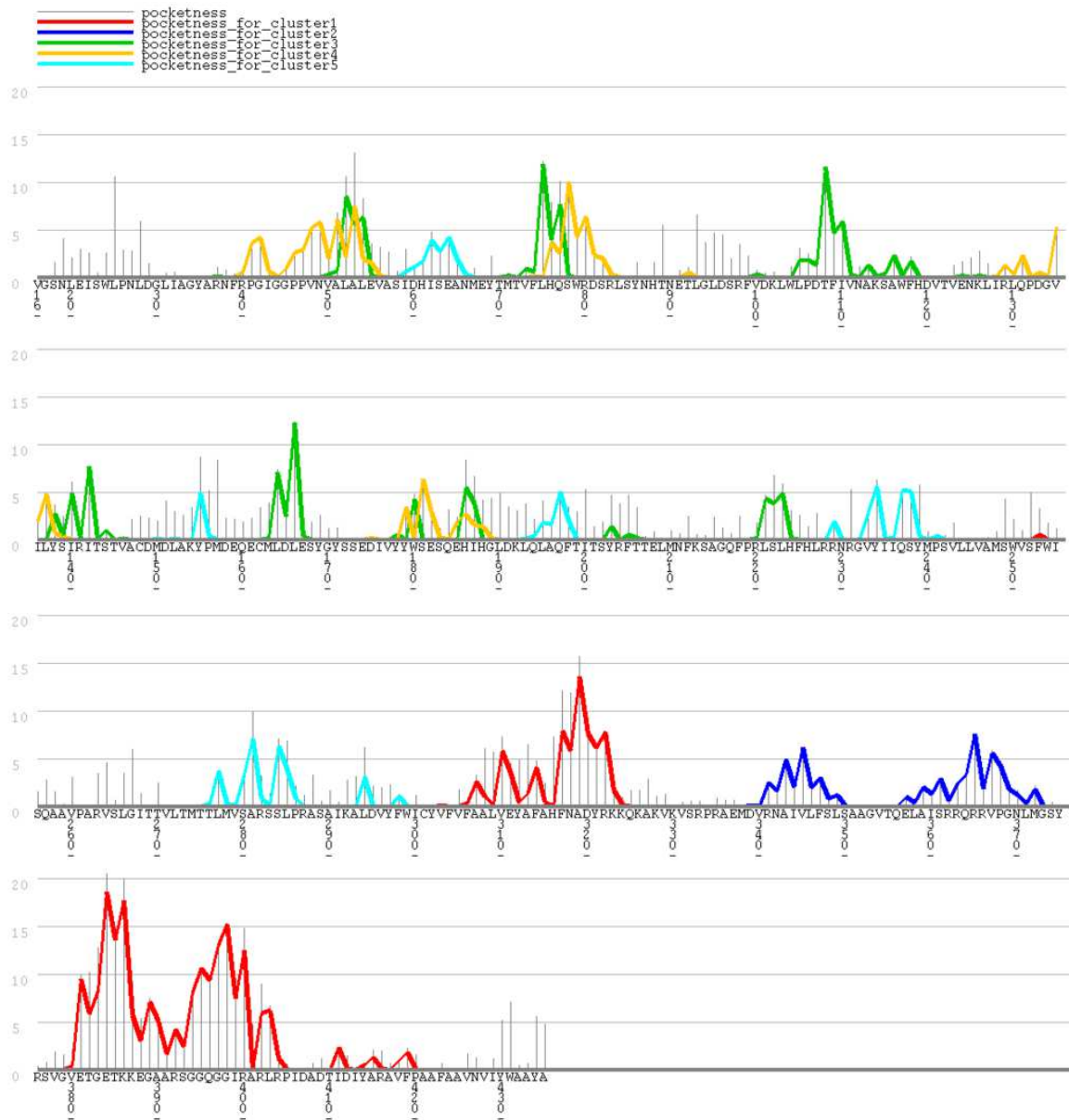
APÊNDICES

APÊNDICE A. Gráfico gerado pelo GHECOM 1.0 dos *pockets* presentes na estrutura da subunidade $\gamma 2$.



Fonte: Dados da pesquisa (2016).

APÊNDICE B. Gráfico gerado pelo GHECOM 1.0 dos *pockets* presentes na estrutura da subunidade δ .



Fonte: Dados da pesquisa (2016).