UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Estudo da modelagem molecular do receptor canabinoide CB1 e
suas interações com o Δ^9 – THC

Emmanuela Ferreira de Lima

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências (Físico-Química)

Orientador: Prof. Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva

São Carlos
2009

Ao meu pai Olival (in memoriam) por tudo que me ensinou, em toda sua simplicidade e humildade, e em quem busquei forças pra continuar lutando pelos meus sonhos.

***"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende."***

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Às mulheres da minha vida: minha mãe Marilene, minhas irmãs: Cláudia, Luciana e Fernanda, e minhas sobrinhas: Maria Fernanda e Maíra por todo apoio e confiança, e com quem dividi todos os momentos bons e ruins da minha vida.

Ao Prof. Albérico pela maneira especial de orientação, atenção, incentivo e apoio.

Ao Prof. Adriano Martinelli e Prof. Tiziano Tuccinardi, pela colaboração na Itália.

À toda minha família, tios, primos, avós, cunhados e também a Terezinha, pelo amor. Em especial, tia Lucila, tia Marinete (*in memoriam*) e tia Mariluce, pelos abraços fortes de apoio e carinho.

A Iremar e João Bidu, pelo bom humor e grande afeto.

A Pimpo, por ter participado intensamente da minha vida durante esse período de Doutorado e a quem sempre me faltarão palavras pra agradecer tudo que fez por mim.

Aos meus caros amigos: Jana, Karen, Sandra, Raquel, Eliane, Ednilsom, Chicão, Josmar, Fábio, Marcelo, Melissa e Diógenes, pelos momentos de ombro amigo, acolhimento e força.

A todos do prédio da química estrutural, em especial: Shirlei, Vânia, Joel, Marinalva e aos Professores Teca, Regina Santos e Eduardo, por tantas palavras amigas.

A todos que fazem ou já fizeram parte desse trabalho (Paulinha, Agnaldo e Katy) do grupo da Química Quântica, sempre companheiros de boas discussões, aprendizagens e diversões.

Aos professores e funcionários do IQSC, pela ajuda e pela disponibilidade, em especial, às meninas da pós, Andréia e Sílvia, e ao pessoal da biblioteca.

À toda família Caceta que me adotou durante todo esse tempo como filha, e me encheu de tanto amor, em especial: Paty e Clarinha, Márcia, Aron e Gil, Dona Cidinha e Sr. Du.

Aos meus amigos de João Pessoa, em especial: Valeria, Kátia, Graça e Júnior, sempre na torcida por mim.

A Ceição, Emmerson, Serginho e Dawy, pela eterna amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES pela bolsa de estágio no exterior.

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado.

Meu agradecimento especial à Gianni e sua família, por tantas palavras de apoio e incentivo enquanto estive na Itália e mesmo depois da volta ao Brasil continuaram a encher-me de atenção e amor.

RESUMO

Marihuana (*Cannabis sativa*) é uma planta amplamente usada pelo ser humano há séculos e suas várias aplicações têm benefícios importantes. A planta *Cannabis sativa* tem sido usada pelo homem como comida, em práticas medicinais e rituais religiosos. Seus efeitos incluem analgesia, alteração na percepção, cognição, memória e atividade psicomotora. Os compostos canabinoides têm sido usados na quimioterapia do câncer e AIDS. No entanto, o uso da *marijuana* é um problema devido aos seus efeitos indesejados, nesse caso, a atividade psicotrópica apresentada pelos compostos canabinoides. Devido ao grande interesse nos efeitos causados pelos compostos extraídos da *Cannabis*, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de melhor entender a relação entre a estrutura química e a atividade biológica de compostos canabinoides, bem como as suas interações com os receptores canabinoides, CB1 e CB2. Ambos são receptores de sete transmembranas (TM) que pertencem à família classe A, como a da rodopsina bovina, dos receptores acoplados à proteína-G (GPCRs). Esta Tese representa um estudo da modelagem molecular do receptor CB1 baseado na estrutura da rodopsina bovina já publicada, uma vez que a maioria dos efeitos terapêuticos dos canabinoides tem sido mostrado serem mediados pelo receptor canabinoide CB1. Esse trabalho fornece, também, uma investigação da interação ligante-receptor e um estudo da ativação do receptor CB1. Ao final, foi feito um estudo de *docking* a fim de entender as principais interações que ocorrem entre o Δ^9 -THC, a principal molécula psicoativa presente na *Cannabis*, e seu receptor CB1.

ABSTRACT

Marijuana (*Cannabis sativa*) is a widely used plant and its various applications have important benefits. The plant *Cannabis sativa* has been used by man for centuries for eating, medicinal practices and religious rituals. In human subjects, its effects include analgesia, alterations in perceptions, cognition, memory and psychomotor activity. The cannabinoid compounds have been used in the cancer chemotherapy and AIDS, but the use of *marijuana* is a problem due to its unwanted effects (the psychotropic activity presented by the cannabinoid compounds). Due to the great interest in the effects caused by the compounds extracted from the *Cannabis*, several studies have been carried out with the aim to better understand the relationship between the chemical structure and the biological activity of cannabinoid compounds, as well as their interaction with the cannabinoid receptors (CB1 and CB2). Both are seven-transmembrane (TM) receptors that belong to the rhodopsin-like family Class A of G protein coupled receptors (GPCRs). This work represents a study of molecular modeling of the CB1 receptor based upon the published bovine rhodopsin structure, once the most of the therapeutic effects of cannabinoids compounds have been shown to be mediated through the CB1 cannabinoid receptor. This work also provides an investigation of the CB1 receptor-ligand interaction and a study of the CB1 receptor activation. A docking study was also performed in order to understand the main interactions that occur between Δ^9 -THC, the principal psychoactive molecule present in *cannabis*, and its receptor CB1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do canabidiol.....	19
Figura 2. Estrutura química do canabinol.....	19
Figura 3. Estrutura em 3D do Δ^9 -THC.....	19
Figura 4. Estruturas químicas do: (A) Δ^9 -THC, (B) Δ^8 -THC.....	20
Figura 5. Desenho esquematizado de um receptor acoplado a proteína-G.....	28
Figura 6. Ação dos receptores acoplados à proteína G.....	32
Figura 7. Desenho esquemático mostrando as áreas do cérebro onde atuam os receptores canabinoides.....	34
Figura 8. Esquema bidimensional dos receptores canabinoides CB1 e CB2. As linhas vermelhas mostram a diferença nos comprimentos nessas áreas.....	35
Figura 9. Representação esquemática da diferença estrutural entre os receptores canabinoides CB1 e CB2. As bolinhas em azul (CB1) e verde (CB2) mostram a diferença nos comprimentos do Carbono terminal e Nitrogênio terminal.....	36
Figura 10. Ligantes representativos das diversas classes de compostos canabinoides.....	38
Figura 11. Estrutura geral (a) bidimensional, (b) tridimensional e numeração usada dos compostos canabinoides estudados.....	47
Figura 12. Estrutura e indicação da psicoatividade de dois compostos canabinoides, (A) um composto ativo e (B) um composto inativo.....	48

Figura 13. Alinhamento dos receptores canabinoides, CB1 e CB2 com a rodopsina bovina.....	65
Figura 14. Alinhamento dos receptores canabinoides, CB1 e CB2 com a rodopsina bovina, com as indicações dos domínios TMs.....	66
Figura 15. Modelo do receptor canabinoide CB1, no seu estado inativo.Os sete domínios transmembranais são indicados.....	67
Figura 16. Gráfico do Ramachandram do receptor CB1. As regiões mais favoráveis são a de cor vermelha. Regiões permitidas, generosamente permitidas e não permitidas estão indicadas nas cores: amarelo, amarelo claro e branco, respectivamente.....	68
Figura 17. Ângulos de torção de uma proteína: χ_1 se refere à rotação sobre a primeira ligação abaixo da cadeia lateral. χ_2 se refere à rotação sobre a segunda ligação abaixo da cadeia lateral.....	70
Figura 18. Representação esquemática das três conformações g+, g- e trans.....	70
Figura 19. Representação do modelo do receptor CB1 já no seu estado ativado.....	71
Figura 20. Sobreposição dos dois receptores, ativo e inativo, onde é possível ver a diferença dos domínios TM3 e TM6, antes da ativação na cor roxa e depois da ativação na cor gelo.....	72
Figura 21. Δ^9 – THC (destacado em amarelo) no sítio ativo do receptor CB1.....	73
Figura 22. Δ^9 – THC “docado” com o receptor CB1, em verde os resíduos importantes que podem interagir com o ligante; em amarelo estão os resíduos que não contribuem na interação.....	74
Figura 23. Primeira conformação do Δ^9 – THC interagindo com o resíduo de histidina 104.....	76
Figura 24. Segunda conformação do Δ^9 – THC interagindo com o resíduo de lisina 115.....	77

Figura 25. Terceira conformação do Δ^9 – THC interagindo com o resíduo de lisina 115.....	78
Figura 26. Estrutura química do composto psicoativo 2-carboxi- Δ^9 -THC.....	79
Figura 27. Interações entre o ligante psicoativo e dois resíduos de aminoácidos.....	79
Figura 28. Estrutura tridimensional do composto inativo 2-carboxi- Δ^8 -THC no sítio ativo do receptor.....	80
Figura 29. Estrutura química do composto psicoativo 4-carboxi- Δ^9 -THC (Ic2) e 4-carbometoxi- Δ^8 -THC (Ic3).....	82
Figura 30. Estrutura tridimensional do composto psicoativo 4-carboxi- Δ^9 -THC e sua forte interação com a cisteína 30 (Cys30).....	83
Figura 31. Estrutura tridimensional da posição do composto psicoativo 4-carboxi- Δ^9 -THC com relação ao resíduo de lisina 115 (Lys115).....	84
Figura 32. Estrutura tridimensional da posição do composto psicoativo 4-carbometoxi- Δ^8 -THC em seu sítio de interação com o receptor CB1.....	85
Figura 33. Mecanismo proposto para presença ou ausência de atividade psicotrópica para compostos canabinoides.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxonomia da planta <i>Cannabis</i>	17
Tabela 2. Tipos de compostos encontrados na planta <i>Cannabis</i> sativa.....	21
Tabela 3. Uso da <i>marijuana</i> : efeitos farmacológicos e terapêuticos.....	24
Tabela 4. Receptores canabinoides CB1 e CB2.....	31
Tabela 5. Indicação de psicoatividade, valores das E_{LUMO} e volumes calculados dos substituintes na posição C4 para os compostos em estudo.....	88

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	15
I. Introdução.....	15
I.1. A Química medicinal.....	15
I.2. A Química da <i>cannabis</i>	16
I.3. Efeitos terapêuticos da <i>cannabis</i>	20
I.4. Uso e efeitos psicotrópicos da <i>cannabis</i>	22
I.5. Lipofilicidade dos compostos canabinoides.....	25
I.6. Os receptores acoplados à proteína-G (GPCRs).....	26
I.7. Os receptores canabinoides.....	29
I.8. Canabinoides endógenos.....	36
I.9. Estudos da relação estrutura atividade biológica (SAR) em compostos canabinoides.....	39
CAPÍTULO II.....	42
II. Aspectos importantes do trabalho e objetivos.....	42

II.1. Estudos de SAR dos compostos canabinoides estudados no grupo de química quântica.....	42
II.2. Objetivos e relevância do trabalho.....	44
CAPÍTULO III.....	46
III. Metodologia.....	46
III. 1. Estudos Anteriores.....	46
III.2. Estudos de modelagem molecular.....	48
III.3. Procedimento da modelagem por homologia.....	49
III.4. Principais passos para a modelagem.....	50
III.4.1. O alinhamento.....	51
III.4.2. A modelagem.....	52
III.4.3. A otimização.....	53
III.5. A validação do modelo.....	54
III. 5.1. Passos da validação estrutural.....	55
III. 6. Estudos de <i>docking</i>	55
III. 7. <i>Docking</i> ligante-receptor.....	58

III. 7.1. Preparação dos arquivos do AUTODOCK.....	59
III. 7.2. Funções de energias livres de ligação.....	59
CAPÍTULO IV	63
IV. Resultados e discussão.....	63
IV. 1. Alinhamento.....	64
IV. 1.1. Procedimento computacional.....	64
IV. 1.2. A conformação ativa dos GPCRs.....	69
IV. 1.3. Estudos de mutagênese.....	73
IV. 2. <i>Docking</i> do modelo do receptor CB1 e um composto canabinoide psicoativo.....	78
IV. 3. <i>Docking</i> do modelo do receptor CB1 e os compostos canabinoides psicoativos na presença de um substituinte volumoso na posição C4.....	81
IV. 3.1. Estudos com os compostos inativos 4-carboxi- Δ^9 -THC (Ic2) e 4-carbometoxi- Δ^8 -THC (Ic3).....	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO

I.1. A química medicinal

A maioria das drogas são moléculas, mas nem todas as moléculas são drogas. Cada ano, milhões de moléculas novas são preparadas, mas somente uma fração muito pequena dessas é considerada como possíveis candidatas à droga. Um composto químico deve possuir determinadas características para cruzar a barreira molécula orgânica/droga (NOGRADY; WEAVER, 1985). A química medicinal tem ajudado muito no avanço desses estudos, pois é uma ciência aplicada, focalizada no projeto e/ou descoberta de novas entidades químicas (NCEs). Portanto, a otimização e desenvolvimento de moléculas “droga” são etapas essenciais para o tratamento de doenças. Para alcançar isso, o químico medicinal deve planejar e sintetizar moléculas novas, verificar como essas interagem com as macromoléculas biológicas (tais como proteínas ou ácidos nucleicos), elucidar a relação entre suas estruturas químicas e atividades biológicas, determinar sua absorção e distribuição no corpo, bem como avaliar suas transformações metabólicas. A química medicinal é multidisciplinar, no campo da química teórica, química orgânica, química analítica, biologia molecular, farmacologia e bioquímica, mas, apesar da complexidade, a química medicinal tem um ponto chave importante - o planejamento e a descoberta de novas drogas.

O projeto bem sucedido de uma droga envolve muitos passos, muitos anos e multidisciplinaridade. A descoberta de uma droga não é uma consequência inevitável da ciência básica fundamental e não é meramente uma tecnologia que gera drogas para

seres humanos com base nos avanços biotecnológicos. Se fosse simples assim, mais e melhores drogas já estariam disponíveis.

A química medicinal fornece uma ponte molecular entre a ciência básica da biologia e a ciência clínica da medicina (análoga à química, sendo uma ciência central entre as disciplinas tradicionais da biologia e da física) (NOGRADY; WEAVER, 1985). O que se procura hoje é unir os conhecimentos de várias áreas como: química, física, matemática, biologia, farmácia, medicina e outras, a fim de se obter um estudo que seja completo sobre uma determinada substância, desde o seu princípio ativo até a origem da planta e suas condições climáticas. Este estudo sobre a *Cannabis sativa* busca elucidar um pouco a complexidade da planta e seus compostos, unindo os dados experimentais que se tem conhecimento, como os efeitos psicotrópicos e analgésicos comprovados em seres humanos e animais, com dados teóricos calculados via métodos estatísticos com programas de computadores.

I.2. A química da *cannabis* – a planta *cannabis sativa* e seus compostos

As flores do topo e as folhas da planta *Cannabis sativa*, da subespécie *indica*, secreta uma resina que contém os compostos psicoativos chamados canabinoides. A concentração mais elevada dos canabinoides na planta é encontrada nas flores que estão no topo, seguidas pelas folhas. Quantidades pequenas de canabinoides são encontradas na haste e nas raízes, e nada nas sementes. O índice de canabinoides na planta varia extensamente, dependendo do clima, do solo, do cultivo e do tipo de planta (GRINSPOON; BAKALAR, 1993). Três tipos de preparações da planta são usados e identificados por nomes indianos: bhang, ganja e charas, descritos a seguir:

O bhang é feito das folhas secas e flores das plantas femininas que não foram fecundadas e que contém um baixo índice da resina com o princípio ativo, cerca de 1-2% de THC (tetrahidrocanabinol).

- Ganja é obtido das folhas da parte superior da planta cultivada e tem um índice mais elevado da resina. Bhang e Ganja são conhecidas como *marijuana*.
- Charas, também conhecido como o hashish, é preparado da própria resina e chega a ser 5-10 vezes mais forte do que a *marijuana*, com alta concentração de THC, cerca de 7-14%. Os produtos da planta são mastigados, fumados ou comidos e misturados em doces e pratos.

Dentro da taxonomia da *cannabis* existem classificações de espécies, subespécies e variedades, como mostra a Tabela 1. (SMALL; CRONQUIST, 1976).

Tabela 1. Taxonomia da planta *cannabis*

Espécie	<i>Cannabis sativa</i> Linnaeus	<i>Cannabis sativa</i> Indica
Subespécie	Sativa	Indica
Variedade	Spontanea, Sativa	Indica ou Kafiristanica

A *marijuana*, nome científico: *cannabis sativa* é uma planta herbácea de ciclo anual e amplamente usada. Suas aplicações têm benefícios importantes e é dotada de uma grande capacidade de adaptação a diversos ambientes climáticos, com preferência por zonas temperadas, ensolaradas e com uma disponibilidade hídrica nem tanto abundante (ASSOCIAZIONE CANNABIS TERAPEUTICA, 2002).

A *cannabis* contém cerca de 400 compostos químicos, dos quais aproximadamente 60 são do tipo canabinoides e pertencem à classe química dos terpenofenóis, moléculas não polares e com baixa solubilidade em água. Contém também um grande número de outros compostos de potencial interesse, incluindo pelo menos 120 diferentes terpenos e 21 flavonóides (PERTWEE, 2004).

O isolamento do canabidiol (Fig. 1) e do canabinol (Fig. 2), nos anos 40, forneceu a estrutura geral do princípio ativo da *cannabis*, mas nenhum desses compostos possuía mais atividade que o Δ^9 -THC (Figura 3), composto cuja estrutura foi isolada por Mechoulam e colaboradores mais tarde, na década de 60. O termo CANABINOIDE se refere ao composto com 21 átomos de carbono presente na planta e inclui seus produtos de transformação e seus análogos relacionados. (ADAMS; BAKER, 1940a; ADAMS; HUNT; CLARK, 1940b). A estrutura química e estereoquímica do canabidiol (CBD) e do Δ^9 -THC, cada um dos quais ocorrem naturalmente como (-)-enantiômero, foram elucidadas no laboratório de Raphael Mechoulam: o CBD em 1963 e o Δ^9 -THC em 1964. (MECHOULAM, 1973; MECHOULAM; HANUS, 2000).

A elucidação do principal constituinte psicoativo da planta, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), facilitou o estudo dos efeitos farmacológicos e comportamentais dos constituintes específicos da *cannabis*. (IRMA; ADAMS; BILLY, 1996).

Figura 1. Estrutura química do canabidiol.

Figura 2. Estrutura química do canabinol.

Figura 3. Estrutura em 3D do Δ^9 -THC.

A atividade farmacológica do Δ^9 -THC é estereoseletiva, com o isômero (2)-trans sendo até 100 vezes mais potente do que o isômero (1)-trans, dependendo do teste farmacológico (DEWEY et al., 1984). Um Segundo composto também foi identificado como Δ^8 -THC (Fig. 4), um isômero posicional do Δ^9 -THC (HIVELY et al., 1966). O perfil farmacológico de ambos é parecido com o Δ^9 -THC, possuindo uma potencia maior.

Figura 4. Estruturas químicas do: (A) Δ^9 -THC, (B) Δ^8 -THC.

I.3. Efeitos terapêuticos da *cannabis*

Embora os canabinoides exerçam efeitos diretos sobre um determinado número de órgãos, incluindo o sistema imunológico e reprodutivo, os principais efeitos farmacológicos observados estão relacionados ao sistema nervoso central. Em humanos, o efeito da *cannabis* inclui: analgesia (HILL et al., 1974; CLARK et al., 1981; BROOKS, 2002;), alteração de humor, estimula o apetite em pacientes com AIDS e câncer (que fazem uso da quimioterapia) (MECHOULAM, 1973), propriedades antieméticas (MECHOULAM, 2000), bem como alterações nas

atividades psicomotoras, de percepção, cognição, alteração na memória, controle de espasmos em pacientes portadores de esclerose múltipla (BAKER et al., 2000), tratamento de glaucoma (HEPLER; PETRUS, 1971), efeito broncodilatador (TASHKIN et al., 1976), efeito anticonvulsivo (CUNHA et al., 1980; CARLINI; CUNHA, 1981), dentre outros. Alguns efeitos colaterais podem acompanhar os efeitos terapêuticos acima, como: euforia, depressão, efeito sedativo e outros.

A *cannabis* foi uma das primeiras plantas a ser usada como remédio, em cerimônias religiosas e em recreação. Históricos do seu uso já ultrapassam 5000 anos (MECHOULAM, 1986), porém, as descobertas de que a *cannabis* é a única fonte de um conjunto de pelo menos 66 compostos canabinoides e que seus efeitos psicotrópicos são produzidos principalmente pelo Δ^9 -THC são muito mais recentes. Alguns fitocanabinoides e suas quantidades contidas na planta são mostrados na Tabela 2 (PERTWEE, 2006).

Tabela 2. Tipos de compostos encontrados na planta *Cannabis sativa*

Tipo de Canabinoide	Quantidade de compostos
Δ^9 -tetrahydrocannabinol	9
Δ^8 -tetrahydrocannabinol	2
Canabidiol	7
Canabicromeno	5
Canabiciolol	3
Cannabielsoin	5
Canabitriol	9
Miscelâneas	11

O canabinol (Figura 4), que se pensa ter sido formado do THC, durante o armazenamento da *cannabis* colhida, foi o primeiro dos canabinoides (fitocanabinoide) a ser isolado de um extrato de óleo vermelho da *cannabis* no final do século XIX (PERTWEE, 2006). Sua estrutura foi elucidada no começo da década de trinta por R.S. Cahn, e sua síntese química foi obtida em 1940 nos laboratórios de R. Adams nos Estados Unidos e Lord Todd no Reino Unido (PERTWEE, 2006).

I.4. Uso e efeitos psicotrópicos da *cannabis*

Os efeitos terapêuticos da *cannabis*, como já mencionado, têm sido recentemente estudados para uma grande variedade de sintomas, incluindo o tratamento de dores e espasticidades (contração contínua dos músculos) associadas com esclerose múltipla, controle de náusea e vômito, estimulante de apetite e analgesia (BURNS; INECK, 2006).

O interesse em canabinoides agonistas tem aumentado desde o isolamento de receptores canabinoides específicos (CB1 e CB2) e ligantes endógenos para esses receptores. A *cannabis* tem tido uma longa história de uso recreacional e medicinal, mas ainda encontra oposição no que diz respeito ao uso como medicamento. O desenvolvimento de drogas tem sido focado em canabinoides agonistas sintéticos que tem menos efeitos adversos do que a *cannabis* (WALKER; HUANG, 2002). Esses medicamentos baseados na *cannabis* são um prospecto particularmente atrativo por causa do perfil “saudável” da *cannabis* e dos canabinoides, porém, a inalação da

fumaça da *marijuana* produz efeitos vegetativos (fadiga, taquicardia e diminuição da libido) e psicotrópicos, como mostra a Tabela 3 (CONTRERAS et al., 2003).

Estudos mostraram que a dose oral de THC para produzir efeitos letais em 50% das cobaias (ratos) foi de 800 a 1900mg/kg. Pesquisadores não constataram mortes com doses via oral acima de 3000 mg/kg em cães e 9000 mg/kg em macacos, e não foram relatadas mortes em pessoas diretamente atribuídas à overdose de *cannabis* (THOMPSON et al., 1973), ou seja, seria necessária a ingestão de uma quantidade excessiva desses compostos para se chegar a morte, talvez por isso o uso da maconha tenha se expandido pelo mundo e o hábito de fumá-la tornou-se banal no sentido de que sendo um produto natural, não poderia “em teoria” fazer mal ou prejudicar a saúde. Entre os efeitos psicotrópicos estão: garganta e boca secas, palpitações, sensação de tranquilidade, alterações motoras, diminuição na comunicação verbal, desorientação e perda do senso de tempo.

Tabela 3. Uso da *marijuana*: efeitos farmacológicos e terapêuticos

Efeitos farmacológicos	Possíveis efeitos terapêuticos	Substâncias de referência
Vegetativos Fome Sede Boca e garganta secas Palpitações	Analgésico	Analgésicos Opiáceos, inibidor de prostaglandinas, agonistas α -2-adrenérgicos (clonidina), corticosteróides, lidocaína, cetamida.
Psicotrópicos: Aumento da Empatia Tranquilidade Relaxamento Alterações Motoras Diminuição da comunicação Verbal Perda do senso de tempo	Antiemético Orexígeno (estimulante de apetite)	Antieméticos Ondancetron, clorpromazina, metoclopramida, procloroperazina, domperidona. Orexígeno Fenfluramida, desflenfluramida, Dihexasin.
Adversos Dependência Psicosis Alteração no Rendimento Escolar Alterações Respiratórias Uso de outras drogas Alterações Hormonais	Antiespasmódico (Previne a contração em músculos) Redução da pressão intraocular Broncodilatador Miorelaxante (anestésico) Anticonvulsivo Neuroprotetores	Antiespasmódico Baclofen, dantrolen, benzodiazepinas. Glaucoma Metipranolol Levobunolol Aceclidina Pilocarpina Broncodilatador Atropina Albuterol Terbutalina Miorelaxantes d-tubocuranina Anticonvulsivos Ácido valpróico, Carbamazepinas, fenitoína

I.5. Lipofilicidade dos compostos canabinoides

Uma vez que o Δ^9 -THC tem alta solubilidade lipídica, baixa solubilidade em água e altos coeficientes de partição água-membrana e água-solvente orgânico, o caminho percorrido até se chegar às suas propriedades farmacológicas foi longo (PERTWEE, 1988). Os valores do coeficiente de partição octanol/água (logaritmo do coeficiente de partição - logP) variam de canabinoide para canabinoide, no entanto, não existe uma correlação explícita comprovada entre esses valores e o potencial terapêutico dos compostos canabinoides.

O desenvolvimento de uma forma de dosagem especial do THC não é um processo fácil. O THC é muito lipofílico e pode facilmente atravessar a barreira sanguínea do cérebro, o qual permite interações com receptores dentro do sistema nervoso central (SNC) que causam os efeitos colaterais, efeitos psicotrópicos. Receptores canabinoides dentro do SNC são também muito importantes para os efeitos terapêuticos do THC, dificultando a criação de uma forma do THC que não tenha efeito indesejável de psicoatividade (GOUTOPOULOS; MAKRIYANNIS, 2002). Essa alta lipofilicidade deve-se ao “efeito de primeira passagem”, no qual a concentração da droga é significativamente reduzida pelo fígado antes de atingir a circulação sistêmica (circulação sanguínea). Essa primeira passagem pelo fígado diminui significativamente a biodisponibilidade da droga e o desenvolvimento de uma maneira eficiente de dosagem é complicado devido à natureza não cristalina dos compostos terpenóides ativos do THC (MECHOULAM; GAONI, 1967). Fumar a *cannabis* é um método eficiente, mas não é uma prática médica aceitável devido aos perigos adicionais associados com o ato de fumar e problemas com a padronização da

dose (JOY; WATSON; BENSON, 1999). O perfil do efeito adverso da *cannabis* e do THC tornou o uso clínico desses compostos muito complicado, pois ambos THC naturais e seus análogos sintéticos mostraram efeitos adversos similares em experimentações humanas e em animais (CAMPBELL et al., 2001; ROMERO et al., 2002).

Ambos, *cannabis* e os compostos THC, causam efeitos psicoativos significantes tais como: alucinações, dissociações da realidade, euforia ou disforia na maioria das pessoas que os usam. Isso vem estimulando o desenvolvimento de outros canabinoides agonistas que podem apresentar efeitos adversos mais favoráveis.

I.6. Os receptores acoplados à proteína-G (GPCRs)

As proteínas G são uma família de proteínas de membrana, acopladas a sistemas efetores que se unem a GDP-GTP (*GDP – guanosina difosfato* e *GTP – guanosina trifosfato*). Proteínas de membrana que se unem à GTP interagem com os sistemas receptores que inibem ou ativam a adenilato ciclase. As proteínas G intermediam a transmissão do sinal entre os GPCRs (receptores acoplados às proteínas-G) e efetores múltiplos, tais como enzimas e canais iônicos (HAUACHE, 2001). Os receptores acoplados à proteína-G fazem parte dessa família de proteínas de membrana integral que agem em receptores na superfície da célula, responsável pela transdução de uma diversidade notável de sinais endógenos dentro da resposta celular. Como o próprio nome sugere, GPCRs agem primeiramente através da ativação de proteínas regulatórias ligadas ao nucleotídeo guanina, as chamadas proteínas-G.

Quando ativado, um receptor se associa a um complexo de proteínas-G, causando uma mudança de GTP para GDP. Os GPCRs podem ser ativados por ligantes como, por exemplo, hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento, odorantes e fótons de luz. Uma vez ativada, a proteína G intermedia o processo de sinalização que é iniciado com a ativação do respectivo GPCR e termina com a resposta mediada pela ação de moléculas efetoras que incluem canais iônicos (de cálcio e potássio) e enzimas que geram segundos mensageiros, como por exemplo, a adenilato ciclase: a enzima que gera o segundo mensageiro AMP cíclico (Figura 6). Quando um agonista, substância que ativa os receptores biológicos, se une a seu receptor, este adquire uma conformação que o permite interagir com uma determinada proteína-G que se encontra em estado inativo. Um modelo largamente divulgado a respeito do mecanismo funcional dos GPCRs sugere que estes são proteínas dinâmicas, apresentando conformações diferentes que, conseqüentemente, podem ou não favorecer o acoplamento da respectiva proteína-G. De acordo com este modelo, a ligação de um agonista estabilizaria a conformação que favorece a ligação com a proteína G, ativando, desta forma, o receptor (SPIEGEL, 1996).

Os GPCRs possuem sete membranas altamente conservadas (Figura 5), com sequência característica de 20 a 30 resíduos de aminoácidos com alta hidrofobicidade, sugerindo que suas estruturas, de uma forma geral sejam similares à da bacteriorodopsina (BR) (Flower, 1999). A estrutura da região transmembranar da BR foi resolvida experimentalmente sendo composta de sete α -hélices formando uma estrutura de duas camadas planas (HENDERSON et al., 1990).

A Figura 5 mostra um desenho esquematizado de um GPCR. As hélices transmembranais são mostradas como cilindros conectados por *loops* (alças) traçados como linhas. A membrana está sombreada e o diagrama de cima (Fig. 5) mostra o receptor desdobrado para indicar a topologia transmembranal de um GPCR. As hélices transmembranais (Fig. 5) são numeradas de 1 até 7 e os *loops* intracelulares (IC) estão marcados por IC1 até IC3. Os *loops* extracelulares (EC) estão marcados como EC1 até EC3 e a parte mais baixa do diagrama ilustra, de uma maneira muito simplificada, como o conjunto das sete hélices ficam juntas em três dimensões (FLOWER, 1999).

Figura 5. Desenho esquematizado de um receptor acoplado à proteína-G (FLOWER, 1999).

I.7. Os receptores canabinoides

Existem dois tipos de receptores canabinoides identificados até agora, o CB1, clonado em 1990 (MATSUDA et al., 1990) e o CB2, clonado em 1993 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). O receptor CB1 foi clonado de ratos (MATSUDA et al., 1990), camundongos (CHAKRABARTI; ONAIVI; CHAUDHURI, 1995) e tecidos humanos (GERARD et al., 1990; GERARD et al., 1991) e mostra uma sequência de aminoácido de 97-99% de identidade através das espécies. O CB1 é encontrado primariamente no cérebro e tecidos neuronais, enquanto que o CB2 é encontrado principalmente em células imune, onde podem mediar um efeito imunossupressante (diminuindo as reações imunitárias). O receptor CB2 apresenta 44% de identidade com o CB1 e até o momento, não existem evidências farmacológicas preliminares que suportem a existência de tipos ou subtipos adicionais de receptores canabinoides (CALIGNANO; RANA; PIOMELLI, 2001; MARZO et al., 2000; HÁJOS; LEDENT; FREUND, 2000).

Ambos os receptores canabinoides pertencem à grande família classe A de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) como a da rodopsina bovina, (LU; SALDANHA; HULME, 2002; TUCCINARDI et al., 2006), controlando uma grande variedade de sinais de transdução. A rodopsina bovina teve sua estrutura cristalográfica determinada a partir de difração de raio-X por PALCZEWSKI et al., em 2000, com uma resolução de 2.8 Å e foi depositada no banco de dados PDB no mesmo ano.

Os GPCRs são um super família de proteínas de membranas que são caracterizadas por sete hélices transmembranais hidrofóbicas (TMH). No entanto, o conhecimento das características estruturais dos receptores canabinoides é de extrema importância para o entendimento da sua função e do seu uso para a formulação de drogas (FELDER et al., 1995).

Por muitos anos houve equívocos sobre a ação farmacológica do THC e da *marijuana* (e pensava-se que o THC agia por ruptura das membranas celulares sem interagir com um receptor específico) e receptores canabinoides não foram descobertos até os anos 90 (MATSUDA et al., 1990; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993; DEVANE et al., 1988; PATON, 1975).

Desde a descoberta dos receptores CB1 e CB2, o interesse no desenvolvimento de drogas que podem especificamente interagir com receptores canabinoides tem aumentado. As primeiras indicações da existência de receptores canabinoides vêm de relatos de que, primeiro: a atividade farmacológica de canabinoides psicotrópicos é significativamente influenciada pela estrutura química, segundo: canabinoides com centros quirais exibem estereoseletividade e terceiro: Δ^9 -THC faz parte dos agonistas que se ligam a uma classe específica de receptores (HOWLETT, 2005; HOWLETT et al., 2002).

Receptores canabinoides receberam esse nome, pois são aqueles que respondem às drogas canabinoides, como o Δ^9 -THC, derivado da planta *Cannabis sativa* e seus análogos sintéticos ativos biologicamente (HOWLETT et al., 2002).

A pesquisa que começou nos anos 80 tem agora firmemente estabelecido que tecidos *mammalian* contêm pelo menos dois tipos de receptores farmacológicos para o

Δ^9 -THC, os receptores CB1 e CB2 (HOWLETT et al., 2002; PERTWEE, 1997). O Δ^9 -THC age como agonista parcial em ambos os tipos de receptores, exibindo mais baixa eficácia para o CB2 que para o CB1 (BAYEWITCH et al., 1996). A Tabela 4 traz algumas informações importantes sobre esses receptores.

Tabela 4. Receptores canabinoides CB1 e CB2

Tipo de Receptor	CB1	CB2
Clonado	Sim	Sim
Acoplado à proteína G	Sim	Sim
Alguns sistemas efetores identificados	Sim	Sim
Agonistas seletivos	Sim	Sim
Antagonista, agonista inverso seletivos	Sim	Sim
Agonistas Endógenos	Sim	Sim
Presente no cérebro e em neurônio spinal	Sim	Não
Presente em alguns nerônios periféricos	Sim	Não
Presente em alguns nervos terminais	Sim	Não
Modula a liberação de neurotransmissor	Sim	Não
Presente em outros tipos de células	Sim	Sim

O primeiro receptor canabinoide identificado foi o CB1, descoberto no cortex de ratos em 1990, trinta anos depois da identificação do princípio ativo da *cannabis*. O CB1 é um receptor acoplado à proteína G que inibe a adenilato ciclase e, subsequentemente, conduz a níveis menores da adenosina monofosfato cíclica (cAMP). Esse receptor é encontrado principalmente no sistema nervoso central ver Tabela 4 (HOWLETT, 2002; MATSUDA et al., 1990), com alta densidade no cerebelo, hipocampo e striatum, neocórtex, tronco encefálico, amígdala e hipotálamo.

A densidade do receptor CB1 é maior no sistema nervoso central, localizado em altas concentrações no gânglio basal, cerebelo, hipocampo e córtex cerebral, cujas funções são descritas abaixo (HONÓRIO; ARROIO; DA SILVA, 2006):

- **Cortéx frontal:** Controla o comportamento, a euforia. Está envolvido com as funções cognitivas.
- **Núcleo acumbens:** pode sediar o mecanismo que causa dependência.
- **Hipocampo:** É o setor que guarda informações, está envolvido na aprendizagem, memória e resposta ao estresse.
- **Cerebelo:** Responde às alterações da coordenação motora. Coordena os movimentos do corpo.

A Figura 7 mostra um esquema de uma parte do cérebro por onde agem os receptores canabinoides CB1. A parte em azul mostra os caminhos da Dopamina, um precursor do neurotransmissor natural da adrenalina, produzindo efeitos de excitação citados na figura. Quando se consome altas doses de drogas, a quantidade de dopamina liberada é muito inferior à quantidade normal, diminuindo, portanto, a sensação de prazer e satisfação natural. A parte em vermelho mostra os caminhos da serotonina, outro neurotransmissor, envolvida na comunicação entre os neurônios. Essa comunicação é responsável pela capacidade de resposta aos estímulos ambientais. Fármacos que controlam a ação da serotonina são utilizados em patologias como: ansiedade, depressão, obesidade, entre outras. Medicamentos como a Fluoxetina são administrados em pessoas deprimidas e que possuem baixos níveis de serotonina.

Figura 7. Desenho esquemático mostrando as áreas do cérebro onde atuam os receptores canabinoides.

Um segundo receptor, o CB2, é mais abundante nas células do sistema imunológico, e em contraste com o CB1 não é encontrado no cérebro e não está ligado a canais iônicos (BAKER et al., 2003). Receptores CB2, e possivelmente outros tipos de receptores canabinoides, ainda a serem caracterizados, podem também contribuir para efeitos analgésicos e/ou antinociceptivos dos canabinoides (PERTWEE, 2004).

As Figuras 8 e 9 mostram uma representação esquemática dos receptores canabinoides. Na Figura 8 nota-se a diferença entre o CB1 e o CB2, as linhas em vermelho representam o comprimento maior do receptor CB1 em relação ao receptor CB2. A diferença mais importante, como mostra a Figura 9, entre os dois receptores está localizada na região N-terminal [na parte extracelular 2, loop 2 (EL2)], na parte intracelular 3, loop 3 na região C-terminal da hélice transmembranal 7 (TM7), e no C-terminal. Somente o receptor CB1 de todos os membros da família de receptores

acoplados à proteína G (GPCRs) tem um N-terminal longo, de aproximadamente 70 resíduos (MONTERO et al., 2005).

Figura 8. Esquema bidimensional dos receptores canabinoides CB1 e CB2. As linhas vermelhas mostram a diferença nos comprimentos nessas áreas (MONTERO et al., 2005).

Figura 9. Representação esquemática da diferença estrutural entre os receptores canabinoides CB1 e CB2. As bolinhas em azul (CB1) e verde (CB2) mostram a diferença nos comprimentos do carbono terminal e nitrogênio terminal.

I. 8. Canabinoides endógenos

Um composto endógeno é aquele produzido naturalmente pelo organismo e que interage com o receptor. A presença de receptores canabinoides em células mamárias foi um indicativo da existência de um sistema canabinoide endógeno (receptores canabinoides são ativados por endocanabinoides). Há muitos anos atrás, o primeiro ligante natural (canabinoide endógeno) foi isolado do cérebro de suínos e identificado como uma amida relacionada ao ácido araquidônico, o *cis*-5,8,11,14-eicosatetraenóico, ou ANANDAMIDA (AEA – Figura 8), mostrando propriedades similares ao agonista THC, derivado da planta *Cannabis sativa*. Alguns anos depois, um intermediário bem conhecido no metabolismo do fosfoglicerídeo, o 2-araquidonolglicerol (2-AG – Figura

8), mostrou agir também como um ligante pontencial a receptores canabinoides. A base molecular dos efeitos biológicos desses compostos endógenos foi elucidada também graças ao entendimento do seu metabolismo, incluindo a trilha biológica que leva à sua síntese e inativação. Ambos AEA e 2-AG são produzidos a partir do metabolismo de membranas fosfolipídicas e liberados imediatamente no espaço extracelular (BRIZZI et al., 2005).

Vários outros ácidos graxos etanolamidas, além do AEA, estão presentes no cérebro, dois dos quais, o gama-linoleniletanolamide e o docosatetraeniletanolamida, têm afinidades de ligação comparável ao AEA, mas os outros não se ligam ao receptor CB1 (HANUS et al., 1993). Isso sugere que a família de derivados dos ácidos graxos interage em diferentes graus com os receptores canabinoides (MARTIN; MECHOULAM; RAZDAN, 1999).

Do ponto de vista farmacológico, os ligantes canabinoides estão divididos em três categorias: (1) compostos que são, ou não são poucos seletivos para um só subtipo de receptor canabinoide, tais como os canabinoides clássicos (Δ^9 -THC e compostos correlacionados), (2) canabinoides não clássicos, do tipo CP-55,940 (Figura 8) e derivados, e os aminoalquilindóis, como, por exemplo, o WIN-55,212-2 (Figura 8); (3) compostos que são seletivos para o receptor canabinoide CB1, tais como os biarilpirazoles, por exemplo o SR-141716, e muitas outras estruturas heterocíclicas diversas (STERN et al., 2006).

Figura 10. Ligantes representativos das diversas classes de compostos canabinoides.

I.9. Estudos da relação estrutura atividade biológica (SAR) em compostos canabinoides

Estudos tradicionais da relação estrutura atividade biológica em canabinoides indicaram características que são importantes para manter a atividade biológica do Δ^9 -THC e seus análogos (FICHERA et al., 2000), como por exemplo o grupo hidroxil fenólico e a extensão da cadeia lateral pentil responsável pelo aumento da afinidade observado no derivado do dimetilheptil (DMH). A orientação e a natureza química do substituinte na posição C9 (REGGIO; PANU; MILES, 1993) também parece uma região de interação estérica, localizada próxima ao topo do anel carbocíclico, na parte inferior da molécula, que é uma região ocupada por átomos em análogos inativos e não ocupada por átomos em análogos ativos. Outros estudos de SAR sugeriram que a anandamida e seus análogos, apesar de pertencerem a uma classe de compostos diferentes dos canabinoides bi e tricíclicos, contêm características estruturais específicas necessárias para se ligarem ao receptor CB1 e produzir a atividade psicotrópica (REGGIO et al., 1990; LITTLE et al., 1989; MECHOULAM; DEVANE; GLASER, 1992; REGGIO; GREER; COX, 1989).

Aliado ao fato dos compostos canababinóides possuírem características estruturais muito semelhantes à classe de compostos opióides, em geral com um anel pirâmico, um anel aromático e uma hidroxila ligada a este anel, estes compostos possuem semelhanças com a anandamida no mecanismo de ação quando ligados a receptores do tipo canabinoides, no que diz respeito ao efeito analgésico e alívio da dor.

Com a identificação e caracterização dos receptores biológicos para canabinoides, pode-se, por analogia com receptores opióides, propor algumas inferências à respeito do mecanismo de ação da atividade analgésica e efeitos psicotrópicos dos compostos canabinoides.

De acordo com a caracterização dos receptores canabinoides CB1 e CB2, que possuem sete domínios hidrofóbicos na membrana celular, os compostos canabinoides com altos valores de coeficiente de partição (logP) podem melhor interagir com os receptores CB1 e CB2, desencadeando uma série de reações responsáveis pela dor, uma vez que o CB1 em grande parte se encontra localizado nas células nervosas, além do hipocampo, cerebelo e córtex cerebral.

No sistema nervoso central existem múltiplos tipos de receptores opioides, que são um grupo de receptores acoplados à proteína-G e são classificados como mu (μ), kappa (κ) e delta (δ), sendo o primeiro o mais importante dos três. O μ representa a morfina (CORBETT et al., 2006) e pensa-se que as proteínas-G se ligam ao terceiro *loop* intracelular dos receptores opioides. A ativação dos μ -receptores no cérebro é responsável pela atividade analgésica dos medicamentos semelhantes à morfina. Os opióides como a morfina, a codeína, a hidromorfina, dentre outros, agem especificamente sobre os μ -receptores (FINE; RUSSEL, 2004).

A elucidação do mecanismo de ação dos compostos canabinoides e suas interações com seus respectivos receptores biológicos, e de que forma os mesmos interagem no organismo, é de suma importância para o entendimento dos efeitos terapêuticos da planta *Cannabis sativa*. A descoberta de novos fármacos com potencial analgésico e livre de efeitos adversos, como a psicoatividade, levará a um grande

avanço da ciência nessa área. A caracterização da estrutura química dos receptores CB1 e CB2, contribuirá para a descoberta de fármacos potentes no uso contra alguns distúrbios do organismo. A disfunção dos receptores acoplados à proteína-G causa muitas doenças humanas, e eles são um alvo farmacêutico “quente”, pois aproximadamente 52% das drogas agem sobre esses receptores. O sistema endocanabinoide (consistindo dos receptores e ligantes endógenos) está envolvido em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, depressão, inflamações, obesidade, dores neuropáticas, entre outras (IVERSEN; CHAPMAN, 2002). Portanto, o desenvolvimento de agonistas e antagonistas, incluindo aqueles com seletividade para os receptores CB1 e CB2, vem sendo o enfoque de intensas pesquisas (DI MARZO; PETROSINO, 2007; BATTISTA et al., 2006; BOYD, 2006; IVERSEN; CHAPMAN, 2002).

CAPÍTULO II

II. ASPECTOS IMPORTANTES DO TRABALHO E OBJETIVOS

II.1. Estudos de SAR dos compostos canabinoides estudados no grupo de química quântica

Os compostos canabinoides têm sido fruto de uma longa pesquisa realizada pelo grupo de Química Quântica do Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP. Duas Dissertações de Mestrado e duas Teses de Doutorado com compostos canabinoides que apresentam atividade psicotrópica (HONÓRIO, 2004; 2000) e analgésica (ARROIO, 1999; 2004) já foram defendidas. O interesse do mundo científico em estudar os compostos da maconha é muito grande e pesquisas com estes compostos têm aumentado nos últimos anos, isso devido ao grande potencial terapêutico da planta *Cannabis sativa* com promessas esperançosas de produção de novos medicamentos a partir dos compostos da planta que podem trazer tratamentos para doenças como obesidade, síndrome metabólica associada, esclerose múltipla, dores crônicas, entre outras (STERN et al., 2006).

Todos os estudos realizados com os compostos canabinoides no grupo de Química Quântica USP/São Carlos, e artigos já publicados (HONÓRIO, 2005; ARROIO, 2004), dizem respeito ao estudo teórico da relação (qualitativa) entre as estruturas químicas das moléculas canabinoides e suas atividades biológicas. A escolha dos compostos foi realizada após longa pesquisa bibliográfica, alguns artigos importantes são: (RAZDAN, 1996; BURSTEIN, 1999; MARTIN, 1993) e os estudos

foram feitos em cima de dados qualitativos e não quantitativos de atividade. Os resultados que dispunham para este estudo foram baseados em moléculas que apresentaram atividade psicotrópica ou analgésica.

Estudos prévios foram feitos, levando em consideração cálculos quânticos e análises quimiométricas, porém, o foco principal desta Tese é a modelagem do receptor canabinoide CB1 e o estudo da interação composto canabinoide-receptor biológico, especificamente o receptor canabinoide CB1. Os compostos usados para o estudo de interação com o receptor foram o Δ^9 -THC, principal constituinte ativo da planta *cannabis*, e os compostos inativos: 2-carboxi- Δ^8 -THC, o 4-carboxi- Δ^9 -THC e o 4-carbometoxi- Δ^8 -THC, com o objetivo de tentar explicar quais fatores que causam a psicoinatividade desses compostos.

De acordo com sua distribuição e funcionalidade, os receptores CB1 estão predominantemente localizados no sistema nervoso central e são, provavelmente, responsáveis pela maioria dos efeitos farmacológicos dos canabinoides (TUCCINARDI et al., 2006). Este trabalho visa contribuir, através do estudo da relação estrutura química-atividade biológica para o entendimento do mecanismo de ação dos receptores canabinoides e suas interações com o Δ^9 -THC e seus análogos psicoativos.

O estudo da interação canabinoide-receptor, foi feito com a metodologia de *docking*. O modelo teórico do receptor CB1 foi construído e a forma como ele interage com o princípio ativo da planta *Cannabis sativa*, o Δ^9 -THC e seus análogos, foi analisado. Tudo isto será mostrado e discutido nos próximos capítulos.

II.2. Objetivos e relevância do trabalho

Este trabalho, como já mencionado, consiste em uma extensão de trabalhos anteriores com alguns compostos canabinoides, realizados pelo grupo de Química Quântica (QQ) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo (USP), sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica (psicotrópica e analgésica) de compostos canabinoides. Estudos desenvolvidos nesta Tese darão ênfase aos compostos canabinoides que apresentam atividade psicotrópica.

A origem dos trabalhos realizados com compostos canabinoides se deve ao fato de serem muitas as interrogações acerca do potencial terapêutico que possuem esses compostos, além de seu efeito psicotrópico, o qual é a razão da utilização da planta, há séculos, pelo homem, e cujas preparações são temas de muitas controvérsias. Portanto, nosso interesse agora é contribuir para o entendimento do mecanismo de interação de compostos canabinoides com o receptor biológico CB1, com o intuito de conhecer quais os fatores que determinam, em nível molecular, se um composto canabinoide é psicoativo ou psicoinativo. Os nossos objetivos são: construir o modelo tridimensional do receptor CB1, por meio do procedimento de modelagem molecular usando a estrutura de raio-X da rodopsina bovina; fazer o alinhamento da sequência de aminoácidos; ativar a estrutura obtida, uma vez que a mesma é obtida no seu estado inativo; estudar, de posse do modelo do receptor CB1, as interações desse receptor com o Δ^9 -THC e seus análogos inativos, a fim de conhecer como e onde acontecem as principais interações dessas moléculas com o receptor CB1; e por fim, confrontar os resultados já obtidos pelo grupo com os resultados obtidos do *docking* fazendo um paralelo entre as variáveis que foram consideradas importantes na separação entre

composto ativo e inativo e o comportamento dos compostos canabinoides dentro do sítio ativo do receptor. Entender por exemplo, de que maneira um substituinte volumoso em uma determinada posição no composto pode torná-lo inativo.

A modelagem do receptor foi feita durante o estágio de doutorado sanduíche do programa PDEE/CAPES com um grupo de pesquisa do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de Pisa – Itália, em 2007, sob a orientação do Professor Dr. Adriano Martinelli e supervisão do Dr. Tiziano Tuccinardi. Uma vez feita a modelagem do receptor, é importante a busca de novos ligantes que ativem esses receptores para estudos da formação de complexos ligante-receptor. Este procedimento é importante na elucidação do mecanismo de ação dos compostos canabinoides em nível molecular, bem como, futuramente, na proposta de novos compostos canabinoides com potencial terapêutico e isento de atividade psicotrópica.

Os descritores moleculares selecionados previamente através de técnicas de Química Quântica e Quimiometria foram aqueles que, dentre tantos, conseguiram fazer uma boa separação entre compostos psicoativos e psicoinativos. Foram quatro os descritores selecionados: descritor eletrônico (E_{LUMO} -orbital molecular de mais baixa energia desocupado), descritor hidrofóbico (LogP-coeficiente de partição), descritor estérico (VC4-volume do substituinte na posição do carbono 4) e topológico (LP1-índice de ramificação molecular). Essas variáveis serão tomadas como base para explicar, agora na presença do receptor, a psicoinatividade de um composto canabinoide.

CAPÍTULO III

III. METODOLOGIA

III. 1. Estudos anteriores

Após uma revisão bibliográfica ampla, encontrou-se uma série de compostos canabinoides, de estruturas clássicas e não-clássicas, cujas atividades psicotrópicas variam de ativos até inativos, com base em testes biológicos realizados em animais. Como as atividades relatadas na literatura são em termos de “composto ativo” ou “composto inativo”, o estudo realizado foi baseado nos aspectos qualitativos de atividade e não quantitativos. (MECHOULAM, 1973; RAZDAN, 1986; MECHOULAM; GAONI, 1967; DA SILVA; TRSIC, 1995). Esses compostos foram exhaustivamente estudados pelo grupo de Química Quântica do Instituto de Química de São Carlos, e uma Dissertação de Mestrado e uma Tese de Doutorado já foi defendida (HONÓRIO, 2000; 2004) em cima de uma abordagem teórica, tanto do ponto de vista da química quântica como da quimiometria.

Cálculos das propriedades moleculares que são importantes para a atividade biológica desses compostos foram feitos e um modelo teórico foi criado com base nessas propriedades. As análises quimiométricas: análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de grupos (HCA) e o método do k-ésimo vizinho mais próximo (KNN) mostraram que: uma propriedade eletrônica (energia do LUMO – orbital de mais baixa energia desocupado), uma hidrofóbica (o logaritmo do coeficiente de partição, log P), uma estérica (volume do substituinte na posição do carbono 4) e uma topológica (o índice de Lovasz-Pelikan) foram as propriedades mais

importantes para a separação entre os compostos psicoativos e os psicoinativos (HONÓRIO; DA SILVA, 2005).

A Figura 9 ilustra a estrutura geral dos compostos canabinoides (bidimensional e tridimensional), juntamente com a numeração que foi utilizada.

Figura 11. Estrutura geral (a) bidimensional, (b) tridimensional e numeração usada nos compostos canabinoides estudados.

A Figura 10 mostra a estrutura química de dois compostos canabinoides clássicos. A indicação “Ac” significa que o composto é ativo, e a indicação “Ic” que o composto é inativo.

Figura 12. Estrutura e indicação da psicoatividade de dois compostos canabinoides, (A) um composto ativo e (B) um composto inativo.

III. 2. Estudos de modelagem molecular

A elucidação tridimensional de proteínas (estruturas terciárias e quaternárias), enzimas e receptores, é de extrema importância no campo da medicina e no processo de planejamento de fármacos. Informações estruturais sobre como as drogas interagem com seus receptores são necessárias para o entendimento do mecanismo de ação de um determinado fármaco. As técnicas experimentais de cristalografia de raio-X e difração de nêutrons, ou mesmo de ressonância magnética nuclear (RMN), são muito eficientes, mas alguns problemas ainda persistem (SANTOS; ALENCASTRO, 2003). A obtenção de amostras em quantidade suficiente para os ensaios necessários é, em muitos casos, difícil e os cristais obtidos nem sempre têm a qualidade necessária para o trabalho experimental (somente uma em cada vinte proteínas, aproximadamente, produz cristais adequados). Além disso, em certas classes de proteínas, como por exemplo as proteínas de membrana celular (onde estão incluídos os receptores acoplados à proteína G - GPCRs), a determinação estrutural é um desafio. Essas

proteínas raramente cristalizam e dificilmente podem ser tratadas de modo satisfatório por RMN. Por outro lado, a elucidação das sequências de aminoácidos (estruturas primárias) é uma tarefa relativamente mais simples (SANTOS; ALENCASTRO, 2003).

III. 3. Procedimento da modelagem por homologia

Baseado no passo de alinhamento, os domínios transmembranais do receptor canabinoide são geralmente construídos do raio-X da rodopsina bovina, cuja primeira estrutura foi depositada no PDB (Banco de Dados de Proteínas) em 2000 por PALCZEWSKI et al., 2000, com o código 1F88.

Uma abordagem alternativa para construir um modelo molecular de uma proteína é o procedimento de Modelagem por Homologia (HM), no qual a proteína alvo é construída a partir da estrutura tridimensional de uma proteína conhecida experimentalmente (MARTINELLI; TUCCINARDI, 2006). No caso desta Tese, a proteína alvo é o receptor canabinoide CB1 e a proteína conhecida é a rodopsina bovina.

Os receptores proteína-acoplados G (GPCRs) são abundantes e ativam os complexos que representam os alvos para até aproximadamente 60% dos fármacos, mas há uma escassez de dados estruturais (DASTMALCHI; CHURCH; MORRIS, 2008). A rodopsina bovina é o primeiro GPCR para o qual as estruturas de alta resolução foram completadas, mas as variações significativas na estrutura provavelmente existem entre os GPCRs. O conhecimento estrutural detalhado da

estrutura do GPCR é de grande interesse, porque são alvos importantes para agentes terapêuticos. Por causa disso, esforços têm sido feitos com a intenção de desenvolver ferramentas *in silico* para o refinamento de estruturas de GPCRs (DASTMALCHI; CHURCH; MORRIS, 2008). Várias abordagens têm sido usadas na construção de modelos tridimensionais de GPCRs e podem ser classificadas amplamente em duas categorias: aquelas que usam a modelagem comparativa, ou modelagem por homologia, e aquelas que usam abordagens *ab initio* (de novo) (MARTINELLI; TUCCINARDI, 2006).

A primeira abordagem tenta arranjar o esqueleto da sequência do receptor GPCR com relação àquela da rodopsina bovina (proteína conhecida). Na segunda abordagem, as conformações dos *loops* (alças) são geradas por métodos computacionais tais como dinâmica molecular, *simulated annealing* e métodos analíticos (MARTINELLI; TUCCINARDI, 2006).

III. 4. Principais passos para a modelagem por homologia

O procedimento de construção do modelo computacional para o GPCR consiste em três passos: (1) o alinhamento da sequência do receptor na rodopsina bovina, no estado inativo (MONTERO et al., 2005), código PDB 1F88, (2) a modelagem do receptor (transmembranas, *loops* e cadeias laterais) e finalmente (3) otimização da estrutura através de simulações de dinâmica molecular (MD) e minimizações de mecânica molecular (MM) (MONTERO et al., 2005).

III. 4.1. O alinhamento

O alinhamento seqüencial da rodopsina e do receptor canabinoide CB1 foi realizado usando o programa Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), que desde os anos 90 tem sido o programa mais usado para fazer o alinhamento, sendo capaz de alinhar dados com tamanho razoável de maneira rápida e fácil (LARKIN et al., 2007).

Quando se compara estruturas de proteínas relacionadas com diferentes sequências de aminoácidos, é necessário primeiro realizar um alinhamento estrutural, ou seja, definir um mapa equivalente entre os resíduos nas diferentes estruturas baseado em suas diferentes posições no espaço. Uma vez que as estruturas foram alinhadas tridimensionalmente, similaridades e diferenças podem ser estudadas a fim de entender a função e o comportamento das moléculas em consideração (MOSCA; BRANNETTI; SCHNEIDER, 2008).

O programa Clustal W atribui pesos individuais para cada sequência em alinhamento parcial (MARTINELLI; TUCCINARDI, 2006). Os pesos são normalizados de forma que o maior está ajustado para o valor de 1.0 e todo o resto para valores menores do que 1.0. Grupos com sequências muito correlacionadas recebem pesos mais baixos, pois possuem muitas informações duplicadas. Sequências divergentes, sem qualquer familiaridade recebem pesos altos às sequências mais similares, e um peso mais alto é atribuído àquele mais diferente. Esses pesos são usados como simples fatores de multiplicação para os escores de diferentes sequências ou grupos pré-alinhados de sequências (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

III. 4.2. A modelagem

Com base no alinhamento, é necessário construir os domínios transmembranais (TM) e os *loops*. Os fragmentos de loops são variáveis, especialmente no comprimento, e requerem um tratamento de modelagem especial. A modelagem dos loops é muito importante, não somente para a confiabilidade geométrica do receptor completo, mas também porque, frequentemente, os loops contribuem nos sítios ativos (MARTINELLI; TUCCINARDI, 2006). O programa MODELLER (SALI, A.; BLUNDELL, 1990) é o mais usado no passo da modelagem, pois o mesmo usa uma abordagem de modelagem comparativa que modela estruturas tridimensionais de proteínas satisfazendo restrições espaciais (distâncias e ângulos de torção) derivadas da estrutura molde (*template*). Essas restrições são geralmente obtidas assumindo que as distâncias e ângulos entre resíduos alinhados na estrutura do *template* e do alvo são similares (MONTERO et al., 2005). O modelo tridimensional final é então obtido por otimização de uma função de densidade de probabilidade molecular (pdf). A pdf molecular é otimizada com métodos de gradientes conjugados e dinâmica molecular com *simulated annealing*. O programa MODELLER não tem interface gráfica. As manipulações gráficas e visualizações foram realizadas no programa CHIMERA (HUANG et al., 1996).

III. 4.3. A otimização

Depois da construção do modelo tridimensional do receptor por meio do alinhamento e da modelagem, o modelo tem que ser otimizado através de métodos de refinamento com o objetivo de encontrar e corrigir possíveis erros no alinhamento e assim tentar chegar o mais perto da estrutura molde (*template*). No passo de otimização, uma combinação de dinâmica molecular (DM) e métodos de minimização se faz necessário (TUCCINARDI et al., 2006). O protocolo usado neste trabalho foi seguido de acordo com a orientação sugerida e adotada no Laboratório de Modelagem Molecular e Ensaio Virtual do Departamento de Ciências Farmacêutica, Universidade de Pisa – Itália, durante o estágio de Doutorado sanduíche, com bolsa do programa PDEE/CAPES, sob a orientação do Prof. Adriano Martinelli e supervisão do pesquisador Dr. Tiziano Tuccinardi.

Os cálculos de dinâmica molecular (MD) e mecânica molecular (MM) foram realizados usando o campo de força AMBER, implementado no pacote computacional Macromodel (Macromodel ver. 8.5, Schrodinger Inc., 1999).

III. 5. A validação do modelo

Cada novo modelo gerado na modelagem molecular deve ser validado. A validação ideal é aquela onde se aplica o mesmo procedimento tanto para a estrutura conhecida experimentalmente (nesse caso, a rodopsina bovina) como para aquela que está sendo modelada (o receptor canabinoide CB1) (TUCCINARDI et al., 2006).

A qualidade estereoquímica do modelo é de importância fundamental. O programa mais utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos, o PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993), avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN, 1968). O gráfico de Ramachandran é particularmente útil porque ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas (FILHO, 2003).

III. 5.1. Passos da validação estrutural

O passo de validação avalia a qualidade da estrutura tridimensional do modelo. O primeiro passo é realizado através do método baseado no conhecimento (*knowledge-based method*), o qual examina a geometria e a estequiometria do modelo derivado de estruturas de alta-resolução (TUCCINARDI et al., 2006). O segundo passo da validação estrutural se refere à inspeção de dados experimentais; se estudos de mutagênese revelam um papel significativo para certos resíduos, a maneira como esses resíduos estão envolvidos na interação ligante-receptor ou interações internas, constitui um dos elementos de validação tridimensional do receptor.

Uma vez pronto e validado, o modelo pode ser usado para estudos de interação ligante-receptor, chamado estudos de *docking*.

III. 6. Estudos de *docking*

O objetivo do docking é a formação de complexos não covalentes entre um composto e um alvo macromolecular cuja estrutura tridimensional seja conhecida. Por exemplo, dada a estrutura de uma proteína e de um ligante, a tarefa é prever a estrutura resultante do complexo formado entre eles. O termo ligante será empregado para designar cada um dos compostos utilizados na construção dos complexos. Esses ligantes podem ser diferentes compostos ou diferentes conformações para o mesmo

composto. Normalmente, são fatores estruturais e energéticos que contribuem para que um composto seja capaz de se ligar a uma dada proteína de modo seletivo.

Um dos fatores que atuam entre a proteína e o ligante é de natureza eletrostática. Ela é a interação entre cargas explícitas, dipolos, dipolos induzidos e multipolos carregados que levam aos fenômenos que são conhecidos como pontes salinas, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals [ABRAHAM, D.J., 2003].

As ligações de hidrogênio influenciam não só na especificidade do modo de ligação, como também desempenham um papel fundamental nos processos biológicos de transporte, adsorção, distribuição, metabolismo e excreção de pequenas moléculas.

A afinidade no modo de ligação pode ser influenciada também por interações atrativas entre multipolos eletrônicos (induzidos), conhecidas como interações de van der Waals, cuja contribuição para a seletividade da interação está relacionada com a adaptação dos componentes repulsivos dessa interação. A base física dessas interações já está bem estabelecida por teorias de forças eletromagnéticas ou, em nível mais fundamental, de mecânica quântica. Porém, em macromoléculas, sistemas líquidos ou soluções, a aplicação direta desses princípios é muito complicada devido ao tamanho e complexidade do sistema, onde centenas de partículas interagem simultaneamente e influenciam umas as outras [ABRAHAM, D.J., 2003].

Assim, a natureza macromolecular da proteína, e o fato de que a ligação ocorre em meio aquoso, aumentam a configuração da dimensionalidade do espaço, complicando, consideravelmente, a contribuição das energias que governam as

interações. Desta forma, algumas simplificações são aceitáveis desde que mantenham certa acuracidade na predição das interações proteína-ligante presentes no complexo formado a um baixo custo computacional [ABRAHAM, D.J., 2003].

Há três pontos fundamentais no *docking*, um deles é a representação do sistema, o outro é a pesquisa do espaço conformacional e, por último, a seleção das possíveis soluções. O que um programa de *docking* faz é simular a interação na superfície da proteína que pode ser descrita por um modelo matemático. Um estudo de *docking* envolve também uma boa função de escore que deve ser rápida o suficiente para permitir sua aplicação num grande número de soluções em potencial e atribuir um peso adequado a todas as contribuições energéticas do sistema [HALPERIN et al., 2002].

Na verdade, o complexo gerado por um programa de *docking* é o resultado da busca que o algoritmo faz pela energia de ligação mais baixa proveniente do modo de ligação do composto no sítio pré-definido da proteína. Desta forma, esta abordagem pode ser muito útil para predizer e interpretar o modo de ligação de um composto no sítio receptor e estimar a energia livre de ligação através das interações intermoleculares.

Vale ressaltar que embora o *docking* seja uma ferramenta computacional, para que os seus resultados tenham relevância é necessário ter domínio nas áreas de Química e Biologia Molecular para que a análise dos complexos seja avaliada não só do ponto de vista energético, mas também do ponto de vista estrutural e de complementaridade química.

III. 7. *Docking* ligante-receptor

Como já mencionado, os estudos de *docking* ligante-receptor são utilizados para encontrar a conformação e a orientação de um ligante com relação a um determinado receptor quando a estrutura do mesmo é conhecida ou pode ser modelada. A partir disso, é possível estimar a força de associação entre ligante e receptor por meio de função de escore. Assim, o procedimento dos estudos de *docking* pode ser descrito como uma combinação entre um algoritmo de busca conformacional e uma função de escore. A abordagem mais comum é tratar o receptor como sendo rígido e considerar apenas o espaço conformacional do ligante, embora o ideal seja considerar também a flexibilidade do receptor (KITCHEN et al., 2004).

Neste trabalho, os estudos de *docking* foram feitos utilizando o programa AUTODOCK 3.0 (MORRIS et al., 1998) que é um programa mais detalhado fisicamente, pois faz uso de técnicas de *docking* flexível (MORRIS et al., 1998) baseadas na formação de uma grade para o cálculo de energia da proteína e pré-cálculo da energia de interação ligante-proteína que pode ser usada como parâmetro durante a simulação de (*simulated annealing* – Monte Carlo) conformações ótimas do ligante. O programa AutoDock tem sido aplicado com sucesso na predição de conformações de complexos enzima-inibidor, peptídeo-anticorpo e interações proteína-proteína. O *docking* molecular tem um problema de otimização, pois requer uma amostragem eficiente através da escala de possibilidades posicionais, orientacionais e conformacionais.

III. 7.1. Preparação dos arquivos do AUTODOCK

Os parâmetros do programa AutoDock dizem quais arquivos de mapa usar, a molécula do ligante que se deve mover, quais são seus centros e números de torsões, por onde começar a mover o ligante, quais resíduos flexíveis da cadeia lateral devem se mover, qual algoritmo a ser usado e quantos cálculos devem ser rodados. Usualmente, os arquivos têm a extensão “.dpf”.

Quatro algoritmos estão disponíveis no AutoDock: SA, o original Monte Carlo *simulated annealing*; GA, um algoritmo genético tradicional Darwiniano; LS, busca local e GALS, o qual é um algoritmo genético com busca local, também conhecido como algoritmo genético Lamarquiano. Cada método tem seu próprio conjunto de parâmetros que devem ser definidos antes de rodar o *docking*. Os parâmetros mais importantes afetam no tempo computacional do *docking*, no *simulated annealing*, como por exemplo o número de ciclos de temperatura. O número de movimentos aceitos e rejeitados determina quanto tempo o *docking* vai levar para ser calculado.

III. 7.2. Funções de energias livres de ligação

O estudo da estrutura molecular é muito importante para a biologia molecular computacional. Existem vários métodos estabelecidos para cálculos de mecânica molecular e dinâmica molecular, por exemplo, os campos de força do caso da mecânica molecular (MM): AMBER (WEINE et al., 1984), CHARMM (BROOKS et al., 1983), DISCOVER (HAGLER; HULER; LIFSON, 1977), ECEPP (NEMETHY; POTTLE; SCHERAGA, 1983) e GROMOS (BERENDSEN et al., 1984). Muitos

desses modelam a energia de interação de um sistema molecular com termos para dispersão/repulsão, ligações de hidrogênio, termos eletrostáticos e desvios dos comprimentos de ligação e ângulos ideais (MORRIS et al., 1998). Esses métodos são excelentes para estudar processos moleculares que variam com o tempo porque aperfeiçoam as conformações de otimização e cálculos de perturbações da energia livre entre moléculas com uma única mudança de átomo, mas, freqüentemente necessitam de um investimento e um tempo computacional considerável. Então, faz-se necessário uma relação empírica entre a estrutura molecular e a energia livre de ligação. As funções de escores buscam corrigir algumas deficiências dos campos de força tradicionais desenvolvendo funções de energia livre que reproduzam constantes de ligação observadas. A maioria dessas abordagens usam uma equação expandida para modelar a energia livre de ligação, adicionando termos entrópicos às equações de mecânica molecular, como mostra a Equação 1.

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{torc} + \Delta G_{sol} \quad (1)$$

Os quatro primeiros termos são típicos de mecânica molecular para termos de dispersão/repulsão, ligação de hidrogênio, eletrostáticos e termos de desvios da geometria covalente, respectivamente. ΔG_{torc} modela rotações globais e translacionais; ΔG_{sol} modela efeitos de solvatação e hidrofóbicos (MORRIS et al., 1998).

Todos os cálculos de mecânica molecular e dinâmica molecular foram realizados neste trabalho com o programa MACROMODEL, usando o campo de força AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement). As cargas eletrostáticas

foram aquelas já existentes no campo de força e a constante dielétrica, dependente da distância usada, foi de 4.0. Nos cálculos de minimização, o algoritmo usado foi o *Steepest Descent* seguido pelo gradiente conjugado (*Conjugated Gradient*) até um valor de convergência de 0.05 kcal/ Å.mol. Nas simulações de dinâmica molecular, a temperatura foi de 300 °K com passos de 1 femtosegundo.

O objetivo do campo de força AMBER é modelar exatamente energias conformacionais e interações intermoleculares que envolvem proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas com os grupos funcionais relacionados, que são de interesse na química orgânica e bioquímica (CORNELL et al., 1995). O modelo é representado pela Equação 2.

$$E_{total} = \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\Phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (2)$$

Esse modelo pode ser descrito como “minimalístico”, na sua forma funcional, com ângulos e ligações representados por uma expressão harmônica simples, a interação de van der Waals representada pelo potencial 6-12 (Lennard-Jones), interações eletrostáticas modeladas por uma interação coulombica e energias diedrais representadas (na maioria dos casos) por um simples conjunto de parâmetros, frequentemente especificado somente por dois átomos centrais. As interações eletrostáticas e de van der Waals são calculadas somente entre átomos em moléculas diferentes, ou para os átomos na mesma molécula separados pelo menos por três

ligações. Aquelas interações não-ligadas, separadas por exatamente três ligações, são reduzidas pela aplicação de um fator de escala (CORNELL et al., 1995). Essa representação sugere uma maneira mais simples de calcular a energia para modelar a maioria dos sistemas.

CAPÍTULO IV

IV. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados que dizem respeito à modelagem do receptor canabinoide CB1, que foram realizados com o intuito de obter um modelo tridimensional desse receptor para análise das características dos sítios de interação e saber de que maneira os resíduos de aminoácidos presentes no sítio interagem com os compostos canabinoides do tipo Δ^9 -THC de estruturas clássicas. Para isso, as metodologias de modelagem molecular por homologia e estudos de *docking* ligante-receptor foram utilizadas.

Os resultados mostrados a seguir estão de acordo com os seguintes passos realizados: (1) alinhamento dos resíduos da proteína-alvo (CB1) com a proteína-molde (RhB); (2) construção do modelo tridimensional da proteína-alvo; (3) validação do modelo obtido; (4) otimização da estrutura através de simulação de dinâmica molecular (DM); simulação de mecânica molecular (MM); e (5) estudos das interações receptor modelado-ligante (*docking*). É importante ressaltar que a rodopsina bovina foi cristalizada no seu estado inativo, logo, os modelos dos receptores canabinoides CB1 e CB2 também representam um estado inativo.

IV. 1. Alinhamento

IV. 1.1. Procedimento computacional

A estrutura selecionada como *template* (molde) para modelar o receptor canabinoide CB1 foi a estrutura tridimensional da rodopsina bovina, resolução de 2.8 Å e código 1F88 (PALCZEWSKI et al., 2000), obtida do PDB – *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/pdb), de onde podem ser obtidas estruturas de proteínas e ácidos nucleicos. O alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína molde com o receptor CB1 foi feita com ajuda do programa ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>), que encontra o melhor alinhamento (global) para um conjunto de sequências (ácido nucleico ou proteína) dadas como input. As sequências são alinhadas através dos seus comprimentos inteiros e não somente em certas regiões.

Depois de definido o comprimento das hélices transmembranais do receptor, usando o programa Clustal W, a provável presença de α – hélices foi verificada por meio do programa PSIPRED, de predição de estrutura secundária (MCGUFFIN; BRYSON; JONES, 2000; JONES, 1999). As Figuras 13 e 14 mostram o alinhamento das sequências dos receptores canabinoides e a rodopsina bovina, código 1F88, no seu estado inativo. Sendo que a Figura 14 (também vista no anexo II) destaca: os domínios transmembranais (7 TM), as α -hélices e β -folhas. Os resíduos idênticos estão destacados em preto, enquanto que a predição de α -hélice e β -folha, calculada do programa Psipred, estão destacadas, respectivamente, na cor cinza e sublinhada.

Embora o alinhamento tenha sido feito com ambos os receptores CB1 e CB2, o modelo tridimensional foi feito somente para a estrutura do receptor CB1, que é o receptor de maior predominância no cérebro, e, portanto, responsável pela maioria dos efeitos terapêuticos dos compostos canabinoides, tais como analgesia, abaixamento da pressão intraocular e estimulação de apetite (SALO et al., 2004). Foram gerados 10 modelos com o MODELLER, e aquele que correspondeu ao valor mais baixo da função pdf, e as menores violações das restrições, foi usado para os estudos posteriores. Os resultados foram validados e o ciclo de realinhamento, modelagem e validação estrutural foi repetido até que nenhum melhoramento na estrutura fosse observado.

CB1	VPADQVNITEFYNKSLSSFKENEENIQCGENFMDIECFMVLNPSQQLAIAVLSLTGTFVLENLLVLCVILHSR
1F88	-----MNGTEGPNFYVPFSNKTG----VVRSPFEAPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLLIMLGFPINFLTLYVTVQHK
CB2	--MEECWVTEIANGSKDGLDSNP-----MKDYMILSGPQKTAVAVLCTLLGLLSALENVAVLYLILSSH
CB1	SLRCRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFIDFHVHFRK-DSRNVFLFKLGGVTASFTASVGSFLTATIDRYISIH
1F88	KLRT-PLNYILLNLAVADLFMVFGGFTTTLTYTSLHGYFVFGPTGCNLEGFFATLGGEIALWSLVLAIERVYVVC
CB2	QLRRKPSYLFIGSLAGADFLASVVFACSFVNFHVFHGV-DSKAVFLKIGSVTMTFTASVGSLLLTATIDRYLCLR
CB1	RPLAYKRIVTRPKAVVAFCLMWTIAIVIAVLPLLGWN---CEKLSQVCSDF--PH---IDETYLFWIGVTSVL
1F88	KPMSNFRFG-ENHAIMGVAFTWVMALACAAPPLVGWSRYIPEGMQCSCGIDYYTPHEETNNESFVIYMFVVFHII
CB2	YPPSYKALLTRGRALVTLGINWVLSALVSYLPLMGWT---CCPRP--CSELF--PL---IPNDYLLSWLLFIAFL
CB1	-LLFIVYAYMYILWKAHSHAVRMIQRGTQKSIIHTSEDKVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLILVVLIIICWGPLL
1F88	PLIVIFFCYGQLVFTVKEAAA-----QQQES-----ATTQKAEKEVTRMVIIMVIAFLICWLPYA
CB2	-FSGIITYYGHVLWKAHQHVASLSG-----HQDRQVPGMARMRLDVRLAKTLGLVLAVLLICWFPVL
CB1	AINVYDVFGKMNKLIKTVFAFCMSMLCLLNSTVNPIIYALRSKDLRHAFRSMFSPCEGTAQPLDNSMGDSCLHKKH
1F88	GVAFYIFTHQSDFGPIFMTIPAFFAKTSAVYNPVIYIMMNKQFRNCMVTTLCCGKNPLGDDEASTTVSKTETSQ
CB2	ALMAHSLATTLSDQVKKAFACMSMLCLINSMVNPVIYALRSGEIRSSAHHCLAHWKKCVRLG-----
CB1	ANNAASVHRAAESCIKSTVKIAKVTVMSVSTDTSAEAL
1F88	VAPA-----
CB2	SEAKEEAPRSSVTETEADGKITPWPDSRDLDLSDC--

Figura 13. Alinhamento dos receptores canabinoides CB1 e CB2 com a rodopsina bovina.

```

                                TM1
CB1  VPADQVNITEFYNKSLSSEFKENEENIQCGENFMDIECFMVLNPSQQLAIAVLSLTGLTFTVLENLLVLCVILSR
1F88  ----MNGTEGPNFYVPPSNKTG----VVRSPFEAPQYYLAEPFMSMLAYMFLIMLGFPINFLTAVTVQHK
CB2  --MEECWVTEIANGSKDGLDGNP-----MKDYHILSGPQKTAVAVLCTLLGLLSALENVAVLYLILSSH

                                TM2                                TM3
CB1  SLRCFPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFIDFVPHRK-D-SRNVPLFKLGVTASFTASVGSLEFLTAIDRYISIH
1F88  HLRTP-PLNYILLNFAADLFMVFGCFITTLTYTSLHGYFVFGPIGCNLEGFFALGCEIALWSTVVLISRYVVVC
CB2  QLRRPFSYLFIGSLAGADFLASVVFACSEVNFHVFHGV-D-SKAVFLKIGSVTMTFTASVGSLLLTAIDRYLCLR

                                TM4                                TM5
CB1  RPLAYKRIVTRPKAVVAFCLMGTIAIVIAVLP LLGWN---CEKLSVCSDIF--PH---IDETYLMEFWIGVTSVL
1F88  RRMNFRFG-ENHAIMGVAFTHMALACAAFDLGGGRYIPEGMQCSGIDYTTDHEETNNESFVIYMFVHPII
CB2  YPPSYKALLIRGRALVTLLGIMVLSALVSYLPLMGWT---CCFRP--CSELF--PL---IPNDYLLSWLLFIAFL

                                TM6
CB1  -LLFIVYAYMYILNFAHSHAVPMIQRCTQKSI IIHTSEDGKVQVTRPQARMDIRLAKTLVLILVVLICWGPLL
1F88  FLIVHFCQQLVFTVKEAAA-----QQQES-----ATTQKAEKEVIRMVIIIMVIAFLFCWLPYA
CB2  -FSGIITYYGEVLNFAHQHVASLSG-----HQDRQVPGMARMLDLVRLAKTLGLVLAVLLICWPPVL

                                TM7
CB1  AIMVYDVFGRMNLIKIVFAFCSMLCLLNSIVNP IYALRSKDLRHAFRSMFPCSCEGTAQPLDNSMGDSDCLHKK
1F88  GVAFYIFTHQGSDFGPIFMTIPAFFAKTSVAVNEMVLYMANKQFRCMVITLCCGKNPLGDOEASTVSKTETSQ
CB2  AIMARS LATTLSDQVKKAFAPFCSMLCLLNSMVNPVIYALRSGEIRSSAHHCLAHNKKCVRGLC-----

CB1  ANNAASVHRAAESCIKSTVKIAKV TMSVSTDTSAEAL
1F88  VAPA-----
CB2  SEAKFEAPRSSVTETADGKITPWPDSRRIJLSDG--

```

Figura 14. Alinhamento dos receptores canabinoides CB1 e CB2 com a rodopsina bovina, com as indicações dos domínios TMs.

A Figura 15 mostra o receptor CB1 já modelado, porém ainda no seu estado inativo. As regiões estruturalmente variáveis, como os *loops*, foram construídas de acordo com o procedimento padrão existente no programa MODELLER, que extrai um grande número de restrições espaciais da proteína base e constroi um modelo molecular da proteína que se quer estudar, nesse caso, o receptor CB1. Após a construção do modelo, o mesmo foi ajustado com métodos de Monte Carlo e *simulated annealing*, os quais provam todas as possíveis conformações de cadeia lateral, avaliando sua estabilidade relativa.

Figura 15. Modelo do receptor canabinoide CB1 no seu estado inativo. Os sete domínios transmembranais são indicados.

Após a otimização desse modelo, e depois de todo o processo de refinamento, o modelo é validado usando o programa PROCHECK, e um gráfico de Psi/Phi Ramachandran (Fig. 16) é gerado como resultado. O gráfico de Ramachandram explora possíveis combinações de ϕ (phi) e Φ (psi) em cadeias polipeptídicas. Para todos os aminoácidos (ver relação dos aminoácidos em anexo I), exceto Glicina, o gráfico descreve combinações permitidas e não permitidas de ϕ e Φ . No caso da Glicina não existe cadeia lateral que permita torsão ϕ/Φ .

A distribuição dos ângulos Psi/Phi obtida está dentro das regiões permitidas. A análise do mapa do Ramachandran mostra que a percentagem de resíduos em regiões favoráveis e permitidas soma 97,3% (86,5% e 10,8%, respectivamente). Apenas dois resíduos estão em regiões não permitidas, correspondendo a 0,6%, são eles: R73 (arginina 73) e H104 (histidina 104). Esses resíduos estão distantes do sítio de

interação não comprometendo, portanto, a utilização do modelo para o estudo de *docking*.

Figura 16. Gráfico do Ramachandram do receptor CB1. As regiões mais favoráveis são as de cor vermelha. Regiões permitidas, generosamente permitidas e não permitidas estão indicadas nas cores: amarelo, amarelo claro e branco, respectivamente.

IV. 1.2. A conformação ativa dos GPCRs

Como já dito anteriormente, a rodopsina bovina foi cristalizada no seu estado inativo, portanto é assumido que o modelo inicial do receptor CB1 também representa a conformação inativa.

A transição do estado inativo para o estado ativo de um GPCR (receptor acoplado à proteína-G) envolve vários eventos moleculares, como a interação com a proteína G e, principalmente, uma variação na conformação estrutural do GPCR. Infelizmente, ainda não existe uma estrutura tridimensional de um GPCR no seu estado ativado, no entanto, é possível, através de abordagens teóricas, chegar a uma estrutura ativa (abordagens computacionais como técnicas de Monte Carlo).

Estudos da mutação de sítios específicos em receptores da subfamília da rodopsina sugerem que o sítio ativo está localizado entre as regiões transmembranais formadas por TM3, TM5, TM6 e TM7 (MONTERO et al., 2005).

A ativação do GPCR parece ser determinada por um rearranjo específico diferente da TM3 e TM6. O rompimento da interação entre essas duas hélices produz a ativação do receptor, e, em particular, a ativação está fortemente correlacionada com a extensão das modificações na TM6, que está um pouco mais reto no receptor ativado (no inativo a TM6 tem uma inclinação). Quando a rodopsina é ativada, o resíduo W279 (triptofano 279) sofre uma rotação no ângulo de torção χ_1 (Fig.17) de gauche+ (Fig.18) para trans e o resíduo F123 (fenilalanina 123) de trans para gauche+. No receptor CB1, essa rotação é favorecida devido à melhor mobilidade conformacional desse resíduo, se comparado com o da rodopsina.

Depois de todas as mudanças necessárias no modelo do receptor CB1, para torná-lo ativo, obteve-se o seguinte modelo (Fig. 19):

Figura 19. Representação do modelo do receptor CB1 já no seu estado ativado.

É possível sobrepor os dois modelos, ativo e inativo, e observar as mudanças que foram feitas na TM3 e TM6 (Fig.20). Os resíduos em vermelho, azul e verde correspondem respectivamente, a: Fenilalanina (F123), que passa da conformação trans para gauche+; o Triptofano (W279), que passa da conformação gauche+ para trans; e a Prolina (P281), usada para fazer a rotação da TM3 e TM6.

Figura 20. Sobreposição dos dois modelos, ativo e inativo, onde é possível ver a diferença dos domínios TM3 e TM6, antes da ativação na cor roxa e depois da ativação na cor gelo.

IV. 1.3. Docking

Para fazer a “docagem” de uma molécula com seu receptor, é necessária uma série de estudos na literatura sobre alguns modelos que já foram possivelmente construídos do receptor de interesse, a fim de saber quais resíduos são importantes, ou seja, quais resíduos provavelmente interagirão com o ligante (no caso, o Δ^9 – THC se ligando aos resíduos do receptor canabinoide CB1). Identificados esses resíduos no receptor, o programa AUTODOCK 3.0 foi usado no cálculo das interações.

A Figura 21 mostra o Δ^9 – THC no sítio ativo do receptor CB1 modelado. Embora existam muitos resíduos em volta, nem todos fazem algum tipo de interação com o ligante.

Figura 21. Δ^9 – THC no sítio ativo do receptor CB1.

A Figura 22 mostra o Δ^9 – THC ligado ao receptor CB1, e os resíduos em verde representam aqueles considerados, segundo a literatura (SALO et al., 2004), importantes na interação ligante-receptor, e foi nessa região do CB1 onde foi “docado” o Δ^9 – THC. Alguns resíduos importantes, segundo SALO et al., são: serina (S37), glutamina (Q38), histidina (H104), arginina (R105), lisina (K106), ácido aspártico (D107), valina (V111) e fenilalanina (F112). As letras e os números entre parênteses representam, respectivamente, a abreviação do resíduo e a numeração universal dada à sequência do mesmo no alinhamento.

Figura 22. Δ^9 – THC “docado” com o receptor CB1, em verde estão os resíduos importantes que podem interagir com o ligante; em amarelo estão os resíduos que não contribuem na interação.

Segundo dados de mutagênese encontrados na literatura (SALO et al., 2004), o resíduo lisina K192 se mostrou muito importante para fazer ligação do receptor com o AEA (anandamida). Outros estudos também mostraram que mudanças nesse resíduo resultaram em uma grande perda na afinidade do receptor com o AEA e com o CP55940 (Fig. 10), que é um derivado do Δ^9 – THC (TUCCINARDI et al., 2006), portanto, é importante conservar esse resíduo. A conformação do docking escolhida foi aquela onde poderia haver interação de ligação de hidrogênio entre a lisina (considerada importante) do receptor (um hidrogênio ou nitrogênio) e o oxigênio ou hidrogênio do ligante, pois sendo a lisina um resíduo com muita flexibilidade, pode perfeitamente adotar conformações que interajam tanto com a hidroxila fenólica quanto com o oxigênio pirano do ligante.

Feitos os cálculos de *docking*, três conformações foram escolhidos para análise. A primeira conformação apresentou uma distância de 5,7Å entre o nitrogênio da K115 (lisina 115) e o oxigênio do ligante, por outro lado, o hidrogênio da histidina 104 (His104) faz uma interação de 2,7 Å com o oxigênio do ligante, como mostra a Figura 23. Apesar dessa forte interação com a His104, vale salientar que esse resíduo não é crítico para os estudos com os compostos de estrutura clássica como aqueles estudados nesse trabalho. O enfoque maior foi dado às interações observadas entre os compostos e o resíduo K115.

Figura 23. Primeira conformação do Δ^9 – THC interagindo com o resíduo da histidina 104 (His104).

Os resíduos do sítio ativo do modelo construído nesse trabalho são: Leu9, Val33, Gln38, Gln39, Ile42, Phe100, His101, His104, Phe112, Lys115, Leu116, Pro192, His193, Ile194, Lys299, Phe302, Ala303 e Ser306.

Uma segunda conformação escolhida foi aquela onde o ligante fez uma interação de 4.92 Å com a lisina 115 (mostrada na Figura 24), e apresentou também outra interação de 4.93 Å com a valina 111, que não fazia parte do grupo de resíduos do sítio ativo.

Figura 24. Segunda conformação do Δ^9 – THC interagindo com o resíduo da lisina 115 (Lys115).

A última conformação escolhida e, dentre as outras, a que melhor interagiu com o resíduo da lisina 115 (Lys115), considerado, segundo a literatura, importante para manter a ativação do receptor, forneceu como resultado uma interação de 2,24 Å entre o hidrogênio da lisina e o oxigênio do ligante, como ilustra a Figura 25. Essa interação é considerada forte, uma vez que as restrições para ligações de hidrogênio são de 3,0 Å.

Figura 25. Terceira conformação do Δ^9 – THC interagindo com o resíduo da lisina 115 (Lys115).

IV. 2. *Docking* do modelo do receptor CB1 e um composto canabinoide psicoativo

Depois de feito o estudo das interações do modelo gerado, ou seja, a interação do receptor CB1 com o Δ^9 – THC, que é o principal composto ativo da maconha, e responsável pelos seus efeitos psicoativos, um estudo de *docking* foi feito também para um composto que não apresenta essa atividade, ou seja, é psicoativo (Figura 26), a fim de verificar de que maneira esse composto se comporta no sítio ativo estudado.

O procedimento usado foi o mesmo, e a docagem foi feita no mesmo sítio de interação usado anteriormente.

Figura 26. Estrutura química do composto psicoativo 2-carboxi- Δ^8 -THC (Ic2).

Uma análise das possíveis interações desse composto com os resíduos do sítio ativo foi feita, e os resultados não mostraram interações com aminoácidos considerados importantes no processo de ativação do receptor, e as interação que aconteceram ultrapassaram o limite de tolerância para formação de uma ligação de hidrogênio. As interações mais próximas permitidas, de 3,27 Å e 3,92 Å ocorreram entre o oxigênio da metilona 286 com o hidrogênio do ligante e entre o nitrogênio da asparagina 289 com o hidrogênio do ligante, respectivamente, como ilustra a Figura 27.

Figura 27. Interações entre o ligante psicoativo e dois resíduos de aminoácidos.

A Figura 28 mostra a ilustração tridimensional do composto inativo (em destaque verde) no sítio ativo do receptor modelado CB1. O resíduo lisina 115 (Lys115), importante na interação de compostos ativos, se mostra distante tridimensionalmente do ligante, não interagindo com o mesmo.

Figura 28. Estrutura tridimensional do composto inativo 2-carboxi- Δ^8 -THC no sítio ativo do receptor.

Vale ressaltar outros resultados interessantes: o nitrogênio do resíduo de metilalanina 286 (Met286) faz uma interação consideravelmente forte de 2,72 Å com o oxigênio da leucina 282 (Leu282); esse mesmo oxigênio também interage com uma ligação de 3,05 Å com o nitrogênio da isoleucina 285 (Ile285), todos pertencendo ao sexto domínio transmembranar (TM6). E outros dois resíduos, pertencentes ao sétimo domínio transmembranar (TM7) mostraram uma interação de 3,07 Å entre o oxigênio da fenilalanina 302 (Phe302) e o nitrogênio da serina 306 (Ser306), como se um ciclo

fosse fechado com o ligante inativo, impedindo o mesmo de alcançar o sítio de ativação do receptor.

IV. 3. *Docking* do modelo do receptor CB1 e os compostos canabinoides psicoativos na presença de um substituinte volumoso na posição C4

Todos os resultados alcançados reforçam aqueles já obtidos através de análises quimiométricas, se avaliados com os estudos prévios sobre a psicoatividade dos compostos canabinoides (HONÓRIO, 2004; 2000) no grupo de Química Quântica/IQSC. Uma das variáveis que se mostrou muito importante na classificação dos compostos em psicoativos ou psicoativos foi o volume do substituinte nas posições do carbono C4 (ver Figura 11a), sendo este volume determinante no processo de psicoatividade de um composto canabinoide. Se observarmos a Figura 12, ou seja, os compostos Δ^9 -THC (Ac1) e 2-carboxi- Δ^8 -THC (Ic1), os mesmos não apresentam diferenças na posição do C4, mas sim na posição do C2. O volume calculado do substituinte nessa posição, correspondente ao composto 2-carboxi- Δ^8 -THC, foi de 180,16 Å³, enquanto que no Δ^9 -THC esse volume é de 71,70 Å³ (HONÓRIO; DA SILVA, 2002). Esse estudo deu suporte à ideia de que substituintes na posição do carbono 4 causam a perda da atividade psicotrópica, devido a impedimentos estéreos nessas regiões, onde as interações específicas são importantes para manter a ativação do receptor CB1.

Sendo a variável C4 muito importante na discriminação entre os compostos canabinoide psicoativos e psicoativos, resolveu-se, então, fazer um estudo de

docking, com relação à psicoatividade, entre o modelo do receptor canabinoide obtido e outros dois compostos canabinoides inativos que tivessem um substituinte volumoso na posição do carbono 4. Foram eles: o 4-carboxi- Δ^9 -THC, que chamamos de Ic2 (composto inativo 2), e o 4-carbometoxi- Δ^8 -THC (Ic3). Suas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 29.

Esse estudo visa confrontar os resultados de *docking* com aqueles obtidos por HONÓRIO, 2004, a fim de saber de que forma esses compostos se comportam no sítio ativo do receptor CB1.

Figura 29. Estrutura química dos compostos psicoativos 4-carboxi- Δ^9 -THC (Ic2) e 4-carbometoxi- Δ^8 -THC (Ic3).

IV. 3.1. Estudos com os compostos inativos 4-carboxi- Δ^9 -THC (Ic2) e 4-carbometoxi- Δ^8 -THC (Ic3)

Os resultados das análises de interações intermoleculares para esses compostos foram bastante interessantes. O oxigênio ligado ao carbono 1 no Ic2 (ver Fig. 29) faz uma interação forte de 2,27 Å com o enxofre da cisteína 30 (Cys30), em destaque na Figura 30. O oxigênio ligado ao hidrogênio no grupo COOH, na posição 4, tem distâncias de 4,25 Å e 5,96 Å, com os resíduos de serina 8 (Ser8) e serina 10 (Ser10), respectivamente. Nenhum desses resíduos pertence, segundo dados da literatura (SALO et al., 2004), ao sítio de ativação do receptor CB1.

Figura 30. Estrutura tridimensional do composto psicoativo 4-carboxi- Δ^9 -THC e sua forte interação com a cisteína 30 (Cys30).

O resíduo de lisina 115 (Lys115), considerado muito importante para manter a atividade, se mostra distante espacialmente de qualquer ligação com o composto 4-carboxi- Δ^9 -THC, como mostra a Figura 31.

Figura 31. Estrutura tridimensional da posição do composto psicoativo 4-carboxi- Δ^9 -THC com relação ao resíduo de lisina 115 (Lys115).

Com relação ao composto Ic3, cujo sítio de interação está representado na Figura 32, a única interação considerada interessante foi aquela de 3,73 Å, entre o hidrogênio da hidroxila do carbono 1 e o oxigênio do resíduo de lisina 299 (Lys299), em um tracejado verde mais escuro como ilustra a Figura 32. As outras interações que aparecem dizem respeito às intramoleculares dentro do próprio receptor.

Figura 32. Estrutura tridimensional da posição do composto psicoativo 4-carbometoxi- Δ^8 -THC em seu sítio de interação com o receptor CB1.

A Figura 33 ilustra um mecanismo proposto para a psicoatividade dos compostos canabinoides, levando em consideração o volume do substituinte na posição C4 bem como a presença de outro fator “externo”, considerado como um inibidor (uma molécula situada próxima ao receptor ou no próprio receptor, onde o valor da E_{LUMO} do composto canabinoide é quem rege a interação ligante-proteína). Neste mecanismo, um grupo volumoso na posição do carbono C4 impediria estericamente o composto canabinoide de atingir o sítio de reação do recetor.

De acordo com esse esquema, no caso (a): o composto canabinoide se aproxima do receptor e possui um alto valor para a energia do LUMO (orbital de mais baixa energia desocupado), E_{LUMO} , e não possui um substituinte na posição C4, ele não é barrado

pelo inibidor e alcança, portanto, o receptor. No caso (b): o composto canabinoide se aproxima do receptor, porém, apresenta um baixo valor da E_{LUMO} . Com um E_{LUMO} baixo, o composto canabinoide é atraído pelo inibidor e, portanto, não alcança o sítio ativo do receptor. Neste caso, o composto canabinoide pode ou não ter um substituinte na posição C4, que é o caso do composto 2-carboxi- Δ^8 -THC (Ic1), o qual se encaixaria em ambos os casos (a) e (b). Por último, no caso (c): o composto canabinoide se aproxima do receptor, mas tem um substituinte volumoso na posição C4, portanto, não penetra no sítio ativo do mesmo. Esse composto pode ter um valor baixo ou alto para a E_{LUMO} .

Figura 33. Mecanismo proposto para presença ou ausência de atividade psicotrópica para compostos canabinoides.

A propriedade hidrofóbica LogP, também considerada importante para definir a psicoatividade de compostos canabinoides, seria responsável pelo transporte da droga através da membrana, e contribui para interações hidrofóbicas na formação do complexo droga-receptor (HONÓRIO; DA SILVA, 2005). Segundo os estudos de quimiometria já realizados no grupo de química quântica, o LogP precisaria apresentar valores baixos, mas os compostos canabinoides são, por natureza, altamente hidrofóbicos. Esses valores calculados teoricamente para os compostos Ac1, Ic1, Ic2 e Ic3 correspondem, respectivamente a 5,346, 5,045, 6,210 e 5,091. Os valores são altos, confirmando o caráter hidrofóbico desses compostos, e uma baixa capacidade de atravessar a membrana biológica, que é constituída principalmente por células lipídicas, como já foi discutido inicialmente.

O estudo feito neste trabalho sobre as principais interações receptor-ligante mostrou que um ligante na posição C4 pode, de fato, ser um dos fatores que contribuem para a psicoatividade, uma vez que as interações consideradas importantes para ativação do receptor não foram observadas nos compostos Ic2 e Ic3. A indicação de atividade (psicoativa ou psicoinativa), os valores da E_{LUMO} e os volumes calculados dos substituintes na posição C4 estão destacados na Tabela 5 (HONÓRIO; DA SILVA, 2005).

Tabela 5. Indicação de psicoatividade, valores das E_{LUMO} e volumes calculados dos substituintes na posição C4 para os compostos em estudo

Composto Canabinoide	Atividade	E_{LUMO} (eV)	V_{C4} ($\text{\AA}^3$)
Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Ac1)	Ativo	0,412	71,70
2-carboxi- Δ^8 -THC (Ic1)	Inativo	-0,328	71,70
4-carboxi- Δ^9 -THC (Ic2)	Inativo	0,008	180,35
4-carbometoxi- Δ^8 -THC (Ic3)	Inativo	0,044	240,07

As energias dos orbitais de fronteira E_{HOMO} e E_{LUMO} são propriedades importantes nos processos químicos e farmacológicos. Estas propriedades descrevem, respectivamente, o caráter elétron-doador e elétron-aceitador de um composto, conseqüentemente, a formação do complexo de transferência de carga, receptor-ligante. Pode-se dizer que E_{LUMO} é responsável pelas interações eletrostáticas, estabelecidas entre o composto e o receptor biológico. Os baixos valores da E_{LUMO} , para os compostos psicoativos estudados, mostraram que esses compostos devem ter um pronunciado caráter elétron-aceitador, e, portanto, uma reação de transferência de carga teria possibilidade de ocorrer entre os compostos psicoativos e alguns resíduos do receptor. Quanto mais baixo o valor da E_{LUMO} , mais alta a capacidade elétron-aceitadora do composto.

O que provavelmente acontece é que, aproximando-se do sítio ativo do receptor, um composto com um baixo valor da E_{LUMO} pode ficar preso a algum inibidor (um composto com tendência a doar elétrons), não chegando assim, ao sítio de interesse do receptor. Este composto pode ou não, ter um substituinte na posição do carbono 4.

E mais, sendo os receptores canabinoides do tipo acoplados à proteína-G (GPCRs), ou seja, um receptor de membrana, as reações e interações que ocorrem durante a ativação do receptor são muito complexas, não podendo a atividade biológica ser atribuída exclusivamente a algumas variáveis. No entanto, nossos estudos são muito importantes para o entendimento do mecanismo de ação dos receptores canabinoides e para o planejamento de novos fármacos à base de canabinoides, uma vez que os mesmos possuem um grande potencial terapêutico, mas seus efeitos colaterais são muito prejudiciais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados, neste trabalho, de modelagem molecular do receptor CB1 e de *docking* (entre o modelo construído do receptor CB1 e o Δ^9 -THC), e posteriormente o estudo das interações entre o receptor e compostos análogos ao THC, mas que não apresentam atividade psicotrópica (Ic1, Ic2 e Ic3), fecha um ciclo de investigações realizados no grupo de Química Quântica/IQSC sobre a ação farmacológica de compostos canabinoides, mais precisamente aqueles que apresentam atividade psicotrópica.

Nossos dados de *docking* foram cruzados com aqueles já obtidos a partir de quimiometria e buscou-se, através do estudo do sítio ativo do receptor canabinoide CB1, explicar a importância das variáveis calculadas que classificaram os compostos canabinoides em psicoativos e psicoinativos (HONÓRIO, 2004).

As variáveis que foram consideradas importantes, em trabalhos anteriores (HONÓRIO; DA SILVA, 2002; 2004), para classificar os compostos canabinoides em dois grupos (psicoativos e psicoinativos), foram: LP1 (índice de Lovasz e Pelikan), que é um índice relativo à ramificação molecular, VC4 (volume do substituinte na posição do carbono 4), E_{LUMO} (energia do orbital molecular de mais baixa energia desocupado) e o LogP (coeficiente de partição água/solvente orgânico). Estas variáveis são os pontos-chave de comparação com os resultados de *docking* obtidos nesta Tese, especialmente as três últimas, por apresentarem um significado físico importante para o entendimento do mecanismo de interação dos compostos canabinoides com o receptor biológico CB1 e, portanto, determinarem os fatores, em nível molecular, de um composto canabinoide ser psicoativo ou psicoinativo.

As conclusões tiradas deste trabalho e de estudos anteriores, realizados no grupo de Química Quântica/IQSC, condizem com o esperado, ou seja, um composto com baixo valor da E_{LUMO} , como é o caso dos compostos Ic1 e Ic3, são atraídos por um enxofre do resíduo de metionina 286 (Met286) e pelo nitrogênio do resíduo de asparagina 289 (Asp289) [ver anexo I]. Esses resíduos apresentam uma alta densidade de carga devido a presença dos átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Esse seria um fator proposto para explicar a inatividade desses compostos, cujos valores da E_{LUMO} são: negativa para o Ic1, -0,328eV e 0,044 eV (um valor baixo) para o Ic3.

O volume do substituinte na posição do carbono 4 também comprovou a inatividade dos compostos estudados, uma vez que os compostos Ic2 e Ic3 não conseguiram atingir o sítio de interação do receptor, onde estão envolvidos os aminoácidos importantes na ativação da proteína, como por exemplo a lisina 115 (Lys115), esses compostos se posicionaram em uma região completamente desfavorável à ativação.

Com base nessas conclusões, este trabalho se torna uma boa ferramenta na hora de planejar um fármaco potente, como por exemplo, um analgésico sintético que mostre um grande potencial terapêutico, mas livre dos efeitos psicotrópicos indesejáveis que causam aos pacientes. A busca pelo planejamento e síntese de compostos canabinoides com valores mais baixos do LogP, valores mais altos na E_{LUMO} e presença de substituintes volumosos na posição do carbono 4 seria uma combinação ótima para uma tentativa de se encontrar um composto canabinoide com grande potencial terapêutico, porém, livre de efeitos colaterais indesejáveis.

Como proposta para estudos futuros seria interessante concluir a modelagem do receptor CB2, que está associado ao sistema imunológico. O conhecimento da sua estrutura 3D pode ser de grande ajuda no entendimento de suas funções e na construção de ligantes específicos, uma vez que esse receptor desempenha um papel importante em doenças como a depressão e o mal de Alzheimer. A busca por compostos que se ligam ao receptor CB2 pode ser útil no tratamento dessas doenças, e outras tais como inflamações e alguns tipos de dores crônicas que não respondem aos tratamentos convencionais.

Uma outra proposta para o futuro seria buscar colaborações com grupos experimentais a fim de sintetizar os compostos planejados teoricamente, pois isto ampliaria os estudos com os compostos canabinoides que se ligam ao receptor CB1 e daria um grande avanço à ciência no campo medicinal e bioquímico.

Os estudos teóricos e experimentais dos receptores canabinoides têm ganhado grande avanço na medicina, não só por possuírem uma função biológica importante, mas também por pertencerem à família dos GPCRs (receptores acoplados à proteína-G), envolvidos em muitas doenças e hoje alvos de quase metade das drogas que circulam no mercado. A elucidação da sua estrutura 3D, e estudo das reações e transformações que ocorrem no organismo quando esses receptores são ativados, produziria a elucidação e resolução de grandes problemas causados por doenças que vêm predominando no século XXI, como a depressão, variações da pressão arterial e dependência química.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, D.J. *Burger's: medicinal chemistry and drug discovery*. Virgínia: Wiley Interscience, 2003. 1125p.

ADAMS, R.; BAKER, B.; WEARN, R. Structure of cannabinol III: synthesis of cannaciona, 1-hydroxy-3-n-amy-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, p. 2204-2207, 1940a.

ADAMS, R.; HUNT, M.; CLARK, J. Structure of cannabidiol, a product isolated for the marihuana extract of Minnesota wild hemp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, p. 196-200, 1940b.

ASSOCIAZIONE CANNABIS TERAPEUTICA. **Erba medica**: usi terapeutici della *cannabis*. Roma: Stampa Alternativa, 2002. 208p.

ARROIO, A. **Estudo teórico da relação estrutura-atividade (SAR) de compostos da planta Cannabis sativa (Canabinoides) com potencial analgésico**. 1999. 98 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. A theoretical study on the analgesic activity of cannabinoid compounds. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 709, p. 223–229, 2004.

ARROIO, A. **Um estudo teórico da atividade analgésica de compostos da planta cannabis sativa**. 2004. 98 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

BAKER, D.; PRYCE, G.; CROXFORD, J.; BROWN, P.; PERTWEE, R.; HOFFMAN, J.; LAYNARD, L. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. **Nature**, v. 2, p. 84-87, 2000.

BAKER, D.; PRYCE, G.; GIOVANNONI, G.; THOMPSON, A. J. The therapeutic potential of cannabis. **Lancet Neurology**, v. 2, p. 291–98, 2003.

BATTISTA, N.; FEZZA, F.; FINAZZI-AGRO, A.; MACCARRONE, M. The endocannabinoid system in neurodegeneration. **Italian Journal of Biochemistry**, v. 55, p. 283–289, 2006.

BAYEWITCH, M.; RHEE, M.H.; REISS, T. A.; BREUER, A.; MECHOULAM, R.; VOGEL, Z. (–)-9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 9902–9905, 1996.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, p. 3684-3690, 1984.

BOYD, S. T. The Endocannabinoid System. **Pharmacotherapy**, v. 26, p. 218S–221S, 2006.

BRIZZI, A.; BRIZZI, V.; CASCIO, M. G.; BISOGNO, T.; SIRIANNI, R.; DI MARZO, V. Design, Synthesis, and Binding Studies of New Potent Ligands of Cannabinoid Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 7343-7350, 2005.

BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R. E.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4, p. 187-217, 1983.

BROOKS, J. W. Cannabinoids and analgesia. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 13, p. 215-220, 2002.

BURNS, T. L.; INECK, J. R. Cannabinoid Analgesia as a Potential New Therapeutic Option in the Treatment of Chronic Pain. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 40, p. 251-259, 2006.

BURSTEIN, S. H. The Cannabonid Acids: Nonpsychoactive Derivatives with Therapeutic Potencial. **Pharmacology Therapy**, v. 82, p. 87-96, 1999.

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; PIOMELLI, D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. **European Journal of Pharmacology**, v. 419, p. 191–198, 2001.

CAMPBELL, J. A.; TRAMER, M. R.; CARROLL, D.; REYNOLDS, D. J. M.; MOORE, R. A.; MC-QUAY, H. J. Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. **British Medical Journal**, v. 323, p. 1-6, 2001.

CARLINI, E. A.; CUNHA, J. M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 417S-427S, 1981.

CHAKRABARTI, A.; ONAIVI, E. S.; CHAUDHURI, G. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. **DNA Sequencing**, v. 5, n. 6, p. 385–388, 1995.

CLARK, W. C.; JANAL, M. N.; ZEINDENBERG, P.; NAHAS, G. G. Effects of moderate and high doses of marijuana on thermal pain: a sensory decision theory analysis. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 299S-310S, 1981.

CONTRERAS, C. M.; GARCIA, A. G. G.; SAAVEDRA, M.; MORALES, B. B.; LANDA, J. F. R.; LOZANO, M. H. Efectos adversos y paliativos de los cannabinoides. **Salud Mental**, v. 26, n. 6, p. 62-65, 2003.

CORBETT, A. D.; HENDERSON, G.; MCKNIGHT, A. T.; PATERSON, S. J. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 1, p. S153–62, 2006.

CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ, K. M.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 5179-5197, 1995.

CUNHA, J. M.; CARLINI, E. A.; PEREIRA, A. E.; RAMOS, O. L.; PIMENTEL, C.; GAGLIARDI, R.; SANVITO, W. L.; LANDER, N.; MECHOULAM, R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. **Pharmacology**, v. 21, p. 175-185, 1980.

DA SILVA, A. B. F.; TRSIC, M. Theoretical and conformational studies of a series of cannabinoids. **Journal of Molecular Structure**, v. 356, p. 247-256, 1995.

DASTMALCHI, S.; CHURCH, W. B.; MORRIS, M. B. Modeling the structures of G protein-coupled receptors aided by three-dimensional validation. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 1-13, 2008.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, p. 605-13, 1988.

DI MARZO, V.; BREIVOGEL, C. S.; TAO, Q.; BRIDGEN, D.T.; RAZDAN, R. K.; ZIMMER, A. M. ET AL. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB₁ cannabinoid receptor knockout mice. Evidence for non-CB₁, non-CB₂ receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. **Neurochemistry**, v. 75, p. 2434–2444, 2000.

DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. **Current Opinion in Lipidology**, v. 18, p. 129–140, 2007.

FELDER, C. C.; JOYCE, K. E.; BRILEY, E. M.; MANSOURI, J.; MACKIE, K.; BLOND, O.; LAI, Y.; MA, A. L.; MITCHELL R. L. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 48, p. 443-450, 1995.

FICHERA, M.; CRUCIANI, G.; BIANCHI, A.; MUSUMARRA, G. A 3D-QSAR Study on the Structural Requirements for Binding to CB₁ and CB₂ Cannabinoid Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2300-2309, 2000.

FINE, P. G.; PORTENOY, R. K. **Clinical guide to opioid analgesia**. New York: McGraw Hill, 2004. cap. 2, p. 9.

FLOWER, D. R. Modeling G-protein-coupled receptors for drug design. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1422, p. 207-234, 1999.

GERARD, C. M.; MOLLEREAU, C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7142, 1990.

GERARD, C. M.; MOLLEREAU, C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. **Biochemical Journal**, v. 279, p. 129–134, 1991.

GOUTOPOULOS, A.; MAKRIYANNIS, A. From cannabis to cannabinergics: new therapeutic opportunities. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 95, p. 103-17, 2002.

GRINSPOON, L.; BAKALAR, J. B. *Marihuana: the forbidden medicine*. New Haven: Yale University Press, 1993. 184p.

HAGLER, A. T.; HULER, E.; LIFSON, S. Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals. **Journal of the Americal Chemical Society**, v. 96, p. 5319-5327, 1977.

HÁJOS, N.; LEDENT, C.; FREUND, T. F. Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 106, n. 1, p. 1-4, 2001.

HALPERIN, I.; MA, B.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. **PROTEINS: Structure, Function and Genetics**, v. 47, p. 409–443, 2002.

HANUS, L.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MECHOULAM, R. Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 3032-3034, 1993.

HENDERSON, R.; BALDWIN, J. M.; CESKA, T. A.; ZEMLIN, F.; BECKMANN, E.; DOWNING, K. H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryomicroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 213, p. 899-929, 1990.

HEPLER, R.S.; PETRUS, R.J. Marijuana smoking and intraocular pressure. **Journal of the American Medical Association**, v. 217, p. 1392, 1971.

HILL, S.Y.; GOODWIN, D. W.; SCHWIN, R.; POWELL, B. Marijuana: CNS depressant or excitant. **The American Journal of Psychiatry**, v. 121, p. 313-315, 1974.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; DA SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis Sativa*, **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 318-325, 2006.

HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. A study on the influence of molecular properties in the psychoactivity of cannabinoid compounds. **Journal of Molecular Modeling**, v. 11, p. 200-209, 2005.

HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. A theoretical study on the influence of the frontier orbitals HOMO and LUMO and the size of C4 and C2 substituents in the psychoactivity of cannabinoid compounds. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 578, p. 111-117, 2002.

HONÓRIO, K. M. **Estudo teórico da relação estrutura-atividade (SAR) em compostos canabinoides psicoativos**. 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

HONÓRIO, K. M. **Um estudo sobre o planejamento racional de compostos canabinoides psicoativos**. 2004. 135 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

HOWLETT, A. C. Cannabinoid receptor signaling. In: **HANDBOOK of experimental pharmacology**. Heidelberg: Springer, 2005. p. 53–79. (Cannabinoid receptor signaling, v. 168).

HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE, W. A.; FELDER, C. C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MARTIN,

B. R.; MECHOULAM, R.; PERTWEE, R. G. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacology Review**, v. 54, p. 161–202, 2002.

HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; PETTERSEN, E. F.; FERRIN, T. E. Pacific symposium on biocomputing, v. 1, p. 724, 1996. (Programa de computador). Disponível em: <<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>>. Acesso em: 01 mar. 2007.

IRMA, B. A.; MARTIN, B. R. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. **Addiction**, v. 91, n. 11, p. 1585-1614, 1996.

IVERSEN, L.; CHAPMAN, V. Cannabinoids: a real prospect for pain relief. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 50–55, 2002.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, p. 195-202, 1999.

JOY, J. E.; WATSON, S. J.; BENSON JUNIOR, J. A. **Marijuana and medicine: assessing the science base**. Washington: National Academy Press, 1999. 312p.

KHANOLKAR, A. D.; PALMER, S. L.; ALEXANDROS, M. Review Molecular probes for the cannabinoid receptors. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 108, p. 37–52, 2000.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking And Scoring In Virtual Screening For Drug Discovery: Methods And Applications. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v. 3, p. 935-948, 2004.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; CGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics Applications Note**, v. 23, p. 2947–2948, 2007.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORTON, J. M. J. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283–291, 1993.

LITTLE, P. J.; COMPTON, D. R.; MECOULAM, R.; MARTIN, B. R. Stereochemical effects of 11-OH- δ 8-THC-dimethylheptyl in mice and dogs. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 32, p. 661-666, 1989.

LU, Z-L.; SALDANHA, J. W.; HULME, E. C. Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 140-146, 2002.

SCHRODINGER. Macromodel versão 8.5. (Programa de computador). Disponível em <<http://www.schrodinger.com>>. Acesso em 01 mar. 2007.

MARTIN, B. R.; MECOULAM, R.; RAZDAN, R. K. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. **Life Science**, v. 65, p. 573-595, 1999.

MARTINELLI, A.; TUCCINARDI, T. An overview of recent developments in GPCR modeling methods and validation. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 1, p. 459-476, 2006.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, p. 561-564, 1990.

MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, p. 404-405, 2000.

MECOULAM, R. Cannabinoid chemistry. In: MECOULAM, R. **Marijuana**. New York: Academic Press, 1973. p. 1-99.

MECOULAM, R. **Marijuana**: chemistry, pharmacology, metabolism and clinical effects. New York: Academic Press, 1973. 409p.

MECOULAM, R. The pharmacohistory of Cannabis sativa. In: MECOULAM, R. **Cannabinoids as therapeutic agents**. Boca Raton: CRC, 1986. p. 1-19.

MECOULAM, R.; DEVANE, W. A.; GLASER, R. Cannabinoid geometry and biological activity. In: MURPHY, L.; BARTKE, A. (Eds.). **Marijuana: cannabinoids neurobiology and neurophysiology**. Boca Raton: CRC, 1992. p. 1-33.

MECHOULAM, R.; GAONI, Y. Recent advances in the chemistry of hashish. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 25, p. 175-213, 1967.

MECHOULAM, R.; GAONI, Y. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of American Chemical Society**, v. 86, p. 1646-7, 1967.

MECHOULAM, R.; HANUS, L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. **Chemistry And Physics Of Lipids**, v. 108, p. 1-13, 2000.

MONTERO, C.; CAMPILLO, N. E.; GOYA, P.; PÁEZ, J. A. Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 75-83, 2005.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MOSCA, R.; BRANNETTI, B.; SCHNEIDER, T. R. Alignment of protein structures in the presence of domain motions. **BMC Bioinformatics**, v. 352, p. 1-17, 2008.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; SHAAR, M. A. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, p. 61-65, 1993.

NEMETHY, G.; POTTLE, M. S.; SCHERAGA, H. A. Energy parameters in polypeptides. 9. Updating of geometrical parameters, nonbonded interactions, and hydrogen bond interactions for the naturally occurring amino acids. **Journal of Physical Chemistry**, v. 87, p. 1883-1887, 1983.

NOGRADY, T.; DONALD, F. W. **Medicinal chemistry: a molecular and biochemical approach**. 3. ed. Oxford: University Press, 1985. p. 5.

OMAR, M. H. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 228-239, 2001.

PALCZEWSKI, K.; KUMASAKA, T.; HORI, T.; BEHNKE, C. A.; MOTOSHIMA, H.; FOX, B. A.; LE TRONG, I.; TELLER, D. C.; OKADA, T.; STENKAMP, R. E.; YAMAMOTO, M.; MIYANO, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. **Science**, v. 289, p. 739-745, 2000.

PATON, W. D. M. Pharmacology of marijuana. **Annual Review Pharmacology**, v. 15, p. 191-220, 1975.

PERTESEN, R. C. **Marijuana research findings**. Maryland: Department of Health and Human Services, 1980. p. 225.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S163–S171, 2006.

PERTWEE, R. G. Pharmacological and therapeutic targets for Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. **Euphytica**, v. 140, p. 73–82, 2004.

PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 74, p. 129–180, 1997.

PERTWEE, R. G. The central neuropharmacology of sychotropic cannabinoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, p. 189-261, 1988.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 283-438, 1968.

RAZDAN, R. K. Structure-activity relationship in cannabinoids. **Pharmacology Review**, v. 38, p. 75-149, 1986.

REGGIO, P. H.; GREER, K. V.; COX, S. M. The importance of the orientation of the C9 substituent to cannabinoid activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 1630-1635, 1989.

REGGIO, P. H.; PANU, A. M.; MILES, S. Characterization of a region of steric interference at the cannabinoid receptor using the active analogue approach. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 1761-1771, 1993.

REGGIO, P. H.; SELTZMAN, H. H.; COMPTON, D. R.; PRESCOTT, W. R.; MARTIN, B. R. Investigation of the role of the phenolic hydroxyl in cannabinoid activity. **Molecular Pharmacology**, v. 38, p. 854-862, 1990.

ROMERO, J.; LASTRES, B. I.; MIGUEL, R.; BERRENDERO, F.; RAMOS, J. A.; FERNANDEZ, R. J. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia: biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 95, p. 137-52, 2002.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Definition of general topological equivalence in protein structures : a procedure involving comparison of properties and relationships through simulated annealing and dynamic programming, **Journal of Molecular Biology**, v. 212, p. 403-428, 1990.

SALO, O. M. H.; KAKKONEN, M. L.; GYNTER, J.; JRVINEN, T.; POSO, A. Development of a 3D model for the human cannabinoid CB1 receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 3048-3057, 2004.

SANTOS, O. A. F.; ALENCASTRO R. B. Modelagem de proteínas por homologia, **Quimica Nova**, v. 26, p. 253-259, 2003.

SMALL, E.; CRONQUIST, A. A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. **Taxonomy**, v. 25, n. 4, p. 405-435, 1976.

SPIEGEL, A. M. Mutations in G proteins and G protein coupled receptors in endocrine disease. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 81, p. 2434-2442, 1996.

STERN, E.; MUCCIOLI, G. G.; MILLET, R.; GOOSSENS J. F.; FARCE, A.; CHAVATTE, P.; POUPAERT, J. H.; LAMBERT, D. M.; DEPREUX, P.; HENICHART, J. P. Novel 4-Oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide derivatives as new CB2 cannabinoid receptors agonists: synthesis, pharmacological properties and molecular modeling. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 70-79, 2006.

TASHKIN, D. P.; SHAPIRO, B. J.; LEE, E. Y.; HARPER, C. E. Subacute effects of heavy marijuana smoking pulmonary function in healthy young males. **The New England Journal of Medicine**, v. 294, p. 125-129, 1976.

THOMPSON, G. R.; ROSENKRANTZ, H.; SCHAEPP, U. H.; BRAUDE, M. C. Comparison of acute oral toxicity of cannabinoids in rats, dogs and monkeys. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 63-72, 1973.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TUCCINARDI, T.; FERRARINI, P. L.; MANERA, C.; ORTORE, G.; SACCOMANNI, G.; MARTINELLI, A. Cannabinoid CB2/CB1 selectivity. Receptor modeling and automated docking analysis, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 984-994, 2006.

WALKER, J. M.; HUANG, S. M. Cannabinoid analgesia. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 95, p. 127-35, 2002.

WEINE, R. S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE D. A.; SINGH U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S. J.; WEINER, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, p. 765-784, 1984.

ANEXO I

Estruturas químicas e símbolos padrão dos aminoácidos

Alanina
(Ala / A)

Arginina
(Arg / R)

Asparagina
(Asn / N)

Ácido aspártico
(Asp / D)

Cisteína
(Cys / C)

Ácido glutâmico
(Glu / E)

Glutamina
(Gln / Q)

Glicina
(Gly / G)

Histidina
(His / H)

Isoleucina
(Ile / I)

Leucina
(Leu / L)

Lisina
(Lys / K)

Metionina
(Met / M)

Fenilalanina
(Phe / F)

Prolina
(Pro / P)

Serina
(Ser / S)

Treonina
(Thr / T)

Triptofano
(Trp / W)

Tirosina
(Tyr / Y)

Valina
(Val / V)

ANEXO II

Figura 14. Alinhamento dos receptores canabinoides CB1 e CB2 com a rodopsina bovina, com as indicações dos domínios TMs.