

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LEVY BUENO ALVES

**Busca de pequenas moléculas naturais inibidoras da Rab10 para o tratamento
da doença de Alzheimer**

Ribeirão Preto

2022

LEVY BUENO ALVES

Busca de pequenas moléculas naturais inibidoras da Rab10 para o tratamento da doença de Alzheimer

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Giuliatti
Co-orientador: Prof. Dr. Willian O. C. Ordoñez

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo de publicação preparada pela biblioteca do serviço de documentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Alves, Levy Bueno

Busca de pequenas moléculas naturais inibidoras da Rab10 para o tratamento da doença de Alzheimer. Ribeirão Preto, 2022.

121f. il.; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientadora: Giuliatti, Silvana.

Co-orientador: Ordóñez, Willian

Palavras-chave: Pequenas GTPases, *in silico*, demência, descoberta de medicamentos, bioinformática.

Nome: Levy Bueno Alves

Título: Busca de pequenas moléculas naturais inibidoras da Rab10 para o tratamento da doença de Alzheimer.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silvana Giuliatti.

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr.

Instituição:

Prof. Dr.

Instituição:

Prof. Dr.

Instituição:

Dedico

Aos meus pais, Jairo L. Alves e Iris B. M. Alves

Sem eles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me resguardar e me conduzir pelos melhores caminhos; que na Sua bondade eterna, escutou as minhas palavras, dando-me amparo nos momentos mais difíceis.

À Profa. Dra. Silvana Giuliatti pela orientação, apoio, confiança e dedicação. Agradeço por compartilhar os seus conhecimentos e me dar oportunidades, as quais contribuíram para a minha formação como docente e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Willian O. C. Ordóñez pela co-orientação, apoio e ensinamentos;

Ao prof. Dr. Nelson J. F. da Silveira e ao Dr. Thiago C. Elias, por me incentivar a adentrar na área da Bioinformática e compartilhar os seus conhecimentos.

A todos os meus familiares, pela paciência, apoio e incentivo para que essa jornada fosse concluída. Em especial, meus pais, Jairo L. Alves e Iris B. M. Alves, a minha irmã, Livia B. Alves, e meus avós, José B. Marques e Maria H. Marques. O amparo e amor de vocês nos momentos mais difíceis foram, e são, essenciais em minha vida.

Aos meus colegas do Grupo de Bioinformática (GBi) do Departamento de Genética da FMRP – USP, pelo companheirismo, pela troca de experiências e momentos compartilhados. Em especial agradeço aos colegas Cinthia C. Alves, Elvira R. Tamarozzi, Rauni M. Borges e Wasim Syed, os quais me deram apoio e proporcionaram um ambiente agradável e estimulante no laboratório.

À Banca Examinadora por terem atendido ao convite para avaliar este trabalho, contribuindo com os seus conhecimentos e para a melhoria do mesmo.

À minha companheira Raísa A. Penna, pelo apoio, carinho e por sempre me incentivar na minha dedicação à pesquisa.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração e companheirismo. Em especial agradeço aos amigos Marcus V. M. Amaral e Pedro C. L. de Almeida, minha segunda família.

Aos Professores e Funcionários do programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP – USP, pelos ensinamentos e assistência.

À Superintendência da Tecnologia e Informação da USP pelos Recursos Computacionais de *High Performance Computing* (HPC) usados para o desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), processo #141224/2017-7, pelo auxílio financeiro na realização do presente trabalho.

À USP e FMRP pela oportunidade de realização dessa pós-graduação.

“A mente é um mundo ambulante que
caminha por universos distantes”.

-ALVES, LEVY B. (2022)

RESUMO

ALVES, Levy Bueno. Busca de pequenas moléculas naturais inibidoras da Rab10 para o tratamento da doença de Alzheimer. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurodegenerativa, poligênica e multifatorial associada ao envelhecimento. Apesar dos avanços nos investimentos, até o momento não existe tratamento eficaz para essa demência. Diversos alvos enzimáticos foram e ainda são estudados na tentativa de descobrir novos medicamentos para o tratamento da DA; no entanto, as Rab GTPases ainda são relativamente inexploradas. Essas enzimas regulam os processos celulares por meio da alternância dos nucleotídeos GDP e GTP. Estudos indicam que o *knockdown* da Rab10 reduz a produção de peptídeos A β 42 no parênquima cerebral, tornando-a um alvo promissor para o tratamento da DA. A fim de identificar potenciais inibidores da Rab10, utilizou-se a técnica de SBVS (do inglês, *Structure-Based virtual screening*) considerando um conjunto de 80763 produtos naturais da base de dados ZINC 15. A estrutura da Rab10 foi obtida da base de dados *Protein Data Bank* (PDB) e o programa Autodock Vina foi usado no SBVS, realizado em três etapas sequenciais com o objetivo de filtrar potenciais substâncias bioativas contra essa enzima. O protocolo de SBVS foi validado pelo *redocking* do nucleotídeo GNP co-cristalizado e as energias de ligação dos nucleotídeos GDP e de GTP foram usadas como controle na análise farmacodinâmica. Desse modo, foi possível selecionar 45 compostos com energia de ligação menor ou igual a $-11 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. As propriedades de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADME/T) destes compostos foram avaliadas por meio do uso do programa SwissADME, onde foi possível identificar 6 moléculas promissoras. Os complexos resultantes foram submetidos a simulações de dinâmica molecular para a análise da farmacodinâmica ao longo do tempo. Os resultados sugerem que o composto ZINC4090657 (derivado de quinolizidina) e os compostos ZINC4000106 e ZINC0630250 (derivados de cumarina) possuem características farmacológicas favoráveis para a inibição da Rab10, sendo ZINC4090657 o mais promissor.

Palavras-chave: Pequenas GTPases, *in silico*, demência, descoberta de medicamentos, bioinformática.

ABSTRACT

ALVES, Levy Bueno. Search for natural small molecules that inhibit Rab10 for the treatment of Alzheimer's disease. Dissertation (Master's degree) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2022.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative, polygenic and multifactorial disorder associated with aging. Despite advances in investments, so far there is no effective treatment for this dementia. Various enzymatic targets have been and are still being studied in an attempt to discover new drugs for the treatment of AD; however, Rab GTPases are still relatively unexplored. These enzymes regulate cellular processes by alternating of GDP and GTP nucleotides. Studies have shown that the knockdown of Rab10 reduces the production of A β 42 peptides in the brain parenchyma, making it a promising target for the treatment of AD. In order to identify potential Rab10 inhibitors, the structure-based virtual screening (SBVS) technique was used considering a subset of 80763 natural compounds of ZINC15 database. Tertiary structure of Rab10 was obtained from the Protein Data Bank (PDB) and the Autodock Vina program was used in the SBVS, carried out in three sequential steps to filter potential bioactive substances against this enzyme. The SBVS protocol was validated by redocking the co-crystallized GNP nucleotide and the binding energies of the GDP and GTP nucleotides were used as controls in the pharmacodynamic analysis. Thus, it was possible to select 45 compounds with binding energy less or equal $-11 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME/T) properties of these compounds were evaluated by the SwissADME program, where it was possible to identify 6 promising molecules. The resulting complexes were subjected to molecular dynamics simulations to analyze the pharmacodynamics over time. The results suggest that the compound ZINC4090657 (derived from quinolizidine) and the compounds ZINC4000106 and ZINC0630250 (derived from coumarin) have favorable pharmacological characteristics for the inhibition of Rab10, with ZINC4090657 being the most promising one.

Keywords: small GTPases, in silico, dementia, drug discovery, bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração simplificada da pipeline de SBVS aplicada no processo de descobrimento de novos medicamentos.	22
Figura 2. Estrutura química dos principais medicamentos usados para o tratamento da DA.	25
Figura 3. Ilustração das vias de processamento proteolítico da APP.	28
Figura 4. Ciclo de alternância GDP/GTP nas Rab GTPases.	31
Figura 5. Papéis da Rab10 nas vias de transporte celular em relação ao tráfego de proteínas associadas à DA.	34
Figura 6. Estrutura da Rab10 associada ao GNP.	35
Figura 7. Esquematização do fluxo geral de trabalho.	41
Figura 8. Critérios geométrico do módulo gmx hbond do programa GROMACS.	50
Figura 9. <i>Redocking</i> do nucleotídeo GNP na Rab10 pelo programa Autodock Vina.	54
Figura 10. Comparação do modo de ligação da pose experimental e da pose predita de GNP.	55
Figura 11. Modos de ligação dos nucleotídeos GDP e GTP na Rab10.	56
Figura 12. Sobreposição das poses preditas de GDP/GTP em relação à pose experimental GNP.	57
Figura 13. Resultados obtidos no <i>BOILED-EGG</i>	58
Figura 14. Composição química dos compostos mais bem classificados no SBVS. ..	62
Figura 15. Complexo da Rab10 com ZINC0138791.	64
Figura 16. Complexo da Rab10 com ZINC0519122.	65
Figura 17. Complexo da Rab10 com ZINC0630250.	66
Figura 18. Complexo da Rab10 com ZINC4000106.	67
Figura 19. Complexo da Rab10 com ZINC4090657.	68

Figura 20. Complexo da Rab10 com ZINC2101104.	69
Figura 21. RMSD dos ligantes.	71
Figura 22. Pose inicial e final dos nucleotídeos acoplados na Rab10.	72
Figura 23. Processo de dissociação dos compostos ZINC0138791, ZINC0519122 e ZINC2101104 do sítio-ativo da Rab10.	73
Figura 24. <i>Frames</i> do sistema Rab10_ZINC0630250.	74
Figura 25. <i>Frames</i> do sistema Rab10_ZINC4000106.	75
Figura 26. <i>Frames</i> do sistema Rab10_ZINC4090657.	76
Figura 27. Representação das ligações de hidrogênio existentes no complexos resultantes.	77
Figura 28. Porcentagem de ocorrência de ligações de hidrogênio pelos pares correspondentes durante o tempo total de simulação (200 ns).	79
Figura 29. Porcentagem de ocorrência de ligações de hidrogênio pelos pares correspondentes durante o tempo total de simulação (200 ns).	81
Figura 30. RMSD do <i>backbone</i> do domínio G da Rab10.	82
Figura 31. RMSD do <i>backbone</i> das regiões <i>switchs</i> .da Rab10.	84
Figura 32. RMSF dos resíduos de aminoácidos da Rab10.	86
Figura 33. Representação colorida dos valores do <i>B-factor</i> do domínio G da Rab10.	87
Figura 34. Ilustração gráfica do DSSP da Rab10 complexada aos controles e produtos naturais.	89
Figura 35. R_g do domínio G da Rab10 associada aos controles e produtos naturais.	90
Figura 36. R_g do <i>backbone</i> das regiões <i>switchs</i> .da Rab10.	91
Figura 37. SASA do domínio G da Rab10 em interação.	92
Figura 38. Poses finais da simulação com a superfície da Rab10.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades farmacocinéticas dos 6 compostos testados pelo servidor SwissADME.	59
Tabela 2. Previsões das propriedades toxicológicas para os 6 compostos investigados por ProTox-II.	61
Tabela 3. Análise das poses provenientes de diferentes sementes de randomização do Autodock Vina.	63
Tabela 4. Decomposição residual e energia de ligação (dada em Kj.mol^{-1}) na interação proteína-ligante.	93

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Sigla	Nome
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ADME/T	Absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
ANVS	Agências Nacionais de Vigilância Sanitária
<i>ApoE</i>	<i>Apolipoprotein E</i>
<i>APP</i>	<i>Amyloid precursor protein</i>
A β 40	Peptídeo A β de 40 resíduos de aminoácidos
A β 42	Peptídeo A β 40 de 42 resíduos de aminoácidos
<i>B-factor</i>	Fator de temperatura
BFGS	<i>Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno</i>
C83	C-terminal de 83 resíduos de aminoácidos
C99	C-terminal de 99 resíduos de aminoácidos
CADD	<i>Computer-Aided Drug Discovery</i>
CYP	<i>Cytochromes</i>
DA	Doença de Alzheimer
DL ₅₀	Dose letal oral mediana
DM	Dinâmica molecular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAPs	<i>GTPase-activating proteins</i>
GDIs	<i>Dissociation inhibitor</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GEFs	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GI	<i>Gastrointestinal</i>
GNP	<i>Phosphoaminophosphonic acid guanylate ester</i>
Gs	<i>Guanine-binding motifs</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
ILS	<i>Iterated Local Algorithm</i>
MM/PBSA	<i>Molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area</i>

mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NPT	Número constante de partículas, pressão e temperatura
NVT	Número constante de partículas, volume e temperatura
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P-gp	<i>Permeability glycoprotein</i>
Pi	<i>Inorganic phosphate</i>
PMs	<i>Phosphate-binding motifs</i>
<i>PSEN1</i>	<i>Presenilin 1</i>
<i>PSEN2</i>	<i>Presenilin 2</i>
P-Tau	Proteína Tau
Rab	<i>Rat Sarcoma-Related Proteins in Brain</i>
R _g	<i>Radius of gyration</i>
RMSD	<i>Root Mean Square deviation</i>
RMSF	<i>Root mean square fluctuation</i>
sAPP α	<i>Soluble α-APP</i>
sAPP β	<i>Soluble β-APP</i>
SASA	<i>Solvent accessible surface Area</i>
SBVS	<i>Structure-Based virtual screening</i>
Score	Energia de ligação estimada
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
TPSA	<i>Topological polar surface área</i>
vdWs	Van der Waals

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos	19
1.2. Doença de Alzheimer: contextualização, desafios e perspectivas	23
1.3. Etiologia da doença de Alzheimer: aspectos gerais	26
1.4. Rab GTPases: características estruturais e bioquímicas	29
1.5. Rab10: alvo terapêutico na Doença de Alzheimer	32
2. HIPÓTESE	36
2.1. Hipótese do estudo	37
3. OBJETIVO	38
3.1. Objetivo geral	39
4. METODOLOGIA	40
4.1. Seleção e preparação do receptor e ligantes	42
4.2. <i>Virtual screening</i> baseado em estrutura	43
4.3. Análise das interações intermoleculares	44
4.4. Predição ADME/T	44
4.5. Simulações de dinâmica molecular	45
4.5.1. Ferramentas para análise de trajetória	47
4.5.1.1. Raiz do desvio quadrado médio	47
4.5.1.2. Flutuação da raiz quadrada média	48
4.5.1.3. <i>B-factor</i>	48
4.5.1.4. Raio de giração	49
4.5.1.5. Área acessível ao solvente	49
4.5.1.6. Ligações de hidrogênio	50
4.5.1.7. DSSP	50
4.5.1.8. Área de superfície de Poisson-Boltzman da mecânica molecular	51
5. Resultados e Discussão	53
5.1. <i>Redocking</i> molecular	54
5.2. Validação do <i>docking</i> dos nucleotídeos GDP e GTP	55
5.3. <i>Virtual screening</i> baseado em estrutura	57
5.4. Análise das interações intermoleculares	64
5.4.1. ZINC0138791	64
5.4.2. ZINC0519122	65

5.4.3. ZINC0630250	65
5.4.4. ZINC4000106	66
5.4.5. ZINC4090657	67
5.4.6. ZINC2101104	68
5.5. Resultados das simulações de dinâmica molecular	69
6. CONCLUSÃO	95
7. REFERÊNCIAS	97
8. ANEXOS	113

1 Introdução

1.1. Descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos

A introdução de um novo medicamento no mercado é um processo oneroso em termos financeiros, de recursos humanos e tempo, sendo umas das tarefas mais desafiadoras da Ciência. Medicamentos eficazes são necessários para a prevenção e tratamento de doenças humanas complexas. No entanto, estima-se que o custo financeiro para grandes empresas farmacêuticas desenvolverem novos fármacos é de US\$ 2,6 bilhões e que o tempo necessário para o desenvolvimento leva em média de 7 a 10 anos (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016; MACALINO *et al.*, 2015). Atualmente, a inserção de novos medicamentos no mercado vem sendo impulsionada pela indústria biofarmacêutica e por financiamentos de setores públicos na Ciência (HAEUSSLER; ASSMUS, 2021). Entretanto, apesar dos avanços contínuos na Ciência e Tecnologia, cerca de 90% dos candidatos a medicamentos fracassam antes mesmo de serem testados em humanos (LI; TANG, 2021).

O processo convencional da descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos envolve múltiplas etapas que incluem experimentos *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, abordagens *in silico* podem ser empregadas pois possuem a capacidade de gerar previsões confiáveis, bem como novos entendimentos ao nível molecular, auxiliando na redução de tempo, dos custos e nas falhas no desenvolvimento de fármacos (PIÑERO; FURLONG; SANZ, 2018). Ademais, os métodos *in silico* podem reduzir milhares de compostos para um pequeno conjunto daqueles mais promissores, maximizando as chances de encontrar substâncias bioativas e gerar dados concordantes com os experimentos *in vitro* e *in vivo* (MALATHI; RAMAIAH, 2018). Sendo assim, o uso de métodos computacionais na descoberta de novos medicamentos está se tornando essencial para prever as respostas farmacológicas de substâncias bioativas e, inclusive, candidatos a fármacos.

Normalmente, a abordagem tradicional de descoberta de medicamentos envolve a regra de “um medicamento – um alvo biológico – uma doença”, ou seja, um agente terapêutico é projetado para atuar seletivamente em um único alvo biológico de uma dada doença (WU *et al.*, 2018). Segundo MALATHI e RAMAIAH (2018), o processo tradicional compreende as seguintes etapas: (i) identificação de um alvo essencial de uma doença específica; (ii) validação do alvo biológico; (iii) ensaios para identificar potenciais substâncias ativas; (iv) identificação de protótipos contra o alvo

biológico; (v) otimização dos protótipos mais promissores; (vi) estudos pré-clínicos, os quais incluem ensaios *in vitro* e *in vivo*; (vii) submissão de laudo sobre o candidato a fármaco para Agências Nacionais de Vigilância Sanitária (ANVS); (viii) estudos clínicos com Humanos; (ix) submissão de um novo laudo para ANVS; (x) e por último, aprovação do novo medicamento para comercialização.

Adicionalmente, a abordagem CADD (do inglês *Computer-Aided Drug Discovery*) inclui a identificação de potenciais alvos biológicos, *virtual screening* de grandes bibliotecas químicas para a seleção de potenciais substâncias ativas, *docking* molecular, predição das propriedades farmacocinéticas, simulações de dinâmica molecular (DM) entre outros métodos (SHAKER *et al.*, 2021). Comumente, os resultados mais promissores dessas simulações são levados a testes experimentais para a validação. O SBVS (do inglês *Structure-Based virtual screening*) é uma abordagem de CADD que permite maximizar as chances de identificar potenciais substâncias bioativas porque, ao contrário da maneira tradicional de descoberta de medicamentos (como triagem experimental de alto rendimento), considera o conhecimento da estrutura tridimensional (3D) do alvo biológico, e é uma técnica que permite investigar grandes quantidades de dados em um curto período (LIONTA *et al.*, 2014; SRINIVASA; SRINIVAS, 2011). Desse modo, com o auxílio de ferramentas de *docking* molecular no SBVS, torna-se possível predizer os modos de ligação de pequenas moléculas e suas afinidades relativas com o alvo biológico, contribuindo assim com a aceleração na descoberta, desenvolvimento e aperfeiçoamento de medicamentos que cumpram seu papel farmacológico (SLEDZ; CAFLISCH, 2018).

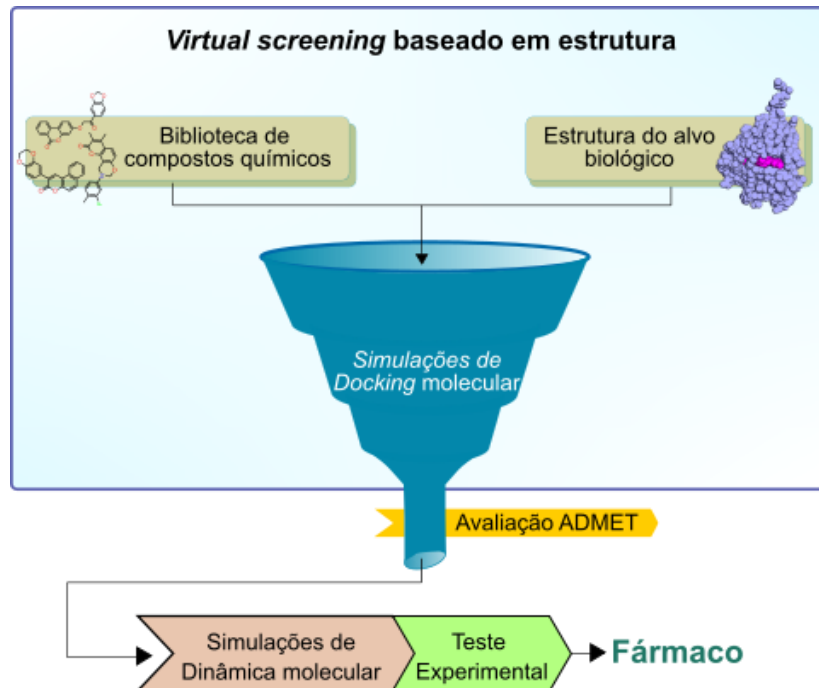
Devido a isso, as estratégias de SBVS têm sido amplamente utilizadas, tanto no ambiente acadêmico quanto industrial, para identificar a afinidade de pequenas moléculas (ligantes) em direção a um alvo molecular. Além disso, o uso de ferramentas computacionais permite analisar as interações moleculares como: ligações de hidrogênio, iônicas, forças de repulsão e atratividade de Van der Waals (vdWs) e interações eletrostáticas (SANTOS; FERREIRA; CAFFARENA, 2019). Assim, por meio das abordagens *in silico*, torna-se possível selecionar potenciais substâncias bioativas disponíveis em grandes bancos de dados de ligantes e, posteriormente, aperfeiçoar as suas propriedades farmacológicas por meio do *design* racional de fármacos (PAN *et al.*, 2013).

Para a realização do SBVS é necessário dispor de informações estruturais sobre o alvo biológico e sobre os ligantes que serão considerados. Normalmente,

essas estruturas podem ser obtidas por meio de bancos de dados de moléculas, os quais reúnem informações biológicas, químicas e físicas. No caso das proteínas, as suas informações estruturais podem ser obtidas por técnicas experimentais como: cristalografia de raio-X, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e criomicroscopia eletrônica (SHAKER *et al.*, 2021). Tais informações podem ser recuperadas a partir de repositórios de dados tridimensionais de biomoléculas como o PDB (do inglês, *Protein Data Bank*) (BERMAN *et al.*, 2000). Entretanto, nem sempre a estrutura da proteína é conhecida, levando a necessidade de mimetizar a sua estrutura 3D por métodos computacionais como modelagem comparativa, *ab initio* ou *trheading* (MUTHUMANICKAM *et al.*, 2020). Uma vez que a estrutura da proteína e dos ligantes estejam disponíveis, a realização do SBVS é possível.

O SBVS é uma técnica computacional que permite identificar ligantes que possuem propriedades estruturais e físico-químicas particulares. Basicamente, a técnica funciona como um filtro (ou um pré-filtro) que seleciona determinadas moléculas potencialmente ativas, provenientes de uma biblioteca virtual, contra um alvo farmacológico determinado (PEREIRA; CAFFARENA; SANTOS, 2016). As entradas básicas de um fluxo de trabalho em SBVS são: a estrutura do alvo biológico (seja resolvida experimentalmente ou modelada computacionalmente) e uma biblioteca composta de pequenas moléculas (CHENG *et al.*, 2012). O processo é realizado sob o auxílio de um programa de *docking* molecular, o qual insere cada ligante da biblioteca virtual em uma região específica de um alvo biológico com estrutura 3D conhecida. Durante o processo, uma função de pontuação é implementada para avaliar a adequação entre o ligante ancorado e o alvo, e desse modo, é possível selecionar os ligantes que interagem com o alvo a partir da classificação de suas afinidades de ligação. Comumente é empregado uma etapa adicional nesse processo para avaliar a farmacocinética dos compostos selecionados. Essa etapa visa prever as propriedades de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADME/T) desses ligantes. Desse modo, torna-se possível identificar os ligantes com farmacocinética favorável e, inclusive, usá-los em outras análises *in silico*, como simulações de DM que visam estudar a variação do comportamento molecular da interação alvo-ligante em função do tempo. Para ilustrar o SBVS, a figura 1 mostra a esquematização de um protocolo simplificado de sua aplicação no processo de descoberta de novos medicamentos.

Figura 1. Ilustração simplificada do fluxo de trabalho de SBVS aplicado no processo de descobrimento de novos medicamentos. A figura mostra o emprego de um filtro para selecionar os ligantes (provenientes de um grande conjunto de dados) que possuem aptidão farmacológica contra um alvo biológico específico. Após o uso das abordagens *in silico*, os ligantes podem ser levados à testes experimentais e, caso apresentem características desejáveis, podem ser levados à comercialização.



Fonte. O autor (2022).

Sendo assim, a utilização do CADD possui um papel relevante na descoberta de agentes terapêuticos e vem sendo impulsionado pela disponibilidade de supercomputadores e *clusters*, os quais permitem acelerar o processo de identificação e avaliação *in silico* de potenciais substâncias bioativas (BATTOOL; AHMAD; CHOI, 2019). Segundo SHAKER e colaboradores (2021), diversos medicamentos para o tratamento de doenças humanas foram inseridos no mercado com sucesso por meio da aplicação de CADD. Um dos primeiros medicamentos inseridos no arsenal terapêutico pelo uso de CADD foi o indinavir, um inibidor de protease que é indicado para o tratamento do HIV (do inglês, *Human immunodeficiency virus*). Além disso, o arsenal terapêutico também conta com a presença de atazanavir, ritonavir e saquinavir para o tratamento da HIV, raltitrexed como fármaco anticancerígeno e norfloxacin para o tratamento de infecções bacterianas.

Devido a importância da utilização de ferramentas computacionais no processo de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, desde a recuperação e

gerenciamento de dados biológicos à realização de simulações de DM, este trabalho foi realizado considerando o uso da abordagem de CADD sob a hipótese que produtos naturais podem inibir a proteína Rab10, sendo essa um alvo terapêutico relacionado a doença de Alzheimer (DA).

1.2. Doença de Alzheimer: contextualização, desafios e perspectivas

A DA é uma enfermidade neurodegenerativa, poligênica e multifatorial que está associada a diversos fatores, como: idade, sexo, genética, epigenética, fatores adquiridos e de estilo de vida. Acredita-se que o risco para desenvolver a DA por condições hereditárias é baixo, ocorrendo geralmente devido a mutações nos genes *APP* (do inglês, *amyloid precursor protein*), *ApoE* (do inglês, *apolipoprotein E*), *PSEN1* e *PSEN2* (do inglês, *presenilin 1* e *presenilin 2*, respectivamente). Isso ocorre porque a DA não é uma enfermidade exclusivamente genética, pois pode progredir por meio de fatores adquiridos como comorbidades e aspectos comportamentais (ATHAR *et al.*, 2021; EDWARDS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019). Além disso, estudos veem indicando que mudanças epigenéticas relacionadas a processos adaptativos, como plasticidade sináptica, envelhecimento e resposta a estímulos, podem causar alterações fenotípicas que levam à DA (ESPOSITO *et al.*, 2019; NARCOVA *et al.*, 2017). Devido a diversas contribuições de predisposições e riscos que levam à DA, a etiologia dessa demência é complexa e ainda mal compreendida.

Patologicamente, a DA é caracterizada pelo acúmulo de peptídeos A β agregados e emaranhados neurofibrilares no cérebro, o que compromete progressivamente a memória e a cognição por meio da deterioração irreversível das células cerebrais (LANCTÓT *et al.*, 2017). Em seus aspectos fisiopatológicos, essa doença é caracterizada por manifestações clínicas que incluem a perda de memória episódica, comprometimento cognitivo, distúrbios comportamentais e psiquiátricos (MA *et al.*, 2019). Desse modo, a DA compromete significativamente a qualidade de vida dos portadores, levando a dependência absoluta, hospitalização e a morte.

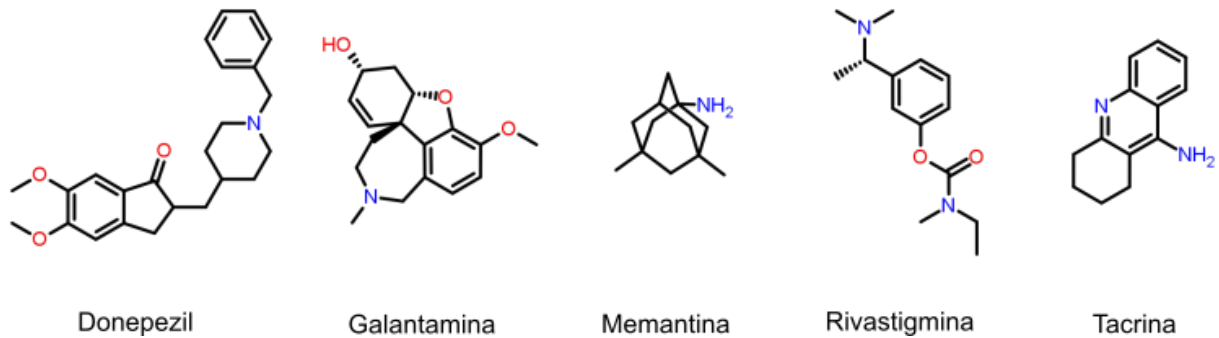
Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) vem apontando a demência como uma das prioridades mundiais no âmbito da saúde pública, afetando aproximadamente 55 milhões de pessoas no mundo (World Health Organization, 2021). As estimativas da OMS indicam que a DA e outras demências são a sétima causa de mortalidade em todo mundo, visando a necessidade de um esforço global

para conter a grave ameaça à saúde pública. Além disso, as previsões indicam que o número de casos de portadores de demências poderá subir para 152 milhões de pessoas em 2050 (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2020). Entre as demências, estima-se que a DA corresponde a 60-70% dos casos, destacando-se como a principal patologia neurodegenerativa em indivíduos acima de 65 anos.

A idade é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de demências. Até os 65 anos, estima-se que a demência se desenvolve em apenas 9% dos casos, enquanto após os 65 anos a chance de adquirir demência é alta. A população mundial está envelhecendo rapidamente, causando profundas transformações em quase todos os setores da sociedade, com impacto importante sobre os sistemas de saúde e socioeconômicos (BEARD, BLOOM, 2015). Segundo projeções da Nações Unidas, em 2020 havia cerca de 727 milhões de pessoas com 65 anos ou mais no mundo. Estima-se que nas próximas três décadas, o número de pessoas idosas será de 1,5 bilhão. Pela primeira vez na história haverá mais pessoas idosas do que crianças no mundo (UNITED NATIONS, 2020). Em função do envelhecimento populacional, o aumento da incidência de idosos portadores de doenças neurodegenerativas é uma preocupação crescente.

Apesar dos avanços nos investimentos, diagnósticos e tratamento da DA, até o momento não existe tratamento eficaz. Apenas três categorias de medicamentos foram aprovadas para o tratamento sintomático da doença: inibidores da colinesterase, anticorpos monoclonais de imunoglobulina humana gama-1 e antagonistas parciais do N-metil D-aspartato. Nos últimos 18 anos, apenas o aducanumabe foi aprovado pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para o tratamento da DA, evidenciando uma alta frequência de falhas nos programas de desenvolvimento de medicamentos para DA (ATHAR; BALUSHI; KHAN, 2021; CUMMINGS *et al.*, 2019; MORLEY; FARR; NGUYEN, 2018). Os principais fármacos que são utilizados para o tratamento dessa doença são Donepezil, Galantamina, Memantina, Rivastigmina e Tacrina (figura 2). Entretanto, esses medicamentos apenas melhoram temporariamente o transtorno cognitivo, sendo incapazes de conter ou reverter a progressão da demência. Além disso, a eficácia desses medicamentos é influenciada pelos fatores genéticos de cada indivíduo e pelo estágio da doença (WONG *et al.*, 2019). O tratamento eficaz ainda é um grande desafio porque além da doença ainda não ser totalmente compreendida, a barreira hematoencefálica restringe a eficácia de medicamentos.

Figura 2. Estrutura química dos principais medicamentos usados para o tratamento da DA.



Fonte. O autor (2022).

O desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da DA possui baixas taxas de sucesso, sendo considerado um empreendimento desanimador para as empresas farmacêuticas. Segundo SABBAGH, HENDRIX e HARRISON (2019), no período de 2004 a 2009 a taxa de falha foi de 99,6%. Um dos principais desafios para o sucesso de um fármaco anti-DA é a capacidade farmacológica de uma substância atravessar a barreira hematoencefálica. Cerca de 98% dos medicamentos de moléculas pequenas e quase 100% dos medicamentos de moléculas grandes não chegam ao cérebro (WONG *et al.*, 2019). Embora diversos alvos enzimáticos tenham sido estudados na tentativa de descobrir novos medicamentos para o tratamento da DA, essa demência complexa ainda permanece clinicamente não atendida. Os principais alvos moleculares estudados na DA são acetilcolinesterases, secretases, histona desacetilases, sirtuinas, caspases e glicogênio sintase quinase-3 (SILVA; REIS; BORGES, 2014).

Existem muitas hipóteses que tentam explicar a etiologia dessa doença, como a hipótese da cascata amilóide, de hiperfosforilação da proteína Tau (P-Tau), estresse colinérgico e oxidativo, de neuroinflamação, endocítica, dendrítica entre outras (AGARWAL *et al.*, 2020; DU; WANG; GENG, 2018). Embora não haja um consenso sobre a etiologia de Alzheimer, a cascata amilóide é uma das hipóteses mais aceitas e estudadas. De acordo com essa hipótese, a produção e o acúmulo cerebral do peptídeo A β , resultante do processamento anormal da APP, é um dos principais eventos causadores da DA (PARONI; BISCEGLIA; SERIPA, 2019). Apesar de vários estudos serem realizados para estudar os efeitos neurobiológicos do peptídeo A β , poucas tentativas de reduzir ou neutralizar terapêuticamente o acúmulo de A β nos cérebros humanos obteve sucesso.

Sabe-se que produtos naturais como alcalóides, prolifenóis e canabinóides podem apresentar efeitos benéficos para o tratamento da DA, Tais compostos visam diferentes mecanismos patológicos e veem mostrando atividades farmacológicas para a prevenção e tratamento dessa demência em diversos estudos pré-clínicos e clínicos (ANDRADE *et al.*, 2019). Nesse contexto, o interesse pela bioprospecção de extratos vegetais e de metabólitos derivados para a prevenção e o tratamento de doenças neurodegenerativas vem se tornando crescente (ASHA, 2017). Sendo assim, a identificação de produtos naturais com atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-amiloidogênicas é uma abordagem emergente na química médica da DA, pois esses compostos podem exercer efeitos protetores em doenças neurodegenerativas. No entanto, os produtos naturais enfrentam vários desafios que podem comprometer a sua eficácia terapêutica. Segundo RAHMAN e colaboradores (2021), a eficácia terapêutica dos produtos naturais pode ser reduzida devido a instabilidades físico-químicas dessas moléculas, bem como fatores que levam à inacessibilidade da barreira hematoencefálica, metabolismo rápido, baixa biodisponibilidade e redução da solubilidade em água.

Nesse sentido, a busca por novos alvos enzimáticos e de novas substâncias bioativas com propriedades eficazes contra a DA, ainda é um esforço contínuo de extrema importância clínica, sujeito a cenários desanimadores. Devido a isso, novas estratégias para a prevenção e o tratamento da DA continuam sendo investigadas a fim de promover maior qualidade de vida aos portadores e, inclusive, conter a grave ameaça que assombra os sistemas socioeconômicos e de saúde do mundo.

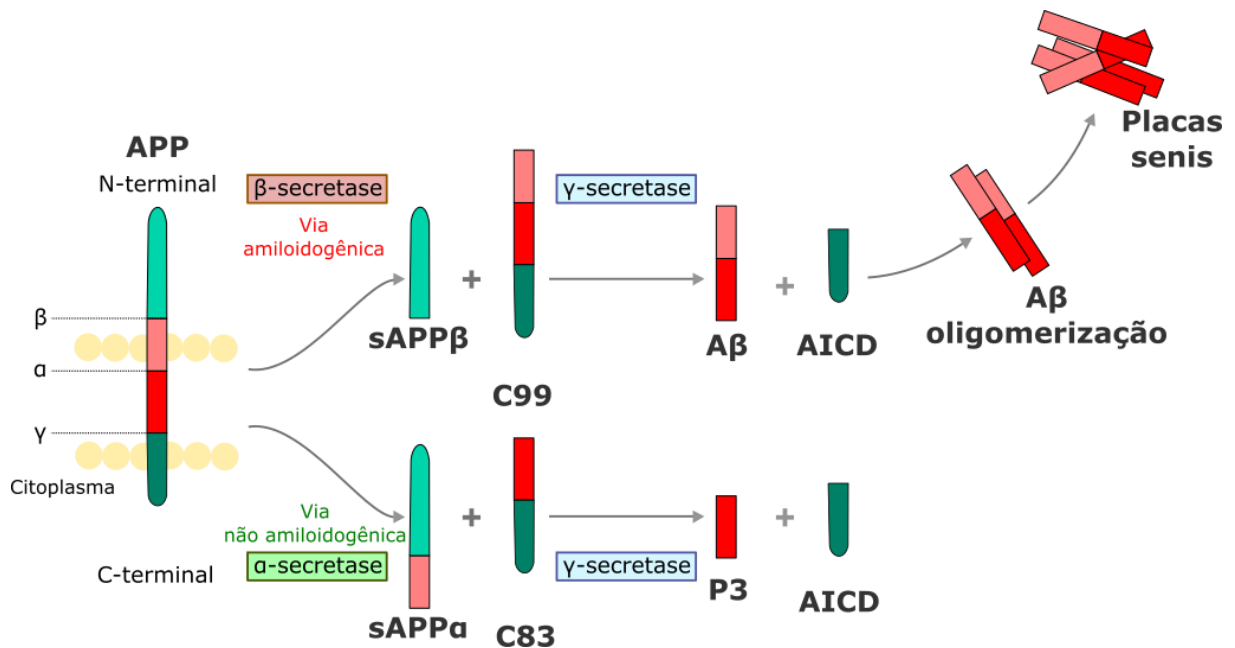
1.3. Etiologia da doença de Alzheimer: aspectos gerais

Atualmente existem muitas hipóteses que tentam explicar a etiologia complexa da DA, sendo a hipótese da cascata amilóide uma das mais aceitas e estudadas. Tal hipótese (também conhecida como hipótese amilóide) foi postulada pela primeira vez em 1991 por HARDY e ALLSOP, sendo reformulada em 2002 após novas descobertas (HARDY; HIGGINS, 1992; HARDY, SELKOE, 2002, SELKOE, 1991). Segundo essa hipótese, a neurodegeneração na DA pode ser causada pela deposição de peptídeos peptídeo A β em placas no tecido cerebral, o que leva a uma cascata de eventos patogênicos. Sendo assim, a produção e o acúmulo do peptídeo A β deve-se ao processamento proteolítico anormal da APP, uma proteína com um grande domínio

N-terminal hidrofílico, um domínio transmembranar hidrofóbico e um pequeno domínio citoplasmático. Sabe-se que essa proteína pode ser processada por meio de duas vias: uma via mediada por α -secretase (denominada não-amiloidogênica) e outra via mediada por β secretase (denominada amiloidogênica) (GALZITSKAYA; GALUSHKO; SELIVANOVA, 2018; SUN; CHEN; WANG, 2015).

A via não-amiloidogênica é não prejudicial, enquanto a via amiloidogênica é responsável pelo processo de biogênese dos peptídeos $A\beta$ (figura 3). Na via não-amiloidogênica, a APP é primeiramente reconhecida e clivada por uma α -secretase na membrana celular, gerando assim um fragmento sAPP α (do inglês, *soluble α -APP*) e um segmento C-terminal de 83 resíduos de aminoácidos (C83). Posteriormente, C83 é clivado pela γ -secretase, produzindo assim dois pequenos fragmentos: P3 e AICD (do inglês, *APP intracellular domain*). Acredita-se o AICD é rapidamente degradado enquanto P3 pode formar pequenas fibrilas (KUHN *et al.*, 2020; PARDOSSI-PIQUARD; CHECLER, 2012). Por outro lado, na via amiloidogênica a APP é preferencialmente internalizada para os endossomos, onde é reconhecida e clivada por uma β -secretase, o que resulta na formação de um fragmento sAPP β (do inglês, *soluble β -APP*) e um segmento C-terminal de 99 resíduos de aminoácidos (C99). Posteriormente, a γ -secretase cliva o C99, levando a produção de AICD e um peptídeo $A\beta$, o qual pode apresentar tamanhos variados (com cerca de 38 a 43 resíduos de aminoácidos). Este peptídeo é tóxico e propenso à agregação e, conforme novos peptídeos $A\beta$ são produzidos, o acúmulo deles resulta em aglomerados de $A\beta$, o que forma as placas senis no parênquima cerebral e, conseqüentemente, eventuais disfunções sinápticas e neuronais.

Figura 3. Ilustração das vias de processamento proteolítico da APP.



Fonte. Adaptado de SUN; CHEN e WANG (2015).

Vale ressaltar que secretase refere-se a uma família de enzimas envolvidas no processamento proteolítico da APP e, inclusive, outras proteínas transmembrana. Sendo assim, α , β e γ -secretase fazem parte de um complexo de enzimas responsáveis pela clivagem de APP (HEIRIKISON, 2013).

Um dos principais fatores para a neurotoxicidade em DA é a oligomerização de peptídeos A β . Entre as isoformas de A β , os peptídeos A β 40 e A β 42 são comumente encontrados nas placas senis. No entanto, A β 42 possui caráter mais hidrofóbico e é mais propenso à agregação que o A β 40 por causa de dois resíduos de aminoácidos extras em sua sequência peptídica (QIU *et al.*, 2015). Desse modo, o acúmulo de peptídeos A β pode induzir eventos a jusante, como: ativação de microglias e astrócitos, estresse oxidativo, alteração na atividade de quinase/fosfatases e lesões pela agregação da P-Tau, onde a patologia Tau é responsável pela formação de emaranhados neurofibrilares no cérebro de portadores de Alzheimer (MULLARD, 2016). Embora vários fatores estejam envolvidos na etiologia da DA, os mecanismos que regem essa doença ainda não são totalmente esclarecidos e, portanto, são frequentemente questionados e contestados pela comunidade científica. Segundo KAMETANI e HASEGAWA (2018), ainda não existem evidências sólidas e consistentes que o acúmulo de peptídeos A β pode induzir a patologia Tau e, devido isso, a hipótese

amilóide e a hipótese da hiperfosforilação Tau devem ser consideradas como eventos patológicos independentes na DA.

Acredita-se que em condições fisiológicas normais, a α -secretase é responsável por clivar cerca de 90% da APP; no entanto, a clivagem sequencial por β -secretase e γ -secretase é favorecida na DA (KAMETANI; HASEGAWA, 2018). Isso pode estar associado a mutações que reduzem a clivagem da α -secretase, como mutações nos genes codificadores de *apoE*, *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* em DA de início precoce, sendo *apoE* também responsável pela DA esporádica (de início tardio). As mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* causam as formas autossômicas dominantes na DA, mas são raras em portadores dessa demência (LANOISELÉE *et al.*, 2017). Por outro lado, variações alélicas no gene *apoE* são mais frequentes e podem estar associadas a uma maior predisposição para o desenvolvimento da DA (YAMAZAKI *et al.*, 2016).

Além disso, estudos sugerem que o processo de internalização da APP (da superfície celular pela via endocítica) favorece o processamento amiloidogênico, pois a retenção de APP em compartimentos ácidos eleva as chances da produção e acúmulo de peptídeos A β (CHOY; CHENG; SCHEKMAN, 2012; SMALL *et al.*, 2017). Isso provavelmente ocorre porque a atividade da β -secretase BACE1 é mais intensa em compartimentos ácidos do que em ambientes de pH neutros. Desse modo, o processamento amiloidogênico da APP ocorre predominantemente em compartimentos intracelulares, como retículo endoplasmático, endossomos iniciais, endossomos tardios, complexo retrômero e rede trans de Golgi (SUN; ROY, 2018; ZHANG H. *et al.*, 2018). Contudo, reguladores exocíticos/endocíticos (como as RAB GTPases) veem atraindo atenção devido aos seus papéis no tráfego intracelular de vesículas, pois podem estar relacionados a eventos que levam à DA (ZHANG X. *et al.*, 2019).

1.4. Rab GTPases: características estruturais e bioquímicas

As pequenas Rab GTPases (*rat Sarcoma-Related Proteins in Brain*) são responsáveis por regular diversos processos do tráfego intracelular de vesículas em células eucarióticas. Acredita-se que várias Rab GTPases estejam envolvidas no transporte entre os compartimentos celulares e em outros processos como biogênese, fusão e emaranhamento de organelas/vesículas ligadas à membrana (HERVÉ;

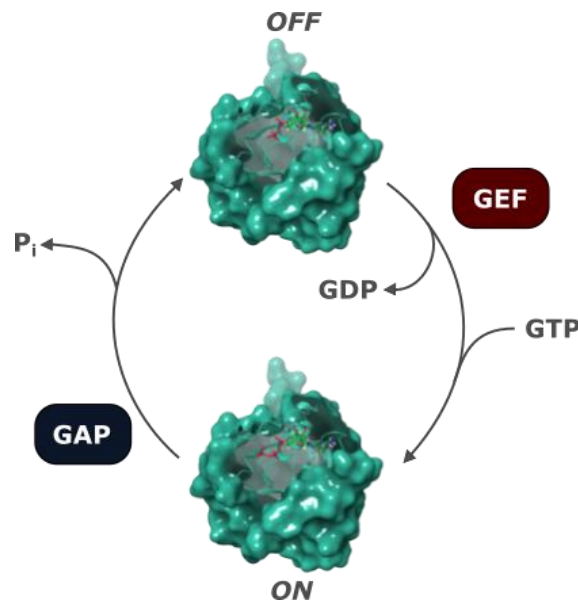
BOURMEYSTER, 2018; HOMMA; HIRAGI; FUKUDA, 2021). Essas enzimas participam na transdução de sinais celulares, regulando os processos celulares por meio da alternância dos nucleotídeos GDP (do inglês, *Guanosine diphosphate*) e GTP (do inglês, *Guanosine triphosphate*). Quando associadas ao nucleotídeo GTP, as Rab GTPases interagem com uma série de proteínas efetoras promovendo eventos de sinalização à jusante. Por outro lado, a hidrólise de GTP resulta em alterações conformacionais nas regiões *switchs* (*switch1* e *switch2*) dessas enzimas, inativando-as. As diferenças entre as conformações das Rabs vinculadas ao GDP e GTP sugerem que, após a hidrólise de GTP, as regiões *switch1* e *switch2* demonstram um alto grau de flexibilidade e de desordem. Em contraste, tais regiões são estabilizadas no estado ativo o que favorece o reconhecimento por proteínas efetoras como: quinases, proteínas motoras e outros complexos proteicos (GOODY; MÜLLER; WU, 2017).

Segundo PYLYPENKO e colaboradores (2018), as células humanas contêm cerca de 70 Rabs que pertencem a 44 subfamílias. Todas as Rab GTPases compartilham um domínio conservado (denominado domínio G), o qual é composto por aproximadamente 5 filamentos de α -hélice e 6 filamentos de folha- β . As Rabs são proteínas monoméricas de baixo peso molecular que possuem cerca de 200-250 resíduos de aminoácidos, onde o domínio G contém aproximadamente 180 resíduos (HOMMA; HIRAGI; FUKUDA, 2021). Além disso, essas enzimas possuem motivos conservados em suas sequências peptídicas que reconhecem a base guanina e o grupo fosfato dos nucleotídeos. Os motivos PMs (do inglês, *phosphate-binding motifs*) interagem com o grupo fosfato dos nucleotídeos, enquanto os motivos Gs (do inglês, *guanine-binding motifs*) com a base guanina. Entretanto, o grupo trifosfato de GTP é capaz de interagir com todos os motivos PMs, enquanto o grupo difosfato de GDP (que possui apenas α e β -fosfato em sua constituição química) interage preferencialmente com o motivo PM1. Desse modo, o nucleotídeo GTP participa de interações intermoleculares envolvendo todos os motivos PMs, o que possibilita a estabilização das regiões *switch1* e *switch2* (CHERFILS; ZEGHOUF, 2013). Vale ressaltar que embora as Rab GTPases apresentem semelhanças estruturais e bioquímicas, elas possuem funções específicas no transporte intracelular de vesículas.

A figura 4 ilustra o ciclo de alternância das Rab GTPases, as quais são ativadas pela troca de GDP por GTP estimulada por GEFs (do inglês, *guanine nucleotide*

exchange factors) e são catalisadas pela hidrólise de GTP induzida por GAPs (do inglês, *GTPase-activating proteins*). A reação de troca é iniciada pela formação de um complexo de uma Rab GTPase associada ao GDP e GEF, que se converte em um complexo livre de nucleotídeos após a lenta dissociação do GDP. Posteriormente, altas concentrações de GTP no meio intracelular fazem com que esse nucleotídeo se ligue ao complexo Rab GTPase-GEF. Tal ligação é capaz de deslocar o GEF, produzindo a forma ativa da GTPase. Em seguida, as GAPs aceleram a hidrólise do GTP, resultando na formação de GDP e um P_i (do inglês, *Inorganic phosphate*), tornando as Rab GTPases novamente inativas (NOVICK, 2016).

Figura 4. Ciclo de alternância GDP/GTP nas Rab GTPases.



Fonte. O autor (2022).

Ademais, as Rab GTPases possuem uma região C-terminal hipervariável, (composta por 20-50 resíduos) e uma região N-terminal (com cerca de 20-50 resíduos). Ambas regiões são flexíveis e garantem que essas proteínas tenham uma mobilidade substancial para exercer seus papéis no tráfego intracelular de vesículas. A região C-terminal é importante porque sofre prenilação pela geranilgeranyl transferase, o que facilita a sua inserção e fixação estável em diferentes compartimentos de membrana (MIMA, 2018). Quando ativadas, as Rab GTPases encontram-se inseridas nas membranas. Por outro lado, quando inativadas essas enzimas ficam sujeitas à extração da membrana devido a ação de GDIs (do inglês, *dissociation inhibitor*),

podendo ser solubilizadas no citosol, onde aguardam um novo processo de alternância para a membrana (MÜLLER; GOODY, 2017).

A maioria das Rab GTPases estão predominantemente associadas à plasticidade sináptica e a neurodegeneração, captando grande parte dos holofotes da pesquisa atual sobre doenças neurodegenerativas. Uma revisão de GUADAGNO e PROGIDA (2019) indicou que as enzimas Rab4, Rab5, Rab6, Rab7a, Rab10, Rab11 e Rab27 estão associadas à DA. Acredita-se que muitas Rab GTPases estão envolvidas no tráfego de proteínas relacionadas à essa demência, onde a maioria delas possuem níveis de expressão elevados em portadores de Alzheimer. Além disso, desregulações nas Rab GTPases estão implicadas com a produção e acúmulo de peptídeos A β nos estágios iniciais da DA (ZHANG X. *et al.*, 2019). Embora muitos alvos enzimáticos sejam investigados para descobrir novos medicamentos anti-DA, as Rab GTPases ainda são relativamente inexploradas.

Vale ressaltar que os mecanismos moleculares das Rab GTPases ainda são obscuros, levando à necessidade de novos estudos sobre os seus papéis fisiológicos. Mas devido as desregulações nas Rab GTPases estarem associadas a DA, as enzimas que pertencem a essa família tornaram-se alvos atraentes na descoberta de medicamentos. Entretanto, segundo CROMM e colaboradores (2015), o uso de pequenas moléculas competitivas à base de nucleotídeos é uma tarefa extremamente desafiadora, pois as pequenas Rab GTPases mostram alta afinidade com os nucleotídeos.

1.5. Rab10: alvo terapêutico na Doença de Alzheimer

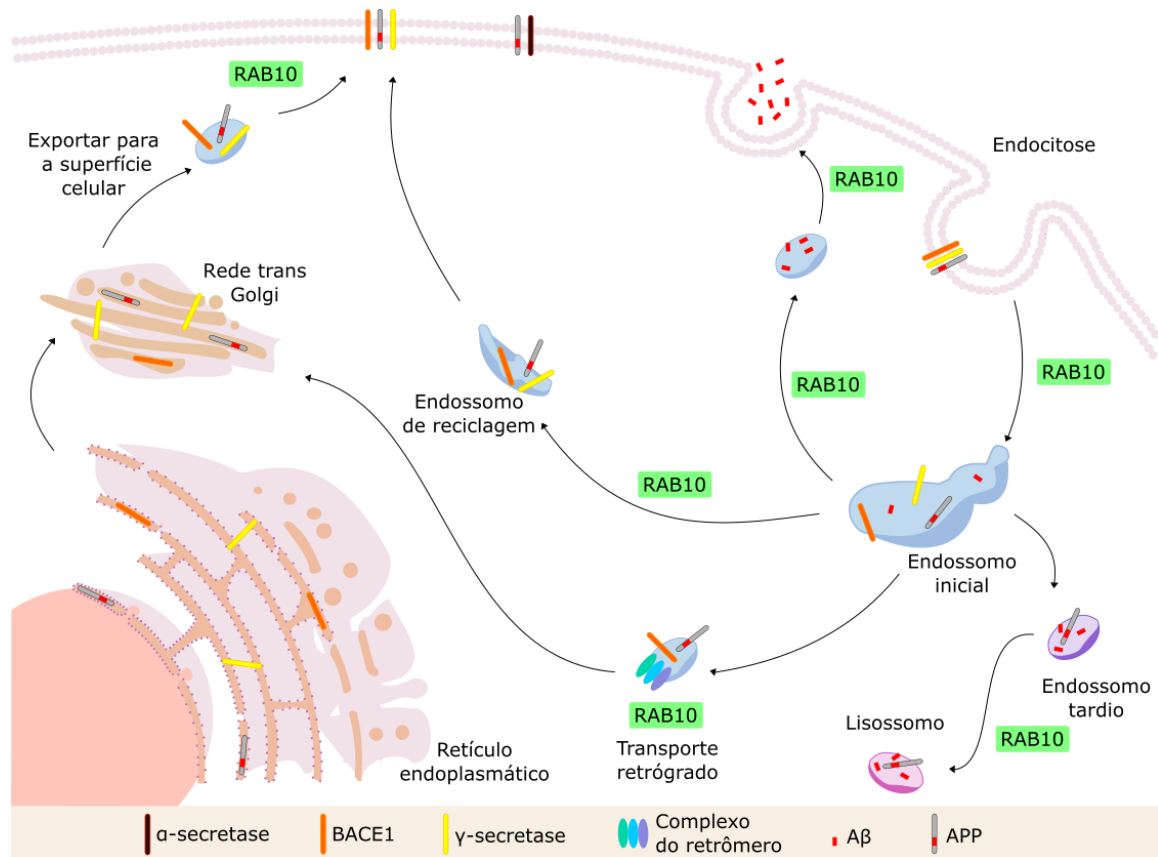
A Rab10 é uma enzima monomérica de baixo peso molecular (de aproximadamente 23 kDa que pertence à família das Rab GTPases. Essa enzima é comumente encontrada em células eucarióticas, a qual é expressa em todos os tipos de células cerebrais onde possui diferentes localizações subcelulares. No passado, os primeiros trabalhos que investigaram a Rab10 relataram que essa enzima estava localizada no complexo de Golgi e na TGN (do inglês, *trans-Golgi network*) (CHEN; HOLCOMB; MOORE, 1993; LEAF; BLUM, 1998). Entretanto, segundo CHUA e TANG (2018), essa enzima pode atuar em diferentes compartimentos subcelulares, pois também está presente nos endossomos, fagossomos, retículo endoplasmático e cílios primários. Devido a sua sublocalização em várias vesículas, a Rab10 é capaz de

realizar uma ampla gama de funções biológicas, contrapondo-se a outras Rab GTPases que possuem funções específicas no transporte celular.

Experimentos *in vitro* sugerem que a Rab10 pode exercer funções essenciais para o funcionamento adequado dos neurônios, podendo atuar na regulação da estrutura e dinâmica do retículo endoplasmático e na arborização de dendritos de ordem superior e distal (ENGLISH; VOELTZ, 2013, ZOU *et al.*, 2015). Por outro lado, estudos vêm apontando que a enzima Rab10 possui um papel relevante na patologia de Alzheimer, pois ela auxilia no processamento amiloidogênico da APP por meio da sua atuação como regulador chave em diversos aspectos do tráfego intracelular de vesículas (RIDGE *et al.*, 2017; TAVANA *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2016). Estudos *in vivo* de RIDGE e colaboradores (2017) indicaram que o *knockdown* da Rab10 reduz a produção de A β 42, sem comprometer a viabilidade celular. Além disso, esses autores relataram que os níveis de mRNA (do inglês, *Messenger RNA*) e de expressão da Rab10 são significativamente maiores no córtex cerebral de portadores da DA. No passado, UDAYAR e colaboradores (2013) realizaram uma triagem de RNA de interferência considerando Rab GTPases humanas, onde constataram que o *knockdown* da Rab10 reduz os níveis de A β .

A figura 5 mostra os papéis da Rab10 nas vias de transporte intracelular em relação ao tráfego de proteínas relacionadas a DA. Na via secretora, a APP e outras proteínas relacionadas a DA (α -secretase, BACE1 e γ -secretase) são sintetizadas no retículo endoplasmático e translocadas para o complexo de Golgi, onde são maturadas. Posteriormente, essa carga proteica trafega pela via secretora até ser exportada para a superfície celular. Uma vez que a APP atinge a superfície celular, ela pode ser clivada pela α -secretase que medeia a via não-amiloidogênica, ou ser rapidamente internalizada pela via endocítica. A endocitose da APP favorece a sua clivagem sequencial por BACE1 e γ -secretase, permitindo a biogênese e liberação de A β para o meio extracelular. De forma alternativa, o complexo retrômero pode regular o transporte dessa carga de proteínas dos endossomos para a TGN ou para a superfície da célula pela via de reciclagem. Assim, o transporte dependente de retrômero pode favorecer o processamento da APP pela via amiloidogênica, regulando a última instância de produção de A β . Além disso, a Rab10 também pode estar associada a processos de exocitose e pelo transporte de proteínas para os lisossomos.

Figura 5. Papéis da Rab10 nas vias de transporte celular em relação ao tráfego de proteínas associadas à DA. A legenda da imagem mostra as principais proteínas relacionadas à DA.

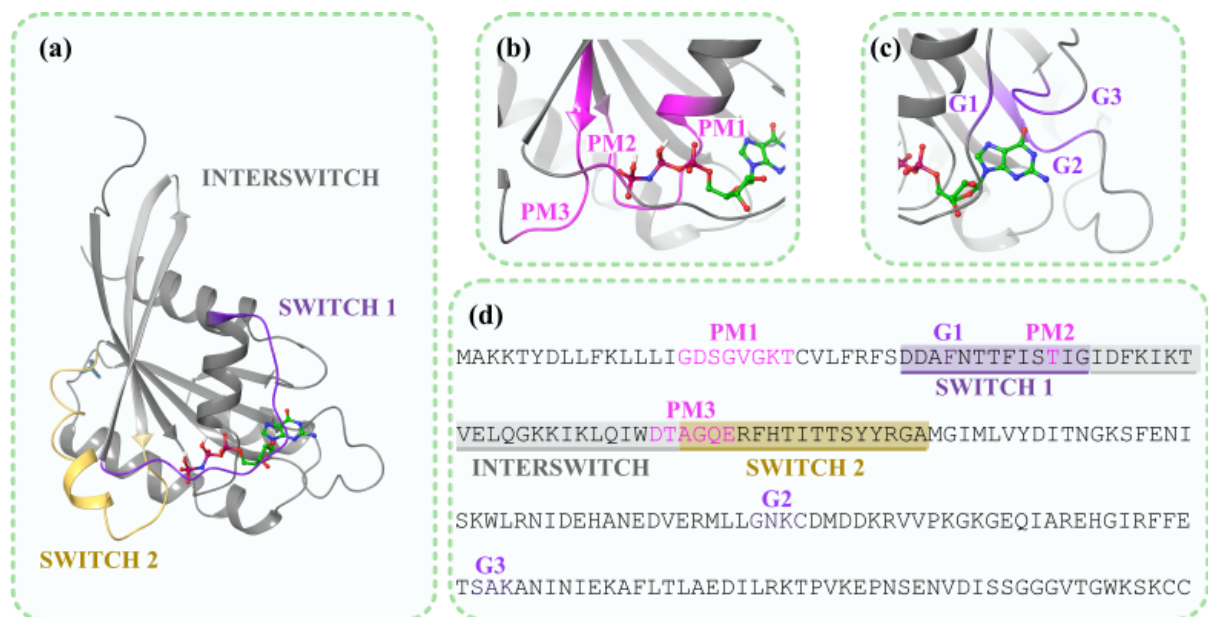


Fonte. Adaptado de TAVANA *et al.* (2019).

A Rab10 possui um domínio globular (domínio G) conservado de 164 resíduos de aminoácidos compatível com forte ligação a GDP e GTP. As diferenças entre as conformações da Rab10 vinculadas a esses nucleotídeos sugerem variações conformacionais com a liberação do γ -fosfato após a hidrólise de GTP, permitindo que as regiões *switch1* e *switch2* fiquem desordenadas e mais flexíveis. A região *switch1* interage com a base da guanina e/ou açúcar dos nucleotídeos GDP/GTP, contribuindo com uma treonina presente no motivo PM2 que se liga ao γ -fosfato do GTP. A região *switch2* não se liga ao GDP, mas interage com o γ -fosfato de GTP pelo seu motivo PM3 conservado (CHERFILS; ZEGHOUF, 2013). Desse modo, a superfície *switch1-interswitch-switch2* do domínio G da Rab10 controla as suas associações com diversas proteínas efetoras de maneira regulada. A figura 6 mostra a estrutura da Rab10 associada ao nucleotídeo GNP (do inglês, *guanosine 5'-(3-aminotriphosphate)*) co-cristalizado. A estrutura tridimensional dessa enzima encontra-se resolvida

experimentalmente no PDB por meio da técnica de difração de raios-X, possuindo uma resolução 2,66 Å (RIDGE *et al.*, 2016).

Figura 6. Ilustração da estrutura da Rab10 associada ao GNP. (a) Estrutura tridimensional da Rab10 com as suas regiões *switchs* em destaque; (b) com seus motivos PMs em destaque; (c) com seus motivos Gs em destaque; (d) sequência primária da Rab10 com as regiões *switchs* e motivos conservados em destaque. A proteína Rab10 está representada em formato *cartoon* pela cor cinza, enquanto o nucleotídeo GNP está representado em formato *ball-and-stick*, possuindo átomos de carbono customizados pela cor verde.



Fonte. O autor (2022).

Embora a Rab10 esteja envolvida em diversas funções no tráfego intracelular de vesículas, a sua participação no processamento amiloidogênico, juntamente com as evidências que a redução de sua atividade resulta em menores níveis de A β , tornam essa enzima um potencial alvo terapêutico para a prevenção e tratamento da DA. Sendo assim, a inibição da atividade da Rab10 por meio do uso de pequenas moléculas pode representar uma alternativa promissora na DA.

2 HIPÓTESE

2.1. Hipótese do estudo

Visto que (i) a abordagem de CADD permite maximizar as chances de identificar potenciais substâncias bioativas contra um alvo biológico, e (ii) que há evidências *in vitro/in vivo* que a inibição da Rab10 resulta em menores níveis de $A\beta$, a hipótese deste trabalho é que a inibição da atividade da Rab10 por meio de produtos naturais possa ser uma estratégia promissora para o tratamento da doença de Alzheimer (DA). Sendo assim, a aplicação de estratégias *in silico* visando como alvo Rab10 pode permitir a identificação de potenciais substâncias bioativas para serem usadas em estudos adjacentes na luta contra a DA.

3 OBJETIVO

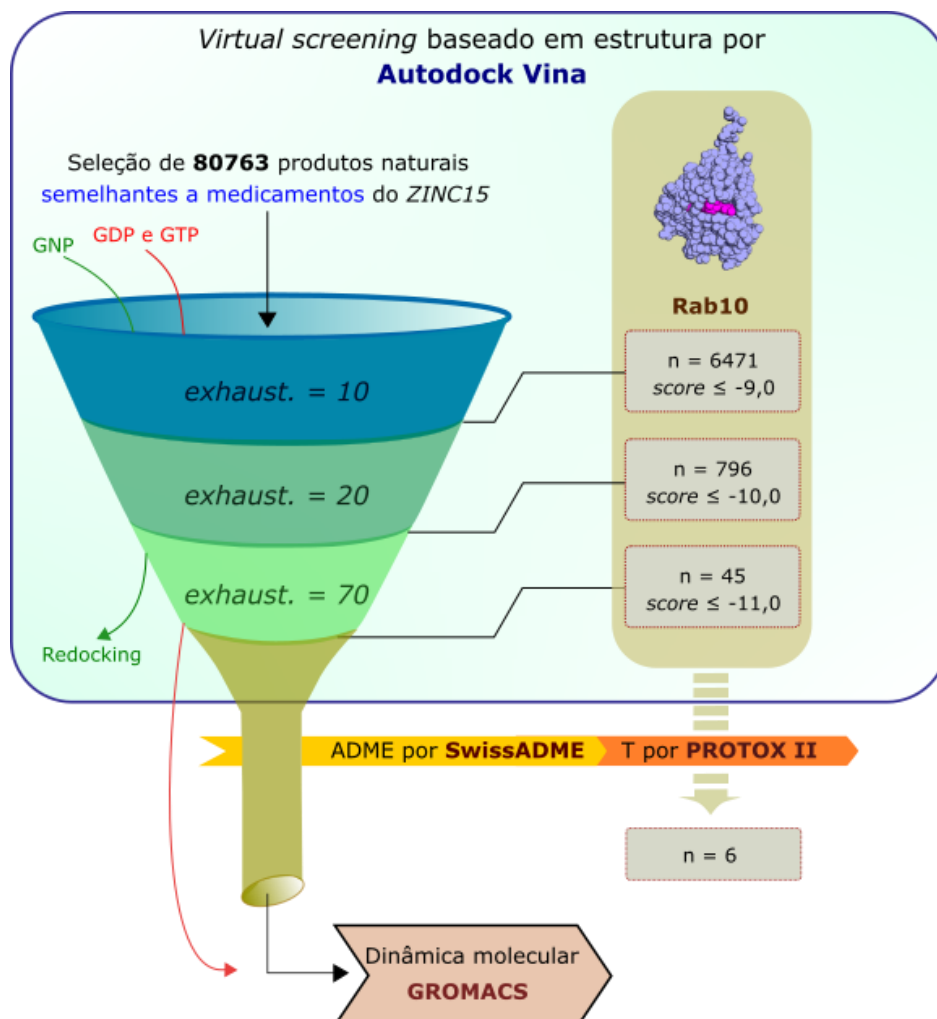
3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal a aplicação da abordagem de SBVS e simulações de DM, de modo a investigar potenciais substâncias bioativas (provenientes de produtos naturais) contra o alvo Rab10 e propor possíveis candidatos com ação terapêutica na luta contra a Doença de Alzheimer.

4 METODOLOGIA

A figura 7 ilustra o fluxo de trabalho contendo as principais etapas que foram empregadas para filtrar um conjunto de ligantes para aqueles que possuem características farmacológicas desejáveis para inibir a Rab10. Todas as etapas foram realizadas por meio de técnicas *in silico*, com o uso de programas gratuitos para o uso acadêmico.

Figura 7. Esquematização do fluxo geral de trabalho. A figura mostra o emprego de um filtro para selecionar 80763 produtos naturais (selecionados da base de dados ZINC15) que possuem aptidão farmacológica contra o alvo Rab10. Tais ligantes foram reduzidos para aqueles que apresentaram melhor afinidade na interação proteína-ligante, com base em valores preditos para a energia de ligação (*score*) em três etapas sequenciais que visavam o aumento da exaustividade (*exhaust.*) da simulação. Posteriormente, uma menor quantidade de ligantes foi submetida à análise dos perfis ADME/T, a qual permitiu selecionar 6 ligantes com características desejáveis. Por último, esses ligantes foram submetidos a simulações de dinâmica molecular (DM). A validação do protocolo de *docking* molecular foi determinada pelo *redocking* do nucleotídeo GNP, enquanto os nucleotídeos GDP e GTP foram usados como controles nas análises de *docking* e de DM.



3.1. Seleção e preparação do receptor e ligantes

A estrutura da Rab10 (PDB ID: 5SZJ; 2,66 Å) foi obtida do PDB (BERMAN *et al.*, 2002) e um total de 80763 ligantes foram obtidos da base de dados ZINC15 (STERLING; IRWIN, 2015). A seleção de ligantes foi realizada considerando compostos com propriedades semelhantes a medicamentos, com massa molecular (MM) menor ou igual a 400 Da, do subconjunto de produtos naturais e que estão disponíveis comercialmente. Isto porque moléculas com alta lipossolubilidade e com MM menor ou igual 400 Da possuem o potencial de se difundir mais facilmente pela barreira hematoencefálica (TAVANA *et al.*, 2019). Além disso, os produtos naturais podem apresentar efeitos neuroprotetores, sendo considerados agentes terapêuticos promissores na luta contra a DA (ANDRADE *et al.*, 2019). O quadro 1 mostra a distribuição dos ligantes obtidos do ZINC15 em relação a massa molecular e coeficiente de partição (logP).

Quadro 1. Descrição dos 80763 produtos naturais selecionados a partir do ZINC15.

		Massa molecular (em Dalton)					
		250	300	325	350	375	400
logP	-1	939	751	298	301	275	192
	0	669	1051	505	448	449	357
	1	1069	1521	947	1141	955	777
	2	1917	2792	1951	2247	2383	1886
	2,5	1119	1820	1365	1762	2212	1708
	3	1070	1995	1684	2193	2595	2745
	3,5	757	1807	1695	2066	2644	2824
	4	542	1288	1223	1731	2203	2529
	4,5	350	706	883	1373	1722	2066
	5	215	338	619	734	1077	1282

Esses ligantes foram protonados de acordo com o estado de protonação em pH fisiológico com o auxílio do *software* Open Babel 3.0.0 (O'BOYLE *et al.*, 2011). Posteriormente, os ligantes e o receptor farmacológico foram preparados por meio do programa MGLTools 1.5.4 (MORRIS *et al.*, 2009) para serem submetidos ao programa Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2009).

3.2. *Virtual screening* baseado em estrutura

O programa Autodock Vina 1.1.2 foi usado para o estudo de SBVS, pois é um programa gratuito e de código aberto que é amplamente utilizado pela comunidade científica. Tal programa utiliza o algoritmo ILS (do inglês, *Iterated Local Algorithm*) como método de busca e uma função de pontuação empírica baseada em aprendizado de máquina. Como abordagem para o tratamento das moléculas parceiras, o Autodock Vina utiliza a abordagem de corpo semi-flexível, onde a proteína é mantida imóvel enquanto o ligante possui todos os seus graus de liberdade translacionais e rotacionais respeitados. Desse modo, essa técnica permite prever o modo de ligação de uma pequena molécula (ligante) com uma proteína receptora (alvo molecular). Por isso, o *docking* molecular é comumente utilizado no SBVS devido a sua capacidade de prever os modos de ligação (conhecidos como poses) que os ligantes assumem, permitindo assim prever as interações intermoleculares e a adequação de cada ligante na interação com um alvo molecular específico com base na classificação dos seus *scores* (PINZI; RASTELLI, 2019).

O centro do espaço de busca do receptor foi definido pela média das coordenadas cartesianas do nucleotídeo GNP co-cristalizado na estrutura da Rab10. O centro dos eixos X, Y e Z foi definido pelos valores 34,69, 26,25 e -46,08, respectivamente. As dimensões da grade de *docking* foram ajustadas para 22 x 22 x 22 Å. A simulação de SBVS foi realizada em três etapas sequenciais, considerando três sementes de randomização diferentes para maior variabilidade nos resultados. Em cada etapa, o valor da exaustividade do cálculo foi aumentado pois uso de execuções partindo de diferentes sementes de randomização associadas ao aumento da exaustividade pode permitir maior variabilidade nos resultados e, conseqüentemente, maior probabilidade de encontrar a energia de ligação mínima (JAGHOORI; BLEIJLEVENS; OLABARRIAGA, 2016). A exaustividade da primeira, segunda, e terceira etapa foi 10, 20 e 70, respectivamente.

O conjunto de 80763 ligantes e os nucleotídeos GNP, GDP e GTP foram submetidos às três etapas sequenciais de SBVS contra a enzima Rab10. A validação do protocolo de *docking* molecular foi determinada por meio do *redocking* do nucleotídeo GNP co-cristalizado, ou seja, o ligante determinado experimentalmente foi retirado do sítio de ligação da biomolécula e, posteriormente, recolocado

novamente neste local por meio do emprego do programa de *docking*. Desse modo, é possível verificar se o programa utilizado é capaz de reproduzir a pose experimental.

A função de pontuação do Autodock Vina foi utilizada para eleger os ligantes para as etapas subsequentes. Na primeira etapa, foi possível identificar 6471 ligantes com *score* menor ou igual a $-9,0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ para serem submetidos à segunda etapa. Do mesmo modo, 796 ligantes com *score* menor ou igual a $-10,0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ foram submetidos à terceira etapa, onde foi possível identificar 45 ligantes com *score* menor ou igual $-11,0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. As energias de ligação dos nucleotídeos GDP ($-10,6 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) e de GTP ($-11,5 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) foram usadas como controle nas simulações de *docking*, visto que a interação deles com a Rab10 leva à forma inativa e ativa da enzima, respectivamente. As interações entre os compostos e o receptor foram visualizadas por meio do *software* Maestro 12.3 (SCHRÖNDIGER, 2021). Finalmente, as poses provenientes de cada semente de randomização foram escolhidas por meio da menor energia de ligação, maior número de interações intermoleculares e menor número de maus contatos de vdWs.

3.3. Análise das interações intermoleculares

As interações entre os compostos e o receptor foram visualizadas por meio do *software* Maestro 12.3. As ligações de hidrogênio foram quantificadas usando o parâmetro padrão do programa Maestro, onde a distância máxima é igual a $2,8 \text{ \AA}$, o ângulo mínimo do doador é igual a 120° e o ângulo mínimo do acceptor equivale a 90° . Os critérios usados para quantificar as ligações de halogênio, pontes salinas, ligações de hidrogênio aromáticas, π - π e contatos de vdWs foram mantidos. Os cálculos de RMSD para as simulações de *redocking* foram realizados por meio do programa GROMACS 2019.3 (SPOEL *et al.*, 2005).

3.4. Predição ADME/T

Para um medicamento ser eficaz, ele deve ser capaz de atingir o seu alvo no corpo em concentração suficiente para que os efeitos terapêuticos ocorram. O servidor SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) foi usado para a predição das propriedades ADME de todos os 45 compostos selecionados por meio das três etapas sequenciais do SBVS. Tal ferramenta oferece uma série de modelos preditivos que permitem avaliar a farmacocinética, semelhança de medicamentos e a

compatibilidade de pequenas moléculas com a química medicinal. Além disso, este servidor possui o recurso *BOILED-Egg*, um método que permite prever simultaneamente dois parâmetros importantes de ADME: a absorção gastrointestinal passiva e o acesso cerebral. Esses parâmetros são preditos com base em dois descritores: TPSA (do inglês, *topological polar surface area*) e os valores preditos para o coeficiente de partição octano-água do modelo preditivo MLOGP. Esse recurso também permite predizer se os compostos são substratos da P-gp (do inglês, *permeability glycoprotein*). O conhecimento sobre os compostos serem ou não substratos de P-gp é fundamental para avaliar o efluxo ativo através das membranas biológicas (DAINA; ZOETE, 2016). Desse modo, foi possível filtrar os 45 compostos a fim de identificar aqueles que possuem o potencial de penetrar as barreiras biológicas que dão acesso ao cérebro e não estarem sujeitos ao efluxo ativo, sendo possível identificar 6 compostos com características favoráveis. Estes compostos foram submetidos ao servidor PROTOX II (BANERJEE *et al*, 2018), um modelo preditivo baseado em similaridade molecular, farmacóforos, fragmentos e modelos de aprendizado de máquina que permite avaliar a toxicidade e a dose letal oral mediana (DL₅₀).

3.5. Simulações de dinâmica molecular

O pacote GROMACS versão 2019.3 (SPOEL *et al.*, 2005) foi usado para as simulações de DM dos complexos da Rab10 com os 6 compostos promissores e os nucleotídeos GDP e GTP. O emprego dessas simulações é importante porque permite a obtenção de propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas da evolução temporal de um sistema biológico. Desse modo, a técnica de DM permite descrever atômica e conformacionalmente as variações conformacionais de uma proteína quando sujeita a interações com ligantes, sendo essencial para a compreensão da flexibilidade conformacional em proteínas. Além disso, a DM é utilizada para o enriquecimento do *docking* molecular, pois permite tratar a proteína e o ligante de maneira flexível, considerando o efeito dos íons e das moléculas de água explícitas (ABRAHAM *et al.*, 2015; OKIMOTO *et al*, 2009).

Durante a simulação de DM, a integração das leis de movimento de Newton fornece uma trajetória que especifica as posições e velocidades das partículas na evolução temporal. O princípio básico da DM encontra-se no conceito da mecânica

molecular, onde os átomos são considerados como esferas de diferentes tamanhos unidos por molas de comprimento variável, o que representa diferentes tipos de átomos e as ligações entre eles, respectivamente (SINGH et al., 2017). Desse modo, é possível representar as forças harmônicas e elásticas das ligações covalentes. Além disso, um campo de força é necessário para estimar a energia potencial do sistema. Segundo PAQUET e VIKTOR (2015), um campo de força normalmente considera dois tipos de potenciais: os potenciais de ligação e os de longo alcance. Os potenciais de ligação descrevem os estiramentos, vibrações angulares e torcionais entre átomos ligados, enquanto os potenciais de longo alcance representam as interações intra e intermoleculares, como forças de atração-repulsão e interações eletrostáticas.

A escolha de um campo de força é de fundamental importância para o tratamento adequado das biomoléculas, permitindo assim uma melhor estimativa do comportamento molecular de um sistema nas simulações de DM. A parametrização de um campo de força advém de observações empíricas e/ou quânticas, adquiridas pelo estudo de proteínas, lipídios, éteres e carboidratos, bem como pequenas moléculas (PAQUET; VIKTOR, 2015). Os potenciais envolvidos num campo de força são parametrizados para reproduzir aspectos do comportamento molecular dos compostos de interesse. Termos de energias simples como o potencial de ligação, angular, diédrico e de diedros impróprios geralmente podem ser determinados com base em estruturas cristalizadas de pequenas moléculas modelos, bem como técnicas de otimização de geometria ou por métodos da mecânica quântica. Já os termos mais complexos como o potencial de vdWs e eletrostático, são geralmente parametrizados por meio do ajuste de dados experimentais sobre aspectos físicos e termodinâmicos de líquidos orgânicos. Sendo assim, os campos de força utilizados neste trabalho foram o CHARMM36m e o CGENFF, os quais possuem parametrizações compatíveis para tratar a proteína-solvente e as moléculas semelhantes a medicamentos de forma eficiente (HUANG et al., 2017; VANOMMESLAEGHE et al., 2010).

Os complexos foram centralizados em caixas cúbicas, solvatados com moléculas de água TIP3P e neutralizados por meio da adição de um número apropriado de íons Na^+Cl^- considerando uma concentração iônica de 0,15 M. Após a adição de moléculas de água e íons na caixa de simulação, a energia do sistema precisa ser minimizada para otimizar a geometria das moléculas, permitindo o relaxamento das distorções em átomos ligados e não-ligados. O algoritmo de minimização usado neste trabalho foi o *steepest descent*, o qual consiste em caminhar

sobre as barreiras de energia potencial na direção em que a energia decresce, de maneira que o sistema seja levado a um mínimo de energia local próximo (FLIEGE; SVAITER, 2000; ROY; KAR; DAS, 2015). Entretanto, a minimização do sistema não garante que o solvente fique situado de modo adequado nas camadas de solvatação em torno do soluto. Embora o procedimento de minimização forneça um sistema de partida razoável em termos de geometria e orientação do solvente, o sistema deve ser equilibrado sob temperatura constante e, posteriormente, sob pressão constante, para que as moléculas de água e íons possam hidratar locais relevantes na superfície do soluto (BECK; DAGGETT, 2004; VERLI, 2014). Devido a isso, os sistemas foram equilibrados sob um conjunto NVT canônico (número de partículas, volume e temperatura) seguido de um conjunto NPT isotérmico-isobárico (número de partículas, pressão e temperatura).

A fase de produção foi realizada a 300 K por 200 ns e as trajetórias foram salvas a cada 10 ps. As análises de RMSD (do inglês, *Root Mean Square deviation*), RMSF (do inglês, *Root Mean Square fluctuation*), *B-factor* (ou fator de temperatura), R_g (do inglês, *radius of gyration*), SASA (do inglês, *Solvent accessible surface Area*), MM/PBSA (do inglês, *Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area*), DSSP (do inglês, *Dictionary of Secondary Structure of Proteins*) e de ligações de hidrogênio foram utilizadas para analisar as trajetórias.

3.5.1. Ferramentas para análise de trajetória

3.5.1.1. Raiz do Desvio Quadrado Médio

O RMSD é um parâmetro crucial para analisar a estabilidade de simulações biomoleculares ao longo das trajetórias da DM, podendo ser executado pelo módulo `gmx rms` do GROMACS. Segundo BRÜSCHWEILER (2002), a avaliação da estabilidade estrutural é quantificada por meio da sobreposição das coordenadas atômicas do estado inicial em relação aos estados simulados. Sendo assim, a cada intervalo de tempo é realizado sobreposições do instantâneo (tempo) atual com o inicial, o que permite que as mudanças conformacionais da biomolécula sejam observadas ao longo da evolução temporal. A sobreposição das coordenadas atômicas de duas estruturas é feita considerando o movimento de rotação e translação

de uma estrutura à outra. Isso permite que o RMSD seja calculado (em unidades de comprimento) conforme a equação (1):

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i(t) - r_i(0))^2} \quad (1)$$

Onde N é o número de átomos da biomolécula em análise e $r_i(t)$ e $r_i(0)$ são as coordenadas do i -ésimo átomo no tempo t e 0 , respectivamente.

3.5.1.2. Flutuação da raiz quadrada média

O RMSF denota a flutuação de uma posição atômica em relação ao seu valor de distância médio. No programa GROMACS, a análise do RMSF da trajetória pode ser feita pelo módulo `gmx rmsf`. Embora seja uma medida relacionada ao RMSD, o RMSF permite revelar as regiões da biomolécula que são móveis enquanto o RMSD quantifica a divergência estrutural de uma biomolécula em relação ao tempo. Sendo assim, altos valores de RMSF sugerem que os átomos envolvidos possuem alta mobilidade (flutuações) pois divergem da média (PITERA, 2014). O RMSF pode ser calculado pela equação (2), onde τ é o número total de tempo simulado, $r_i(t)$ são as coordenadas do i -ésimo átomo no tempo t e \bar{r}_i é a posição média do conjunto de i .

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{\tau} \sum_{t=0}^{\tau} (r_i(t) - \bar{r}_i)^2} \quad (2)$$

3.5.1.3. B-factor

O *B-factor* (ou fator de temperatura) do módulo `gmx rmsf` do GROMACS, assim como o RMSF, descreve o deslocamento das posições atômicas a partir de um valor médio permitindo esclarecimentos sobre movimento térmico e cinético inerente dos átomos. Segundo YUAN e BAILEY (2005), altos valores de *B-factors* sugerem alta mobilidade nos átomos analisados devido a maiores deslocamentos em relação aos seus valores médios. Desse modo, essa análise permite prever a flexibilidade e desordem de regiões específicas de uma proteína (KUZMANIC; ZAGROVIC 2010). Graficamente, as áreas (dadas em \AA^2) mais flexíveis são coloridas em vermelho, enquanto as áreas mais rígidas, em azul. O *B-factor* pode ser calculado pela equação

(3), onde B_i representa o *B-factor* de um átomo i e $(\rho_i^{RMSF})^2$ é a flutuação quadrática média desse átomo.

$$B_i = \frac{8\pi^2}{3} (\rho_i^{RMSF})^2 \quad (3)$$

3.5.1.4. Raio de giração

O raio de giração (R_g) fornece informações sobre a compactação de proteínas, permitindo descrever o equilíbrio conformacional ao longo de uma simulação. No programa GROMACS, o R_g pode ser executado pelo módulo `gmx gyrate`. Segundo LOBANOV e colaboradores (2008), a compactação de um segmento peptídico afeta a estabilidade e a taxa de dobramento em proteínas. Sendo assim, valores relativamente constantes de R_g indicam estruturas dobradas de modo estável, enquanto menores valores de R_g sugerem maior compactação e vice-versa (LIAO K. *et al.*, 2014). O cálculo do R_g é dado pela equação (4), onde m_i é a massa do átomo i e r_i é a posição do átomo i em relação ao centro de massa da molécula.

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i}} \quad (4)$$

3.5.1.5. Área acessível ao solvente

A SASA é usada para quantificar a superfície molecular de uma dada estrutura, permitindo descrever o contato entre a biomolécula e o solvente. Essa ferramenta pode ser acessada pelo módulo `gmx sasa` do GROMACS. Na análise da SASA de uma trajetória, o seu aumento sistemático indica a desestabilização da biomolécula, a qual pode expor suas regiões hidrofóbicas ao solvente (PAUL; PANDA; THATOI, 2018; OLUTU; SOLIMAN, 2017). A predição da SASA pode ser feita pelo método de EISENHABER e colaboradores (1995), representado pela equação (5):

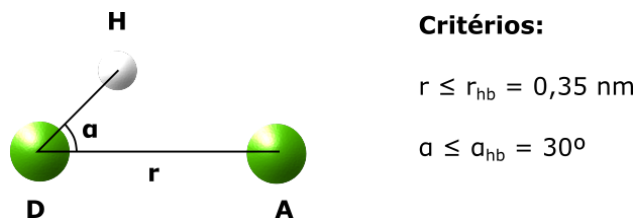
$$SASA = 4\pi \sum_i r_i^2 \frac{m_{acc}(i)}{m} \quad (5)$$

Onde $m_{acc}(i)$ é o número de pontos no átomo i não ocluído por átomos vizinhos e m é o número de pontos por esfera.

3.5.1.6. Ligações de hidrogênio

As ligações de hidrogênio são interações que ocorrem entre átomos de polarização positiva (doadores de hidrogênio) e átomos de polarização negativa (aceptores de hidrogênio). As ligações de hidrogênio são muito importantes em complexos proteína-ligante porque podem contribuir com a seletividade ao alvo biológico e, inclusive, na estabilidade do ligante alocado no alvo (NITTINGER *et al.*, 2017). O módulo `gmx_hbond` do pacote GROMACS quantifica as ligações de hidrogênio entre todos os possíveis átomos doadores (D) e aceptores (A) de hidrogênio usando critérios geométricos (figura 8).

Figura 8. Critérios geométrico do módulo `gmx_hbond` do programa GROMACS.



Fonte. Adaptado do MANUAL DO GROMACS. Disponível em:

https://www.gromacs.org/Documentation_of_outdated_versions/Manual

3.5.1.7. DSSP

O programa DSSP prediz estruturas secundárias aos resíduos de aminoácidos das proteínas, com base nas ligações intramoleculares de hidrogênio definidas por PAULING (PAULING; COREY, 1951a; PAULING, COREY; BRANSON, 1951b). Trata-se de um algoritmo desenvolvido por KABSCH e SANDER em 1983, o qual contém critérios físicos que permitem reconhecer padrões de elementos geométricos formados por ligações de hidrogênio. O DSSP foi implementado no pacote GROMACS, podendo ser executado pelo módulo `gmx` do `_dssp`. Desse modo, a partir da trajetória é possível estimar as regiões de α -hélice, β -folha e *loop* e outras incomuns, como: 3-hélice, 5-hélice, ponte- β , curva e volta.

3.5.1.8. Área de superfície de Poisson-Boltzman da mecânica molecular

O MM/PBSA é um método para estimar a energia livre de ligação e a força de uma interação biomolecular. Tal método foi implementado no programa `g_mmpbsa` do pacote GROMACS e pode ser usado para comparar a energia de ligação de várias pequenas moléculas em uma interação proteína-ligante (KUMARI; KUMAR, 2014). Desse modo, esse método pode ser combinado com simulações de DM, onde é possível avaliar as estabilidades relativas de cada ligante por meio de sua evolução temporal. Segundo WANG e colaboradores (2019), a combinação do método MM/PBSA com DM para estimar a energia livre de uma interação proteína-ligante consiste em três etapas típicas: (i) realização de DM do complexo proteína ligante considerando solvente explícito; (ii) remoção das moléculas de solvente e íons de cada instantâneo da DM para que o modelo de solvente implícito do MM/PBSA seja usado; (iii) cálculo da energia livre de ligação a partir de um conjunto de instantâneos. A equação (6) mostra que a energia livre de ligação ($\Delta G_{\text{ligação}}$) pode ser estimada por meio da diferença entre a energia livre total do complexo proteína-ligante (G_{complexo}) e as energias totais da proteína ($G_{\text{proteína}}$) e do ligante (G_{ligante}) isolados em um solvente.

$$\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{complexo}} - (G_{\text{proteína}} + G_{\text{ligante}}) \quad (6)$$

De acordo com KUMARI e KUMAR (2014), o método MM/PBSA combina três termos energéticos para explicar a mudança na energia livre de ligação. O primeiro termo (U_{MM}) representa a mudança na energia potencial no vácuo, ou seja, na ausência de todo o tipo de matéria. O cálculo desse termo é feito por meio de parâmetros de campo de força da mecânica molecular, considerado potenciais de átomos ligados (como energias de ligação, ângulo e torsão) e de átomos não-ligados (como interações eletrostáticas e de vdWs). Esse termo pode ser calculado conforme a equação (7):

$$U_{MM} = U_{\text{ligados}} + (U_{\text{vdWs}} + U_{\text{elec}}) \quad (7)$$

Onde $U_{ligados}$ representa interações de átomos ligados, enquanto U_{vdWs} e U_{elec} descrevem as interações de vdW's e eletrostáticas entre dois átomos não-ligados, respectivamente.

O segundo termo representa a entropia configuracional associada com a formação do complexo. Trata-se da multiplicação da temperatura (T) por entropia (S), considerando assim a contribuição entrópica para a energia livre no vácuo.

O terceiro e último termo refere-se a dessolvatação ($G_{solvatação}$) de diferentes espécies, o qual é quantificado pela soma das energias de solvatação polar (G_{polar}) e apolar (G_{apolar}) por meio de um modelo de solvatação implícito. O termo G_{polar} representa as contribuições eletrostáticas, enquanto G_{apolar} as contribuições não-eletrostáticas (como forças repulsivas e atrativas entre o soluto e o solvente). O termo de solvatação é representado pela equação (8).

$$G_{solvatação} = G_{polar} + G_{apolar} \quad (8)$$

Sendo assim, a energia livre para cada entidade individual da equação (6) pode ser dada pela equação (9), onde x pode representar a proteína, o ligante ou complexo proteína-ligante.

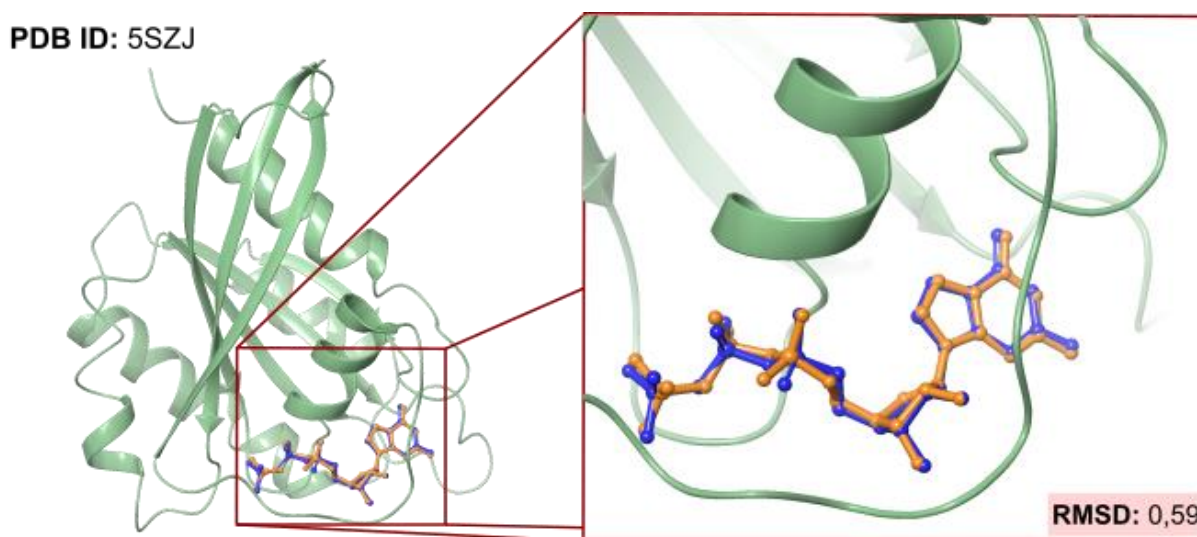
$$G_x = \langle U_{MM} \rangle - TS + \langle G_{solvatação} \rangle \quad (9)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Redocking molecular

A avaliação do *docking* molecular foi feita por meio da comparação entre a pose experimental do nucleotídeo GNP e as três poses previstas mais bem classificadas obtidas pelas etapas sequenciais pelo Autodock Vina. Todas as poses resultantes de menor energia obtiveram um *score* de $-11,8 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e a sobreposição de cada uma destas poses com o nucleotídeo co-cristalizado indicou RMSD menor ou igual a $0,60 \text{ \AA}$. Esse valor é inferior ao nível de tolerância de $2,0 \text{ \AA}$ estabelecido por HEVENER e colaboradores (2009), indicando que o protocolo de *docking* foi validado. Dentre as três poses resultantes, a pose com menor RMSD obteve $0,59 \text{ \AA}$. A figura 9 mostra a melhor pose prevista classificada sobreposta com a pose experimental. Os resultados das três poses previstas mais bem classificadas são mostrados no ANEXO A.

Figura 9. Redocking do nucleotídeo GNP na Rab10 pelo programa Autodock Vina. A proteína Rab10 está representada em formato *cartoon* pela cor verde, enquanto a pose experimental e pose prevista estão representadas em formato *ball-and-stick* pela cor azul e laranja, respectivamente.

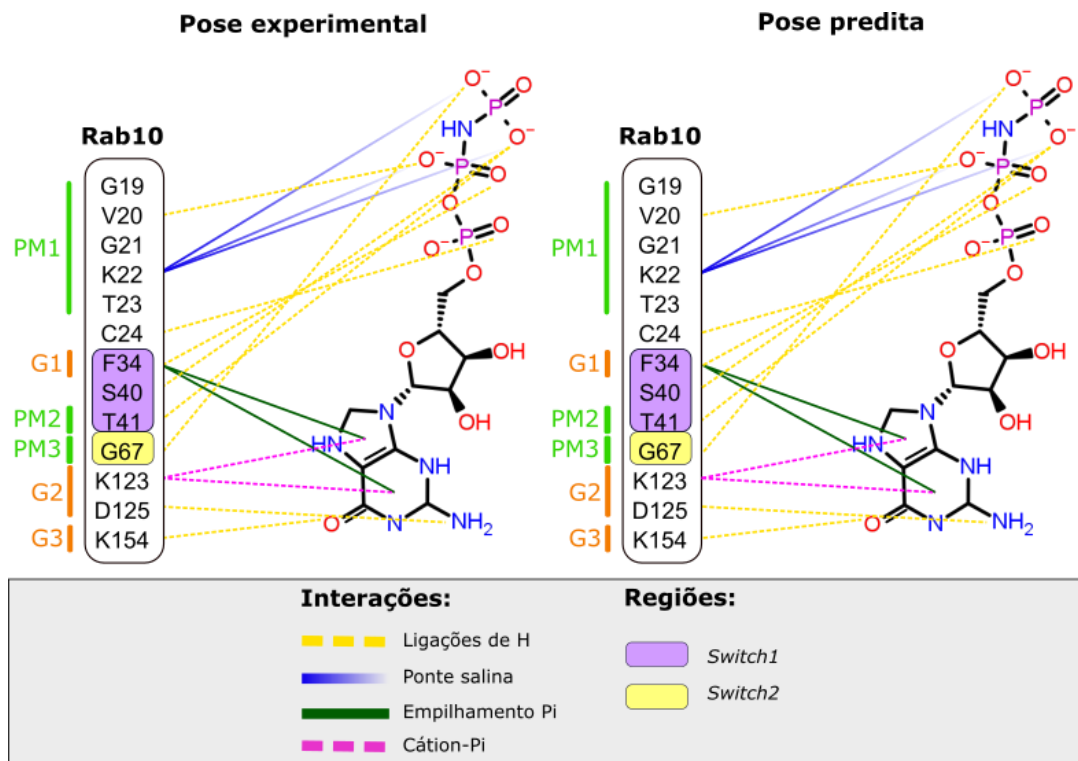


Fonte. O autor (2022).

O modo de ligação da melhor pose prevista foi idêntico às observações experimentais da Rab10 em interação com GNP. A figura 10 mostra as interações intermoleculares existentes na pose prevista e experimental, onde é possível constatar 8 ligações de hidrogênio, 3 pontes salinas, 2 interações de empilhamento π e 2 interações cátion- π . Tais interações envolvem os mesmos átomos, tanto na pose experimental quanto na pose proveniente do *docking*. Além disso, a base nitrogenada

de GNP interage com os motivos Gs, enquanto a porção fosfato faz interações com os motivos PMs, participando de interações envolvendo as regiões *switch1* e *switch2* da Rab10. Isso indica que o protocolo de *docking* foi capaz de reproduzir com sucesso o modo de ligação determinado experimentalmente para o nucleotídeo GNP.

Figura 10. Comparação do modo de ligação da pose experimental e da pose predita de GNP. Os retângulos com barras arredondadas mostram importantes resíduos de aminoácidos da sequência primária da Rab10. Os motivos PMs e Gs dessa enzima estão destacados por barras nas cores verde e laranja, respectivamente. As regiões *switch1* e *switch2*, bem como as interações intermoleculares, estão representados conforme as cores indicadas na legenda da imagem.



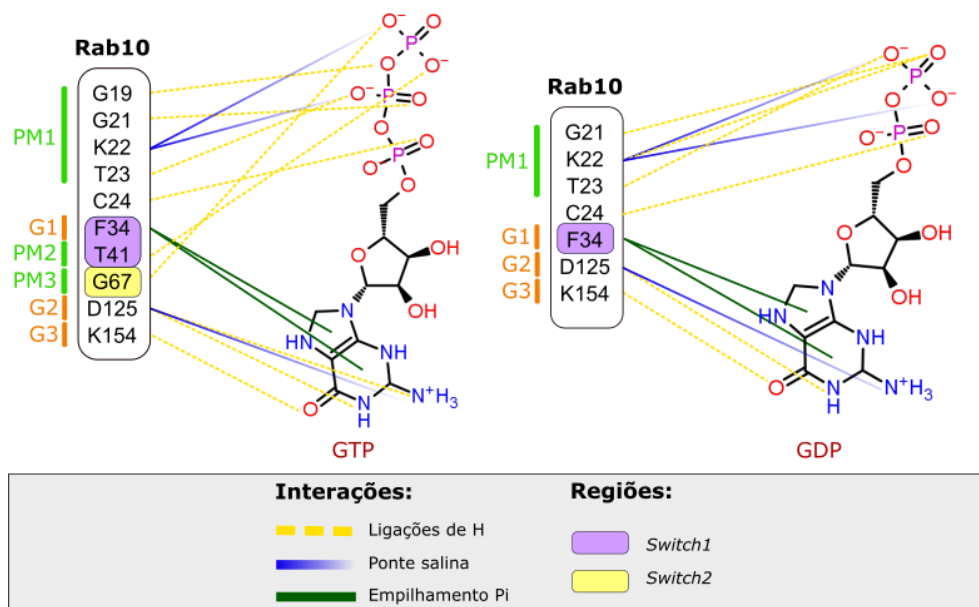
Fonte. O autor (2022).

4.2. Validação do *docking* dos nucleotídeos GDP e GTP

O processo de *docking* dos nucleotídeos GDP e GTP foi realizado com sucesso no sítio ativo da Rab10. A figura 11 mostra os modos de ligação que esses nucleotídeos assumiram no sítio de ligação, onde é possível visualizar que a base nitrogenada desses nucleotídeos interage com os motivos Gs da Rab10. Já o grupo trifosfato de GTP interage com os motivos PMs, enquanto o grupo difosfato de GDP interage somente com o motivo PM1. Em ambos os nucleotídeos, existem interações

envolvendo a região *switch1*, entretanto no caso de GDP a ligação de hidrogênio com T41 é inexistente. Em relação a região *switch2*, apenas GTP participa de interações intermoleculares devido a presença do grupo γ -fosfato em sua constituição química. Tais resultados estão de acordo com as observações de PYLYPENKO, HAMMICH e HOUDUSSE A (2018), as quais detalharam os motivos das Rab GTPases que interagem com os nucleotídeos. No complexo Rab10_GTP foi possível observar a formação de 9 ligações de hidrogênio, 3 pontes salinas e 2 interações de empilhamento π , enquanto em Rab10_GDP, observou-se 6 ligações de hidrogênio, 3 pontes salinas e 2 interações de empilhamento π . Os resultados de energia de ligação obtidos mostraram que o nucleotídeo GTP apresenta maior afinidade com a Rab10 (-11,5 Kcal.mol⁻¹) do que GDP (-10,6 Kcal.mol⁻¹). Os resultados das poses preditas mais bem classificadas para cada nucleotídeo são mostrados no ANEXO B.

Figura 11. Modos de ligação dos nucleotídeos GDP e GTP na Rab10. Os retângulos com barras arredondadas mostram importantes resíduos de aminoácidos da sequência primária da Rab10. Os motivos PMs e Gs dessa enzima estão destacados por barras nas cores verde e laranja, respectivamente. As regiões *switch1* e *switch2*, bem como as interações intermoleculares, estão representados conforme as cores indicadas na legenda da imagem.

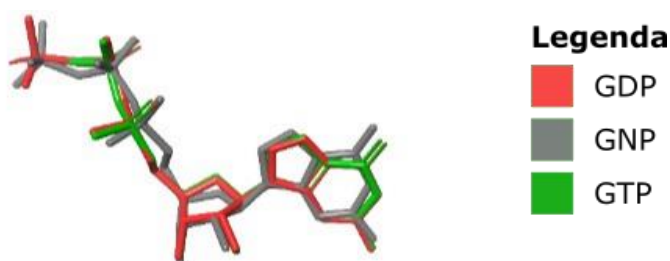


Fonte: O autor (2022).

A fim de constatar que o modo de ligação de GDP e GTP é semelhante a pose do ligante co-cristalizado, comparou-se as poses mais bem classificadas obtidas no *docking* com a pose experimental de GNP. O resultado da sobreposição dessas

estruturas está representado na figura 12, onde é possível visualizar que a base nitrogenada, grupo pentose e a porção fosfato desses nucleotídeos possuem conformações similares. Além disso, o RMSD dos átomos em comum mostrou valores inferiores a 2,0 Å, indicando que as poses são similares.

Figura 12. Sobreposição das poses previstas para GDP/GTP em relação à pose experimental GNP. Os nucleotídeos estão representados em formato *thick-tube* pelas cores indicadas na legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

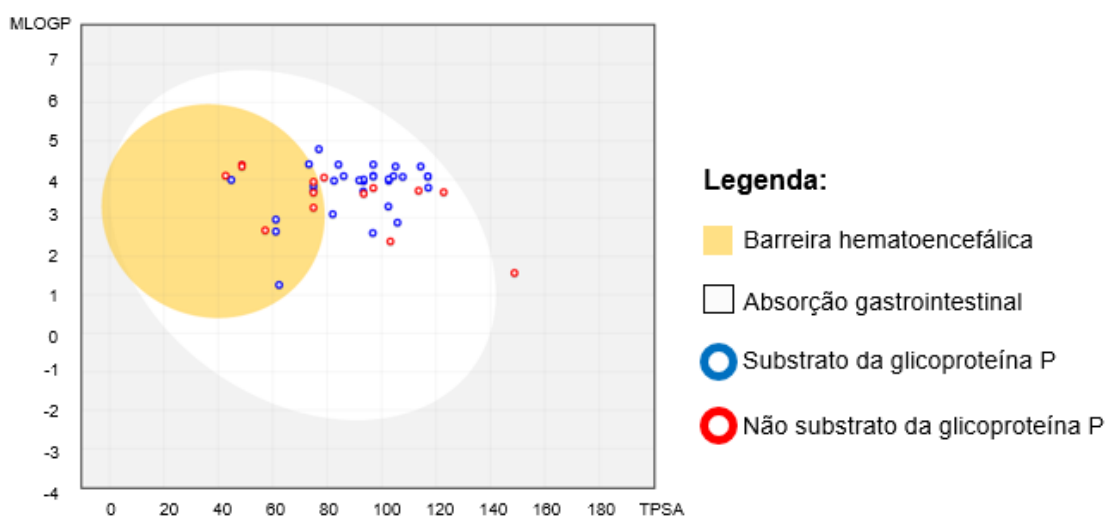
4.3. *Virtual screening* baseado em estrutura

Após a execução do SBVS foi possível obter resultados farmacodinâmicos da interação proteína-ligante e estimar a energia de ligação em cada complexo resultante. Na primeira etapa do SBVS, 80763 ligantes foram ancorados contra a Rab10 considerando o parâmetro de exaustividade do cálculo igual a 10. Um total de 8% ($n = 6471$) de ligantes que apresentaram *scores* menores ou iguais a $-9,0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ foi submetido à segunda etapa de SBVS. Nesta etapa, o parâmetro de exaustividade do cálculo foi alterado para 20. Posteriormente, uma nova seleção foi feita considerando compostos com *score* menor ou igual a $-10,0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ($n = 796$). Estes compostos foram submetidos para a terceira etapa do SBVS com exaustividade equivalente a 70. Assim, foi possível filtrar 45 ligantes com *score* menor ou igual a $-11,0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$. Após o término das simulações de *docking* molecular, cada ligante possuía três poses de menor energia de ligação provenientes de três diferentes sementes de randomização (ANEXO C). Ou seja, três diferentes resultados de *docking* foram gerados para cada ligante a fim de propiciar maior variabilidade nos resultados.

Os 45 ligantes filtrados foram submetidos ao servidor SwissADME para a predição da farmacocinética e de suas propriedades físico-químicas (ANEXO D-H).

Estes ligantes foram filtrados por meio da análise do *BOILED-Egg*, considerando aqueles ligantes que possuem o potencial de permeiar a barreira hematoencefálica e não sofrer efluxo ativo devido a ação da P-gp. A figura 13 mostra que apenas 6 ligantes (aproximadamente 13,33%) apresentaram o potencial de atravessar a barreira hematoencefálica e não estão sujeitos ao efluxo ativo pela P-gp. Estimar se um composto é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica é um parâmetro importante neste estudo visto que a superexpressão da Rab10 situa-se no sistema central. Além disso, considerar o papel fisiológico de transportador de efluxo da P-gp é fundamental para compreender se os ligantes estão sujeitos a processos de externalização/excreção que resultam em baixa biodisponibilidade.

Figura 13. Resultados obtidos no *BOILED-EGG*. A imagem ilustra os 45 ligantes (representados por pontos) distribuídos em diferentes regiões. A região branca representa alta probabilidade de absorção passiva pelo trato gastrointestinal, enquanto a região amarela possui alta probabilidade de penetração ao cérebro. Os pontos vermelhos referem-se aos ligantes que possuem o potencial de não serem substratos da P-gp, enquanto os pontos em azul representam os ligantes que são substratos.



Fonte. O autor (2022). Figura gerada pelo servidor SwissADME (<https://www.swissadme.ch/>).

A regra dos cinco de Lipinski empregada no SwissADME delineia a relação entre os parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos de compostos ativos por via oral, caracterizando perfis de pequenas moléculas com base em 4 descritores: $MM \leq 500$ Da, coeficiente de partição octanol-água ($\log P_{o/w}$) do modelo preditivo $MLOGP \leq 4,15$, número de aceptores de ligação de hidrogênio ($N || O$) ≤ 10 e doadores de ligação de hidrogênio ($NH || OH$) ≤ 5 (LIPINSKI, 2000). Com base nesta regra, todos os 6 compostos podem apresentar boa biodisponibilidade oral, visto que não violaram

qualquer um dos limites permitidos pelos descritores. Os resultados das propriedades físico-químicas e da farmacocinética dos 6 produtos naturais testados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades farmacocinéticas dos 6 compostos testados pelo servidor SwissADME.

Ligante	Regra dos cinco de Lipinski				Absorção GI		Solubilidade (ESOL)		Interação CYP P450
	MM	MLOGP	N O	NH OH	Classe	TPSA	Classe	mg/L	
ZINC0138791	330,33	3,12	4	0	Alta	48,67	Moderada	1,83	1A2, 2C19, 2C9
ZINC0519122	316,31	3,31	4	1	Alta	48,67	Moderada	1,75	1A2, 2C19, 2C9
ZINC0630250	374,34	2,30	6	0	Alta	74,97	Moderada	3,04	1A2, 2C19, 2C9, 3A4
ZINC2101104	364,35	2,26	6	0	Alta	74,97	Moderada	12,1	1A2, 2C19, 2C9, 2D6, 3A4
ZINC4000106	339,36	3,87	4	0	Alta	42,68	Moderada	3,83	1A2, 2C19, 2C9
ZINC4090657	363,36	2,45	5	0	Alta	57,23	Moderada	24,9	1A2, 2C19, 2C9, 2D6, 3A4

Ademais foi predito que estes compostos apresentaram alta absorvidade gastrointestinal (GI), sugerindo que eles podem ser administrados por dosagem oral, com altas chances de serem absorvidos durante o processo de transição do estômago para o intestino delgado pelo mecanismo de permeação passiva. Entretanto, em relação a solubilidade em água, o modelo preditivo ESOL do SwissADME indicou que os compostos testados apresentaram moderada solubilidade em água. Desse modo, tais compostos podem necessitar de maiores dosagens terapêuticas para atingir as concentrações plasmáticas para induzir uma resposta terapêutica. Na série de ligantes, o composto ZINC4090657 foi o que apresentou a maior solubilidade em água (24,9 mg/L) enquanto o composto ZINC0519122 mostrou solubilidade reduzida (1,75 mg/L). Diversos estudos indicam que a dosagem oral é a via de administração preferida porque é menos invasiva, segura e conveniente para a maioria da população (STEWART *et al.*, 2016; STILLHART *et al.*, 2020). No entanto, compostos moderadamente solúveis em água podem apresentar desafios quanto à

biodisponibilidade. Segundo WILLIAMS e colaboradores (2013), cerca de 40% dos medicamentos comercializados e a maioria dos candidatos a fármacos são pouco solúveis em água. Entretanto, com o advento de tecnologias é possível recorrer a estratégias que permitem formular produtos orais intermediários como: aplicação de sais na administração oral, dispersões sólidas amorfas, solubilização em micelas de surfactantes, formulações à base de lipídios, prevenção de precipitação entre outros (BOYD *et al*, 2019). Sendo assim, essas moléculas possuem o potencial de serem formuladas e administradas por via oral, facilitando a adesão ao tratamento e impactos na qualidade de vida do paciente.

Outro parâmetro importante é compreender a interação dos compostos com os CYP (do inglês, *cytochromes*) P450, uma família de isoenzimas responsáveis pela eliminação de medicamentos via biotransformação metabólica. Sabe-se que a inibição das isoformas de CYP *1A1, *C19, *2C9, *2D6 e *3A4 pode levar a efeitos adversos potencialmente tóxicos ou indesejáveis devido à menor depuração e acúmulo de medicamentos no organismo (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Os resultados indicaram que os compostos ZINC4000106, ZINC0138791 e ZINC0519122 possuem o potencial de inibir CYP *1A2, *2C19 e *2C9, enquanto o restante possui o potencial de inibir todas estas isoformas (exceto o composto ZINC0630250, o qual pode não inibir a isoforma *2D6). A partir dos resultados dos descritores ADME, concluiu-se que todos os 6 compostos possuem o potencial de penetrar as barreiras biológicas que dão acesso ao cérebro. Entretanto, eles podem inibir as isoformas de CYP P450 na fase de metabolismo. Porém, estima-se que 50% dos medicamentos existentes no arsenal terapêutico são substratos destas 5 isoformas de CYP P450 (LI, 2014). Portanto, é de grande importância estudar a propensão destes compostos causarem interações medicamentosas indesejáveis por meio da inibição de CYPs e determinar quais isoformas são afetadas.

A fim de estimar a toxicidade destes compostos, todos eles foram submetidos ao servidor ProTox-II. Tal ferramenta permite predizer se um dado composto possui o potencial de oferecer risco carcinogênico, imunotóxico, mutagênico, citotóxico e, além disso, estimar o valor da DL₅₀ em mg/Kg (massa corporal). Neste servidor, os valores da DL₅₀ permitem classificar as moléculas em relação à toxicidade, com base em uma categoria que varia de I a VI, onde a classe I ($0 \leq DL_{50} \leq 5$) e classe II ($5 < DL_{50} \leq 50$) referem-se a compostos que são fatais se ingeridos, classe III ($50 < DL_{50} \leq 300$) aos tóxicos se ingeridos, classe IV ($300 < DL_{50} \leq 2000$) aos prejudiciais se ingeridos, classe

V ($2000 < DL_{50} \leq 5000$) aqueles que podem ser prejudiciais se ingeridos e, por último, classe VI ($5000 < DL_{50}$) aqueles que possuem menor risco nocivo se ingerido. Nessa previsão, a molécula ZINC4000106 mostrou uma DL_{50} de 250 mg/Kg e, portanto, é considerada potencialmente tóxica caso ingerida. Já as moléculas ZINC0138791, ZINC0519122, ZINC4090657, ZINC0630250 e ZINC2101104 foram categorizadas na classe IV de toxicidade, a qual refere-se a compostos que podem ser considerados nocivos se ingeridos. Vale ressaltar que a DL_{50} destes compostos foi predita com uma pontuação de confiança média de $0,67 \pm 0,01$. Embora o composto ZINC4000106 tenha apresentado a menor DL_{50} em relação aos 6 compostos da série, foi o único que mostrou o potencial de ser inativo para oferecer riscos hepatotóxicos, carcinogênicos, imunotóxicos, mutagênicos e citotóxicos. Entretanto, a confiança para estas previsões foi relativamente baixa (entre 0,51 a 0,67). A previsão da DL_{50} e os riscos de toxicidade, juntamente com suas respectivas pontuações de confiança são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Previsões das propriedades toxicológicas para os 6 compostos investigados por ProTox-II.

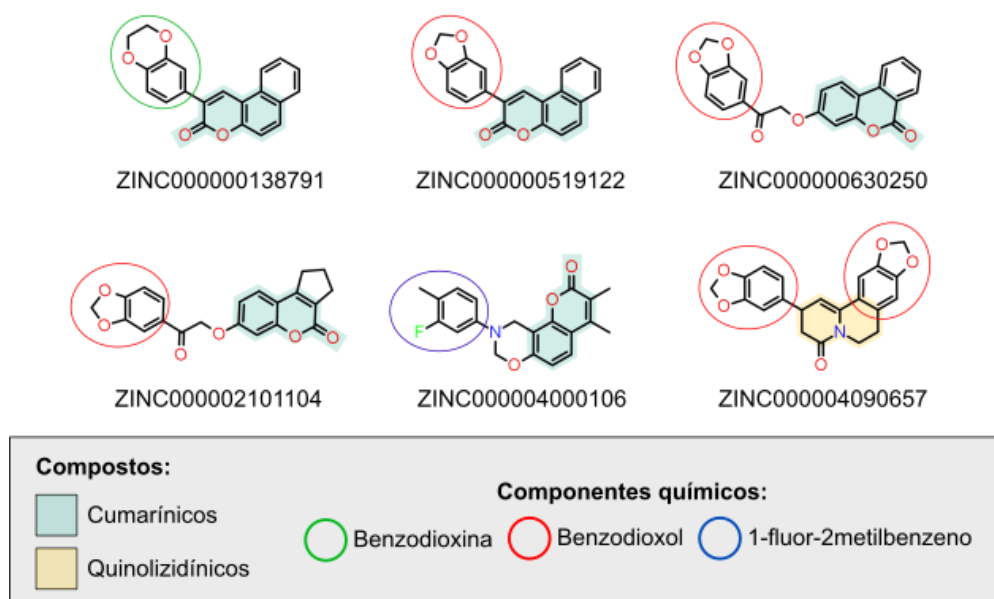
Ligante	Risco (Probabilidade)					DL_{50} (prob.)	Classe de toxicidade
	Hepatotóxico	Carcinogênico	Imunotóxico	Mutagênico	Citotóxico		
ZINC0138791	Inativo (0,74)	Ativo (0,54)	Inativo (0,95)	Inativo (0,79)	Inativo (0,84)	500 (0,68)	4
ZINC0519122	Inativo (0,75)	Ativo (0,62)	Inativo (0,67)	Inativo (0,60)	Inativo (0,84)	350 (0,68)	4
ZINC0630250	Inativo (0,82)	Ativo (0,62)	Ativo (0,92)	Inativo (0,59)	Inativo (0,81)	1000 (0,67)	4
ZINC2101104	Inativo (0,81)	Ativo (0,64)	Ativo (0,94)	Inativo (0,71)	Inativo (0,84)	1000 (0,68)	4
ZINC4000106	Inativo (0,51)	Inativo (0,55)	Inativo (0,68)	Inativo (0,58)	Inativo (0,51)	250 (0,67)	3
ZINC4090657	Inativo (0,83)	Ativo (0,58)	Ativo (0,99)	Inativo (0,63)	Ativo (0,50)	350 (0,67)	4

*prob.: probabilidade.

A figura 14 mostra os 6 compostos que foram filtrados por meio do protocolo de SBVS. Dentre estes compostos, ZINC0138791, ZINC0519122, ZINC0630250, ZINC4000106 e ZINC2101104 são compostos heterocíclicos derivados de cumarina, enquanto ZINC4090657 é um composto heterocíclico derivado de quinolizidina. Além disso, tais compostos apresentaram grupos químicos de benzodioxina, benzodioxol e

1-fluor-2-metilbenzeno em suas bases químicas, os quais podem contribuir para o desempenho desses ligantes na afinidade de ligação com a Rab10. Ademais, o grupo químico de benzodioxol apareceu com maior frequência visto que está presente em 4 dos 6 ligantes melhores classificados. Sabe-se que compostos cumarínicos e quinolizidínicos apresentam uma ampla gama de atividades biológicas (HAMMULAKOVA *et al.*, 2017). Por exemplo, compostos cumarínicos são comercializados como agentes anticoagulantes (Dicumarol), anticancerígenos (Isopimpineline, Osthol e Aloimperatonina), antineoplásicos (Xantoxina) entre outros (SAHNI *et al.*, 2021). Além disso, estudos apontam que compostos derivados de cumarina e quinolizidina podem causar neuroproteção na DA, podendo ter efeitos positivos se usados em concentrações não tóxicas (ARAYA *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2018).

Figura 14. Composição química dos compostos mais bem classificados no SBVS. Os grupos químicos dos ligantes estão representados conforme a legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

As melhores poses dos 6 ligantes identificados no SBVS foram eleitas com base nos seguintes critérios: menor energia de ligação, maior número de interações intermoleculares e menor quantidade de interações de vdWs ruins/péssimas. Assim, foi possível selecionar os melhores modos de ligação de cada complexo proteína-ligante para a execução de simulações de DM. As poses escolhidas para os compostos ZINC0138791, ZINC0519122, ZINC0630250, ZINC2101104,

ZINC4000106 e ZINC4090657, provieram das etapas 3, 2, 2, 2, 3 e 2, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3. Análise das poses provenientes de diferentes sementes de randomização do Autodock Vina. A energia de ligação estimada (*score*) é dada em Kcal.mol⁻¹ e os compostos em negrito representam as poses escolhidas.

ZINC ID	Semente de randomização	Etapa	Score	Ligações de H	Pontes salinas	Empilhamento π	π - Cátion	Interações de vdW's		
								Boas	Ruins	Péssimas
138791	1083282128	1	-11,4	1	0	3	1	324	7	0
138791	2016504256	2	-11,4	1	0	3	1	325	6	0
138791	2106550081	3	-11,4	1	0	3	1	326	6	0
519122	485802206	1	-11,1	1	0	2	1	297	4	0
519122	-1179312950	2	-11,1	1	0	2	1	299	4	0
519122	-380002747	3	-11,1	1	0	2	1	293	4	0
630250	-1213504426	1	-11,1	3	0	4	2	366	10	4
630250	-286604395	2	-11,3	3	0	4	2	366	10	4
630250	-283490051	3	-11,3	3	0	4	2	353	10	6
4000106	2100656970	1	-11,2	4	0	3	1	354	15	1
4000106	460868032	2	-11,2	4	0	3	1	353	15	1
4000106	-1816207551	3	-11,2	4	0	3	1	354	14	1
4090657	943034012	1	-11,1	3	0	3	0	361	13	1
4090657	8289204	2	-11,1	3	0	3	0	362	13	1
4090657	1449487360	3	-11,1	3	0	3	0	361	13	1
2101104	-2011309177	1	-11,1	2	0	3	2	361	6	6
2101104	2016123530	2	-11,1	3	0	3	2	366	6	6
2101104	-1848239574	3	-11,1	3	0	2	2	366	14	6

A partir da análise das três poses resultantes para cada ligante, verificou-se que em todas as etapas do SBVS a energia mínima de ligação foi a mesma para cada composto (exceto ZINC0630250, que apresentou energia de ligação de -11,1 Kcal.mol⁻¹ na primeira etapa do SBVS). O composto ZINC0138791 apresentou a menor energia de ligação (-11,4 Kcal.mol⁻¹), seguido por ZINC0630250 (-11,3 Kcal.mol⁻¹), ZINC4000106 (-11,2 Kcal.mol⁻¹), ZINC0519122, ZINC4090657 e ZINC2101104 (estes últimos com -11,1 Kcal.mol⁻¹). Estes ligantes mostraram potencial aptidão farmacodinâmica contra o alvo Rab10, visto que apresentaram *scores* menores que GDP (-10,6 Kcal.mol⁻¹) e próximos ao GTP (-11,5 Kcal.mol⁻¹).

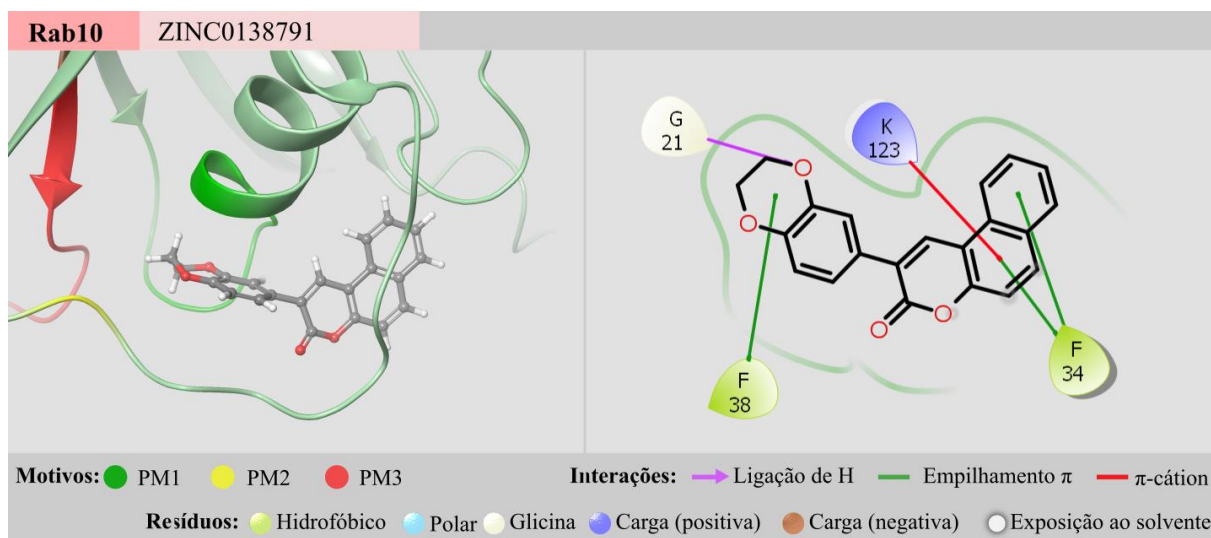
4.4. Análise das interações intermoleculares

Esta seção contém os resultados obtidos na interação proteína-ligante e as ilustrações bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) das melhores poses de cada ligante.

4.4.1. ZINC0138791

O grupo benzodioxina de ZINC0138791 forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo G21 e um empilhamento π com F38, enquanto o grupo benzocumarínico é responsável pela formação de uma ligação π -cátion com K123 e duas interações de empilhamento π com F34. Em relação aos motivos PMs da Rab10, o composto ZINC0138791 interage somente com PM1, não interagindo com os outros motivos PMs. Isso indica que este ligante acoplou no mesmo bolsão de ligação de GDP, um nucleotídeo responsável pela inativação da Rab10. A figura 15 mostra a representação 2D e 3D das interações intermoleculares resultantes do complexo Rab10_ZINC0138791.

Figura 15. Complexo da Rab10 com ZINC0138791. À esquerda, a imagem 3D representa a localização do ligante em relação aos motivos PMs da Rab10; à direita, a imagem 2D ilustra as interações intermoleculares envolvidas na interação proteína-ligante. Os motivos PMs, as interações intermoleculares e as propriedades dos resíduos de aminoácidos estão representadas conforme a legenda da imagem.

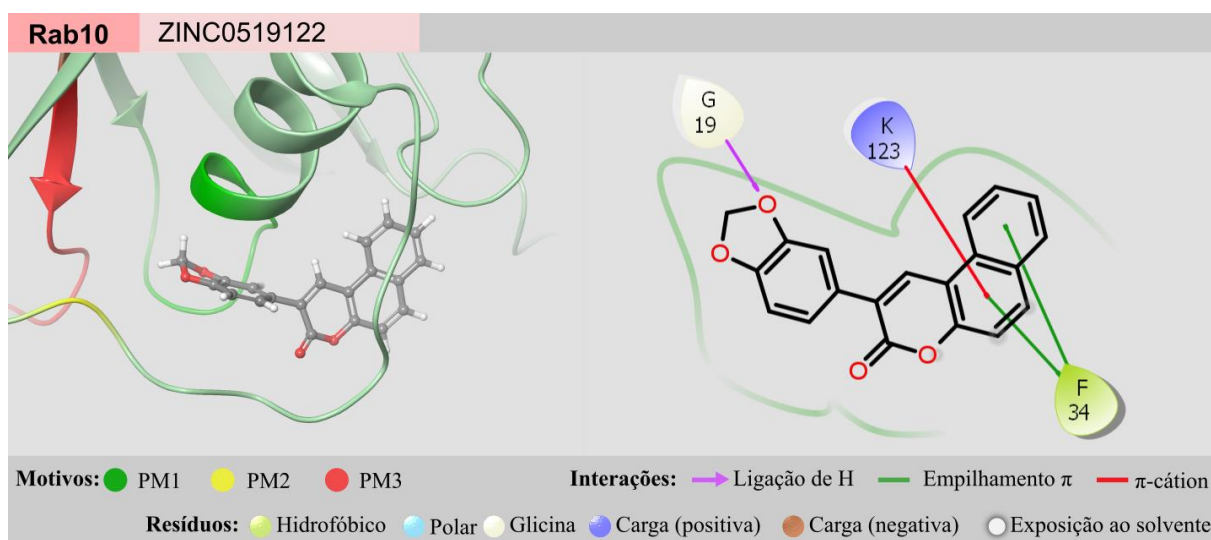


Fonte. O autor (2022).

4.4.2. ZINC0519122

O grupo benzodioxol de ZINC0519122 participa de uma ligação de hidrogênio com o resíduo G19, enquanto o grupo benzocumarínico faz uma ligação π -cátion com K123 e duas interações de empilhamento π com F34. A figura 16 mostra que esse ligante não interage com os motivos PM2 e PM3 da Rab10, demonstrando o potencial de inativar tal enzima devido a sua localização no bolsão de ligação do nucleotídeo GDP.

Figura 16. Complexo da Rab10 com ZINC0519122. À esquerda, a imagem tridimensional representa a localização do ligante em relação aos motivos PMs da Rab10; à direita, a imagem bidimensional demonstra as interações intermoleculares envolvidas na interação proteína-ligante. Os motivos PMs, as interações intermoleculares e as propriedades dos resíduos de aminoácidos estão representadas conforme a legenda da imagem.



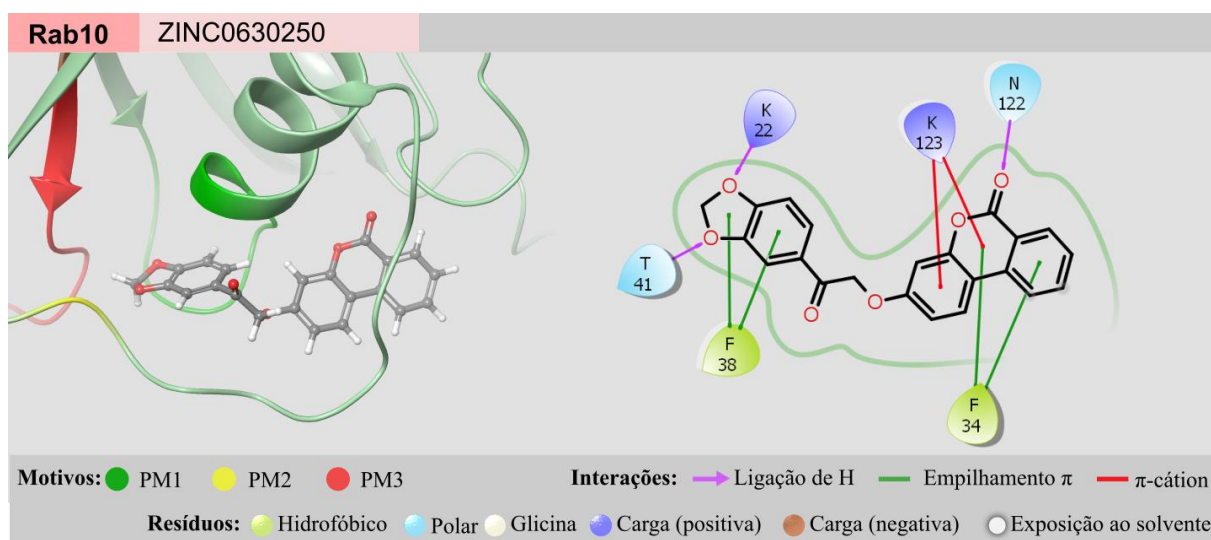
Fonte. O autor (2022).

4.4.3. ZINC0630250

O grupo benzodioxol de ZINC0630250 é responsável pela formação de duas ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos K22 e T41. Além disso, esse grupo também forma duas interações de empilhamento π com F38. Já o grupo de benzocumarina forma uma ligação de hidrogênio com N122, duas interações de empilhamento π com F34 e duas interações π -cátion com K123. Entretanto, devido ao tamanho de ZINC0630250 (de 374,34 Da), o grupo benzodioxol além de interagir com o motivo PM1, interage com PM2 da Rab10. Tal interação pode propiciar menores

chances do alvo biológico encontrar-se na conformação inativa, devido a presença de uma ligação estabilizadora com um motivo de ligação notado em GTP quando associado a esta enzima (figura 17).

Figura 17. Complexo da Rab10 com ZINC0630250. À esquerda, a imagem tridimensional representa a localização do ligante em relação aos motivos PMs da Rab10; à direita, a imagem bidimensional demonstra as interações intermoleculares envolvidas no complexo proteína ligante. Os motivos PMs, as interações intermoleculares e as propriedades dos resíduos de aminoácidos estão representadas conforme a legenda da imagem.

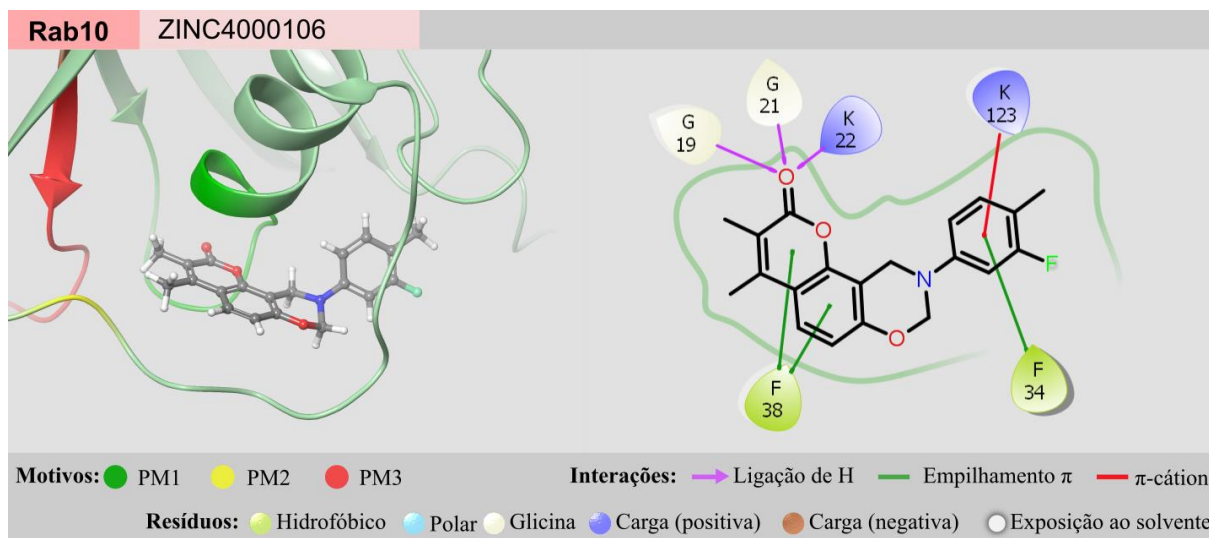


Fonte. O autor (2022).

4.4.4. ZINC4000106

Em contrapartida com as poses obtidas para outros ligantes, o grupo cumarínico de ZINC4000106 forma três ligações de hidrogênio com os resíduos do motivo PM1, sendo G19, G21 e K22, respectivamente. Ademais, duas interações de empilhamento π com F38 são formadas, conforme mostrado na figura 18. Em relação ao grupo 1-fluor-2-metilbenzeno, há a existência de uma interação π -cátion com K123 e uma interação de empilhamento π com F34. Desse modo, o composto ZINC4000106 interage somente com o motivo PM1 da Rab10, mostrando assim, o potencial de inativar a enzima.

Figura 18. Complexo da Rab10 com ZINC4000106. À esquerda, a imagem tridimensional representa a localização do ligante em relação aos motivos PMs da Rab10; à direita, a imagem bidimensional demonstra as interações intermoleculares envolvidas no complexo proteína ligante. Os motivos PMs, as interações intermoleculares e as propriedades dos resíduos de aminoácidos estão representadas conforme a legenda da imagem.

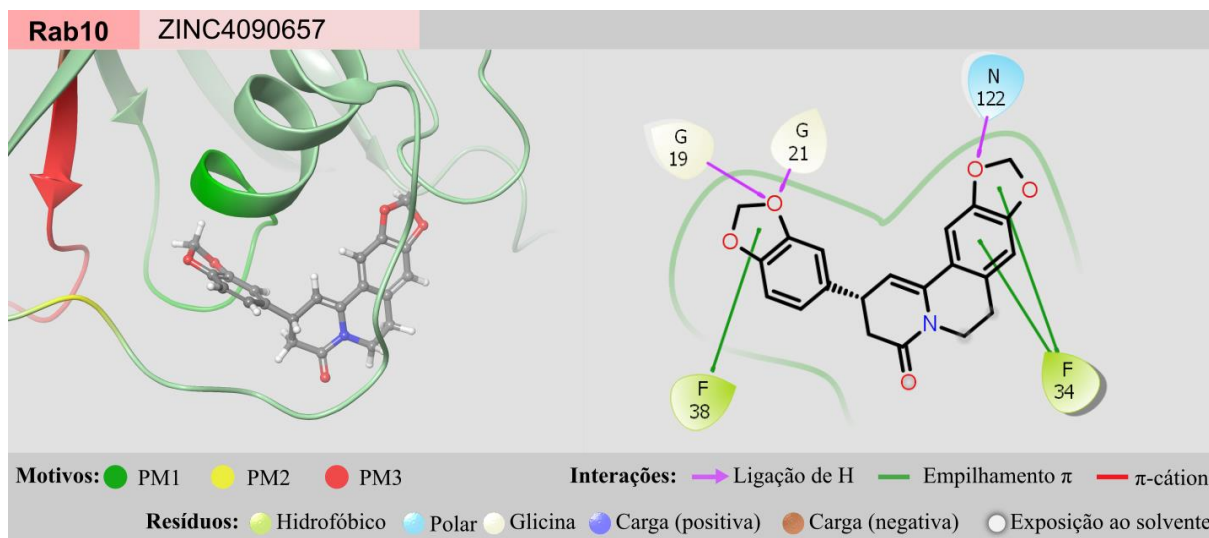


Fonte: O autor (2022).

4.4.5. ZINC4090657

No ligante ZINC4090657 existe a presença de dois grupos químicos de benzodioxol. Conforme mostrado na figura 19, um grupo benzodioxol é responsável pela formação de duas ligações de hidrogênio com os resíduos G19 e G21, bem como uma interação de empilhamento π com F38. Já o outro grupo benzodioxol forma uma ligação de hidrogênio com N122 e duas interações de empilhamento π com F34. Nesta pose, o grupo quinolizidínico não participa de interações como ligações de hidrogênio, pontes salinas, empilhamento π ou π -cátion. O composto ZINC4090657 interage somente com o motivo PM1, apresentando assim o potencial de favorecer a conformação inativa da Rab10.

Figura 19. Complexo da Rab10 com ZINC4090657. À esquerda, a imagem tridimensional representa a localização do ligante em relação aos motivos PMs da Rab10; à direita, a imagem bidimensional demonstra as interações intermoleculares envolvidas no complexo proteína ligante. Os motivos PMs, as interações intermoleculares e as propriedades dos resíduos de aminoácidos estão representadas conforme a legenda da imagem.

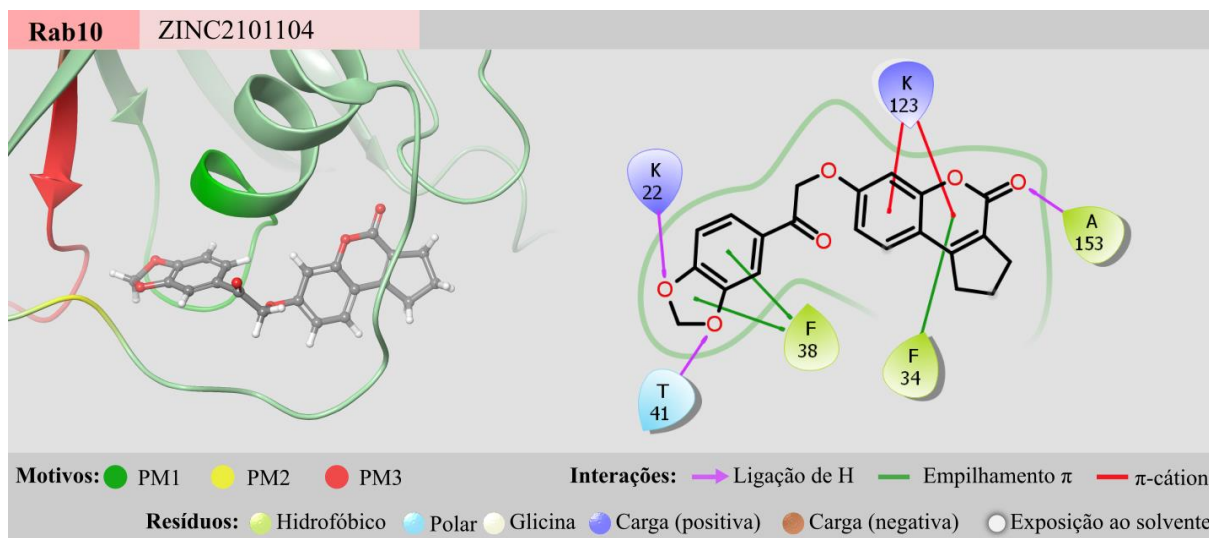


Fonte. O autor (2022).

4.4.6. ZINC2101104

O grupo benzodioxol do ligante ZINC2101104 é responsável pela formação de duas ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos K22 e T41, e forma duas interações de empilhamento π com F38. Além disso, o grupo derivado de cumarina de ZINC2101104 forma uma ligação de empilhamento π com F34, de hidrogênio com A153 e duas interações π -cátion com K123. Tal composto interage com os motivos PM1 e PM2 da Rab10 (figura 20). A interação com o motivo PM2 pode favorecer a conformação ativa da Rab10, visto que se trata de um resíduo de aminoácido (T41) que se liga ao γ -fosfato do nucleotídeo GTP.

Figura 20. Complexo da Rab10 com ZINC2101104. À esquerda, a imagem tridimensional representa a localização do ligante em relação aos motivos PMs da Rab10; à direita, a imagem bidimensional demonstra as interações intermoleculares envolvidas no complexo proteína ligante. Os motivos PMs, as interações intermoleculares e as propriedades dos resíduos de aminoácidos estão representadas conforme a legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

De acordo com as interações apresentadas, os compostos ZINC0138791, ZINC0519122, ZINC4000106, ZINC4090657 possuem o potencial de inativar a Rab10, visto que participaram de interações com o motivo PM1 dessa enzima. Embora ZINC0630250 e ZINC2101104 também participem de interações com PM1, tais compostos interagem com o motivo PM2, o qual possui uma treonina que favorece a indução da conformação ativa da Rab10. Entretanto, nenhum composto testado interagiu com o motivo PM3 da enzima.

4.5. Resultados das simulações de dinâmica molecular

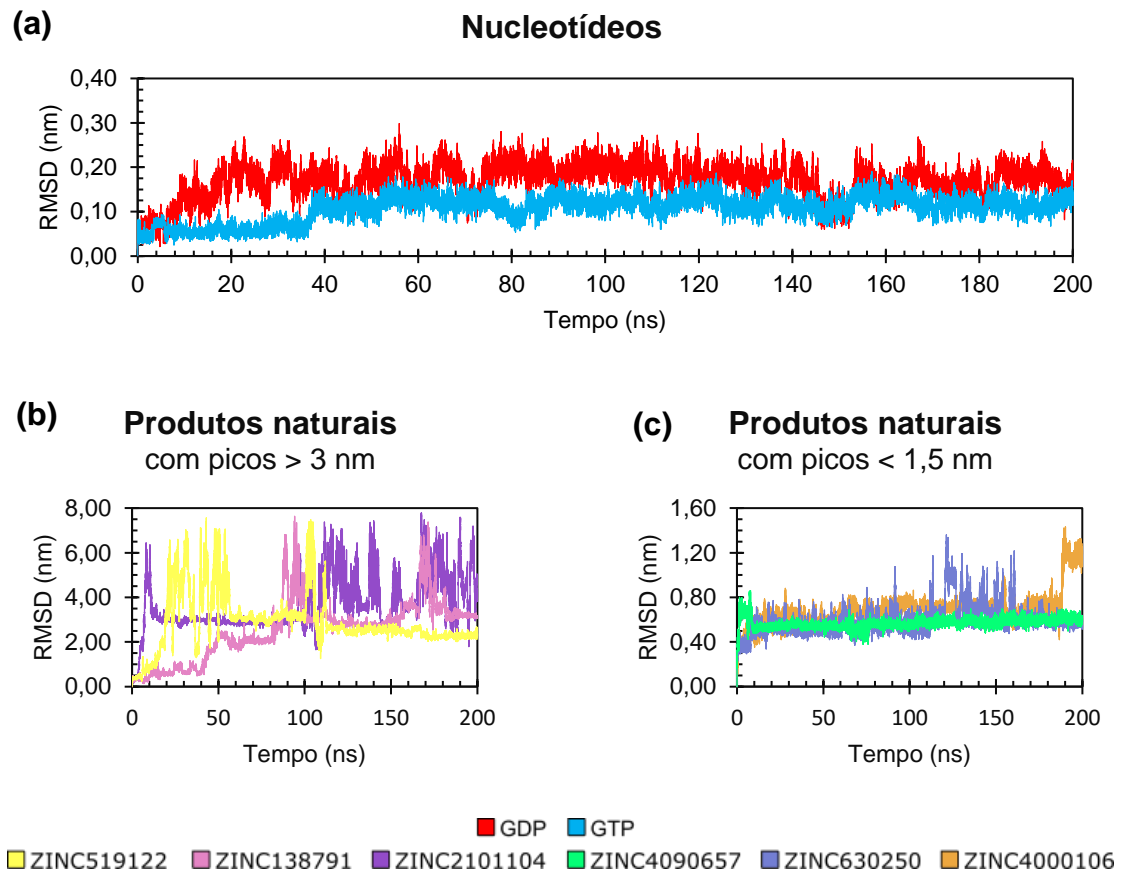
Os melhores complexos resultantes do *docking* molecular foram submetidos a simulações de 200 ns de DM. As trajetórias das simulações foram analisadas com RMSD, RMSF, R_g , SASA, ligações de hidrogênio, *B-factor*, DSSP e MM/PBSA. Além disso, analisou-se o RMSD e o R_g local das regiões *switch1*, *interswitch* e *switch2* separadamente, pois segundo SARGSYAN, GRAUFFEL e LIM (2017), quando essas ferramentas são usadas para comparar toda a extensão de uma biomolécula, pode não ser possível distinguir as regiões locais que são mais flexíveis. Sendo assim, uma

alternativa para análise dessas regiões seria selecionar os átomos envolvidos para o cálculo do RMSD e R_g local.

Ao analisar os nucleotídeos, observou-se que GDP e GTP mostraram valores de RMSD inferiores a 0,30 nm (figura 21a). A trajetória de ambos sistemas alcançou a estabilização a partir dos 40 ns de simulação, onde os nucleotídeos GDP e GTP estabilizaram-se aproximadamente em 0,17 nm e 0,11 nm, respectivamente. Isto indica que a posição destes nucleotídeos no sítio de ligação não está sujeita a muitas variações ao longo do tempo simulado. O nucleotídeo GTP apresentou menores valores de RMSD em relação à GDP, sugerindo que GTP possui um modo de ligação mais preservado. Tal resultado era esperado pois, com base na análise das poses provenientes do estudo de *docking*, a presença do grupo γ -fosfato em GTP permite a ligação com todos os motivos PMs da Rab10, fazendo com que este ligante tenha movimentos mais restritivos em relação a GDP.

Entretanto, os valores de RMSD computados para os produtos naturais mostraram um comportamento diferente dos valores encontrados para os nucleotídeos. Nas simulações, todos os produtos naturais mostraram picos de RMSD superiores à 0,4 nm, indicando que suas poses não são preservadas na cavidade proteica. Os compostos ZINC0138791, ZINC0519122 e ZINC02101104 apresentaram picos de RMSD superiores a 3 nm (figura 21b). Por outro lado, ZINC0630250, ZINC4000106 e ZINC4090657 obtiveram picos de RMSD inferiores à 1,5 nm (figura 21c). A trajetória de ZINC4090657 sugere que este composto possui modo de ligação mais preservado em relação aos demais, pois a trajetória alcançou a estabilidade próximo ao tempo de 10 ns, mantendo-se estável até o final da simulação.

Figura 21. RMSD dos ligantes. (a) trajetória dos nucleotídeos GDP e GTP; (b) trajetória dos produtos naturais que mostraram picos de RMSD superiores a 3 nm; (c) trajetória dos produtos naturais com picos de RMSD inferiores a 1,5 nm. Os compostos testados estão representados pelas cores indicadas na legenda da imagem.



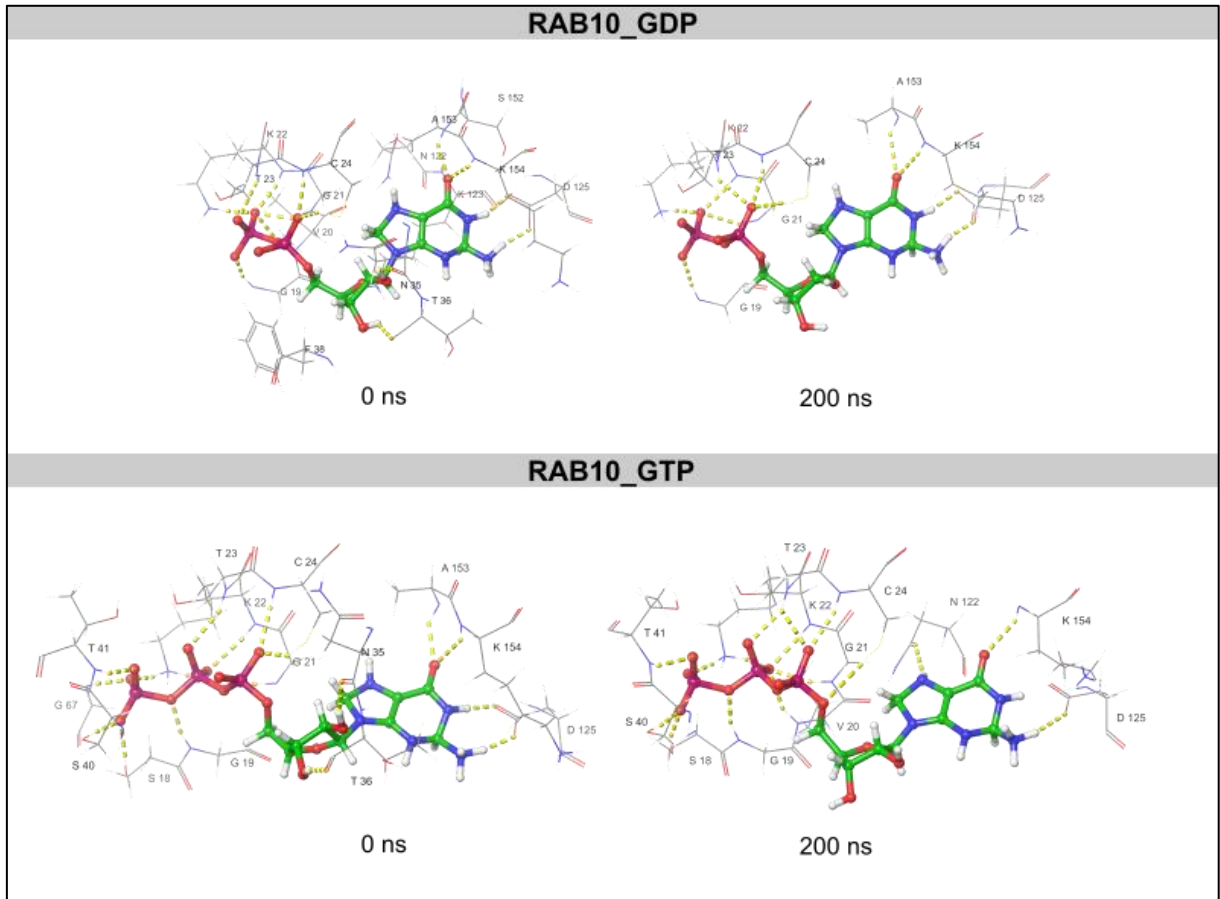
Fonte: O autor (2022).

Embora os resultados obtidos nas simulações de *docking* molecular mostraram boa afinidade predita para estes compostos, para inibir a Rab10 é preciso que um composto se mantenha acoplado ao alvo biológico por tempo suficiente para que uma possível resposta terapêutica seja gerada. Caso contrário, a função da enzima pode ser reativada com a dissociação do inibidor. Devido a isso, foi necessário analisar os *frames* das trajetórias para investigar o comportamento dos nucleotídeos e de cada um dos produtos naturais na cavidade da Rab10.

A figura 22 mostra a pose inicial ($t = 0$ ns) e final ($t = 200$ ns) dos nucleotídeos acoplados na Rab10. Tanto GDP quanto GTP mostraram modos de ligação preservados. Pelas observações das poses iniciais e finais dos nucleotídeos, GDP manteve-se acoplado na Rab10 participando de ligações de hidrogênio com os

resíduos G19, G21, K22, T23, C24, D125, A153 e K154; no caso de GTP as ligações de hidrogênio são mantidas com T41, S40, S18, G19, T23, K22, G21, C24, D125 e K154.

Figura 22. Pose inicial e final dos nucleotídeos acoplados na Rab10.

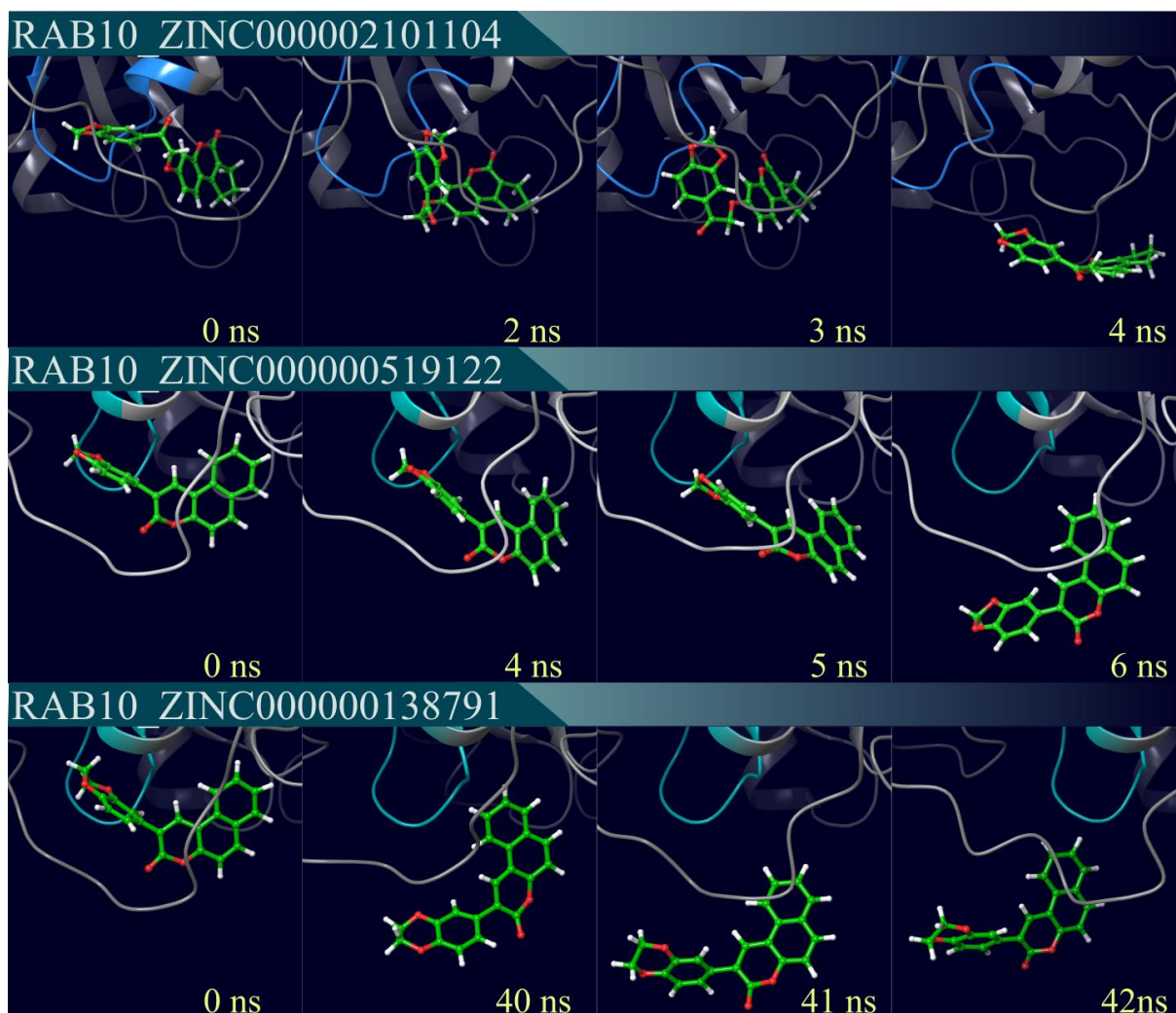


Fonte. O autor (2022).

Ao analisar os *frames* visando momentos das trajetórias de cada um dos produtos naturais, observou-se que os ligantes ZINC0138791, ZINC0519122 e ZINC2101104 desacoplaram-se do sítio ativo da Rab10 em aproximadamente 40, 6 e 4 ns, respectivamente. O processo de dissociação destes ligantes pode ser visualizado na figura 23. A saída desses compostos pode ocorrer devido à perda de contato envolvendo o motivo PM1 da Rab10, fazendo com que todas essas estruturas sejam expelidas do sítio ativo dessa enzima. O composto ZINC2101104 é expelido rapidamente do bolsão de ligação da Rab10 (~ 4 ns) enquanto a dissociação de ZINC0138791 ocorre em um tempo relativamente maior (~ 40 ns). Portanto, apesar desses ligantes terem sido selecionados pelo protocolo de SBVS devido a

características favoráveis, pela análise das simulações de DM esses compostos não mostraram boa aptidão farmacodinâmica na interação proteína-ligante.

Figura 23. Processo de dissociação dos compostos ZINC0138791, ZINC0519122 e ZINC2101104 do sítio ativo da Rab10. O alvo biológico está representado pela cor cinza no formato *cartoon*, onde é possível visualizar o motivo PM1 destacado em azul. Os ligantes possuem átomos de carbono customizados pela cor verde e estão representados em formato *ball-and-stick*.

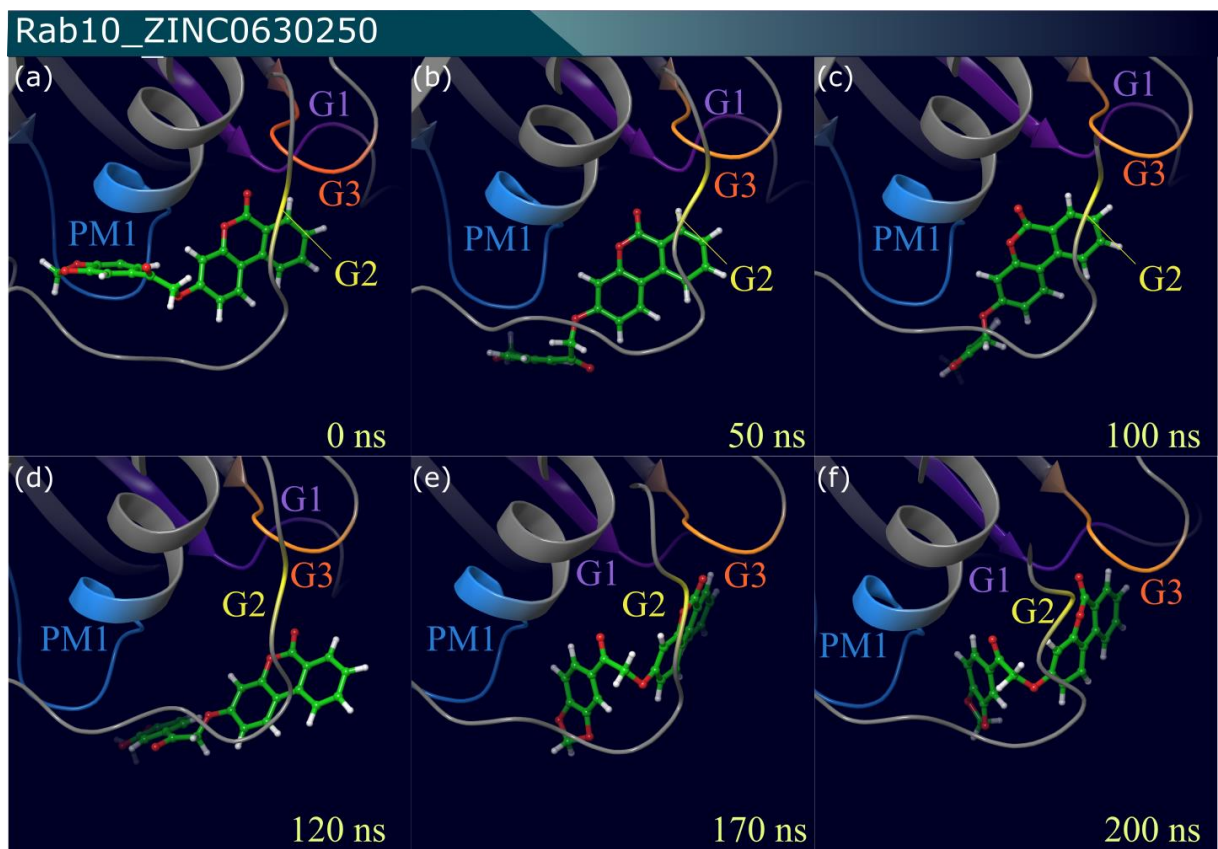


Fonte. O autor (2022).

Em relação aos *frames* obtidos para os ligantes ZINC0630250, ZINC4000106 e ZINC4090657 acoplados na Rab10, observou-se que esses compostos se mantiveram associados no sítio ativo do alvo até o término das simulações. Entretanto, a pose obtida nos estudos de *docking* molecular para cada ligante não foi preservada ao longo do tempo simulado.

A figura 24 mostra os *frames* obtidos para ZINC0630250 em momentos da sua trajetória. No intervalo de 0 a 50 ns, o grupo benzodioxol deste ligante reorientou-se no sítio ativo da enzima, estando mais exposto ao solvente do que em contato com o motivo PM1 (figura 24a-b). O grupo benzocumarínico de ZINC0630250 mostrou movimentos relativamente mais preservados nos motivos Gs até aproximadamente 120 ns (figura 24a-d). Entretanto, no intervalo de 120 a 170 ns ele é realocado nos motivos Gs, assumindo uma nova configuração (figura 24d-e). A reorientação do grupo benzocumarínico favorece o contato do grupo benzodioxol com o motivo PM1, fazendo com que a nova conformação do ligante se mantenha estável até o final da simulação (figura 24f).

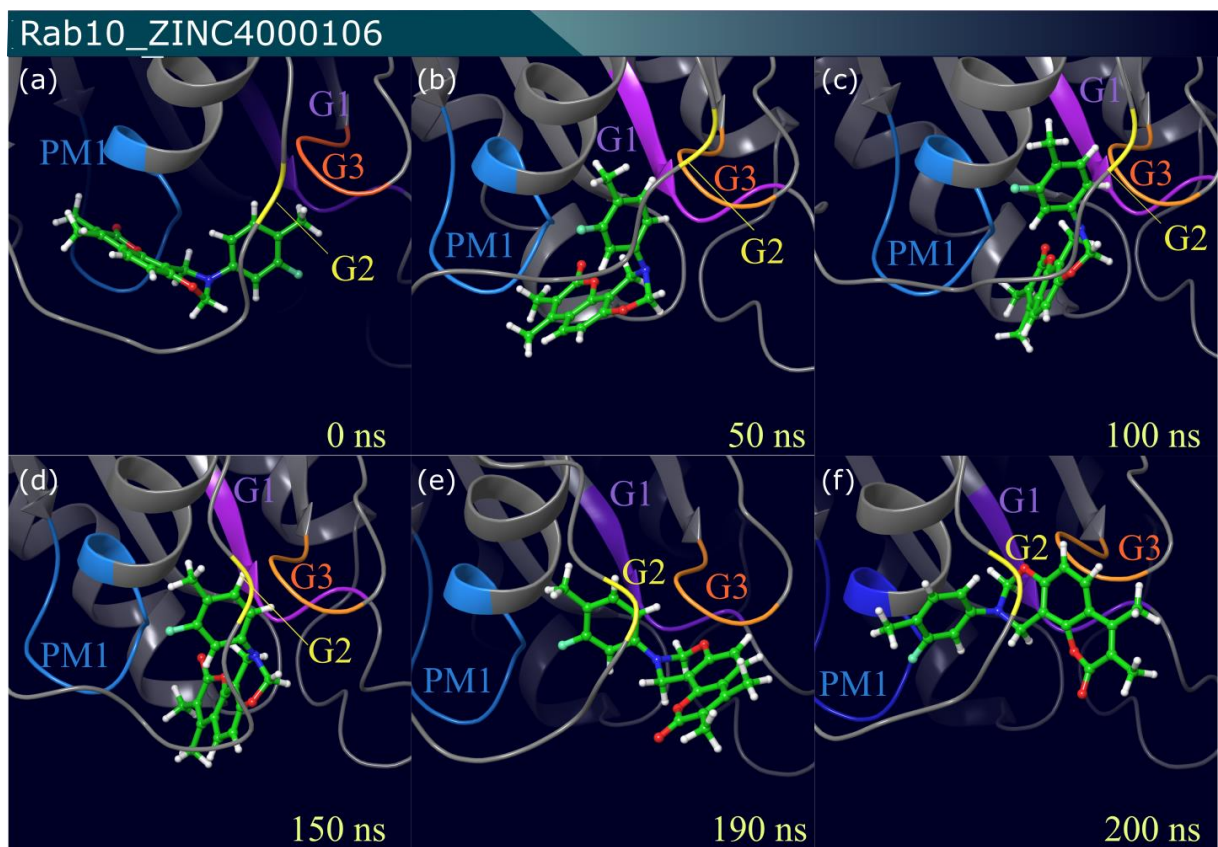
Figura 24. *Frames* do sistema Rab10_ZINC0630250 nos tempos de (a) 0 ns, (b) 50 ns, (c) 100 ns, (d) 120 ns, (e) 170 ns e (f) 200 ns. O alvo biológico está representado pela cor cinza no formato *cartoon*, onde é possível visualizar o motivo PM1 destacado em azul e os motivos G1, G2 e G3 pelas cores roxo, amarelo e laranja, respectivamente. O ligante possui átomos de carbono customizados pela cor verde e estão representados em formato *ball-and-stick*.



Fonte. O autor (2022).

Ao analisar as poses obtidas para o composto ZINC4000106, observou-se que nos primeiros 50 ns o seu grupo cumarínico deixa de manter contato com os resíduos do motivo PM1 da Rab10 (figura 25a-b). Com isso, o ligante assume uma nova conformação onde o seu grupo derivado de cumarina é mais exposto ao solvente. A reorientação deste grupo químico induz o grupo 1-fluor-2-metilbenzeno a realocar-se nos motivos Gs da enzima, o qual permanece estável até aproximadamente 190 ns (figura 25b-e). Após isto, o grupo derivado de cumarina desloca-se, aproximando com os motivos Gs, enquanto o grupo 1-fluor-2-metilbenzeno é realocado próximo ao motivo PM1 (figura 25e-f). Isto demonstra que grupos derivados de cumarina podem apresentar maior afinidade com os motivos Gs.

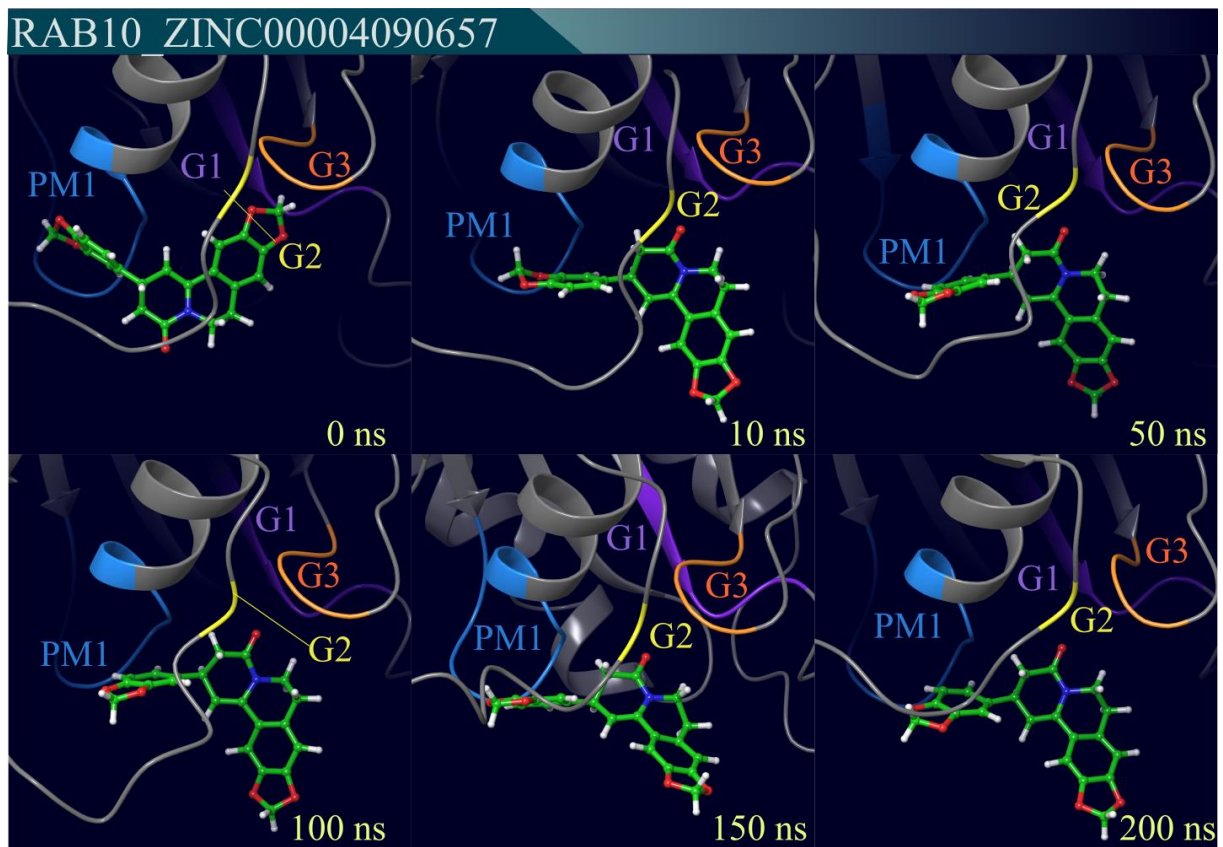
Figura 25. Frames do sistema Rab10_ZINC4000106 nos tempos de (a) 0 ns, (b) 50 ns, (c) 100 ns, (d) 150 ns, (e) 190 ns e (f) 200 ns. O alvo biológico está representado pela cor cinza no formato *cartoon*, onde é possível visualizar o motivo PM1 destacado em azul e os motivos G1, G2 e G3 pelas cores roxo, amarelo e laranja, respectivamente. O ligante possui átomos de carbono customizados pela cor verde e estão representados em formato *ball-and-stick*.



Fonte. O autor (2022).

Em relação ao composto ZINC4090657, o seu grupo quinolizidínico rapidamente realoca-se nos motivos Gs, assumindo uma nova conformação que interage somente com o motivo G2 da Rab10 (figura 26a-b). A partir de aproximadamente 10 ns, a conformação resultante apresenta movimentos estáveis ao longo da simulação (figura 26b-f). Além disso, em todos os *frames* analisados, o motivo PM1 da Rab10 mantém contato com o grupo benzodioxol de ZINC4090657, deixando-o com movimentos mais restritivos e, conseqüentemente, modos de ligação mais preservados (figura 26a-f).

Figura 26. *Frames* do sistema Rab10_ ZINC4090657 nos tempos de (a) 0 ns, (b) 10 ns, (c) 50 ns, (d) 100 ns, (e) 150 ns e (f) 200 ns. O alvo biológico está representado pela cor cinza no formato *cartoon*, onde é possível visualizar o motivo PM1 destacado em azul e os motivos G1, G2 e G3 pelas cores roxo, amarelo e laranja, respectivamente. O ligante possui átomos de carbono customizados pela cor verde e estão representados em formato *ball-and-stick*.

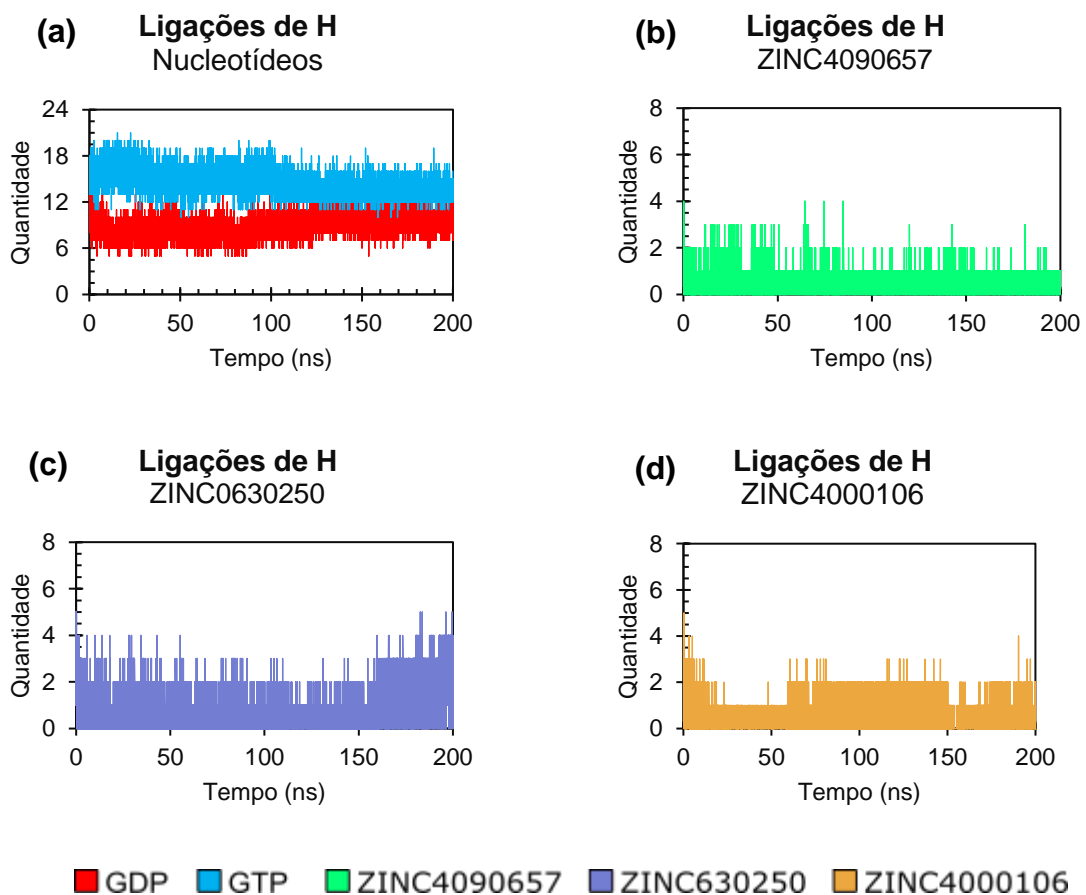


Fonte. O autor (2022).

A fim de investigar a evolução de todos os átomos da Rab10 em interação com os nucleotídeos e os produtos naturais que se mantiveram acoplados no alvo, analisou-se as ligações de hidrogênio detectadas no decorrer da simulação. Desse

modo, foi possível observar que o nucleotídeo GTP estabiliza-se no sítio de ligação realizando aproximadamente 16 ligações de hidrogênio, enquanto GDP estabiliza-se com cerca de 8 (figura 27a). Tal resultado era esperado visto que GTP possui um grupo γ -fosfato em sua composição química e, portanto, maior propensão para a formação de ligações de hidrogênio quando em interação com a Rab10. Quanto aos produtos naturais, ZINC4090657, ZINC0630250 e ZINC4000106 mostraram propensão para formar aproximadamente 1 ligação de hidrogênio (figura 27b-d). Entretanto, ZINC0630250 apresentou picos mais acentuados em relação a ZINC4090657 e ZINC4000106, mostrando propensão a maiores formações de ligações de hidrogênio ao longo da simulação (figura 27c). Isto pode estar associado a maior quantidade de aceptores de hidrogênio na composição química desse ligante, a qual contém 6 átomos de oxigênio aceptores.

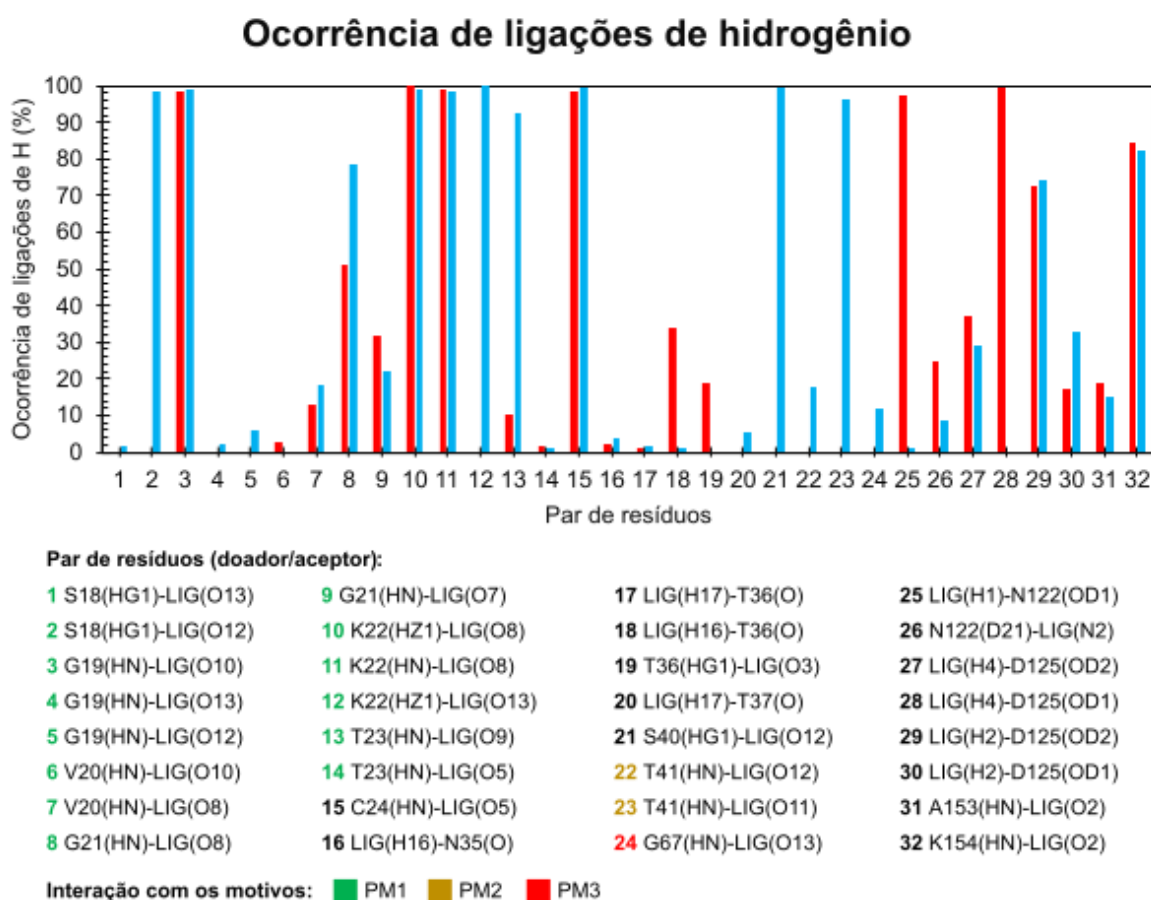
Figura 27. Representação das ligações de hidrogênio existentes no complexos resultantes. (a) trajetória dos nucleotídeos GDP e GTP; (b) trajetória de ZINC4090657; (c) trajetória de ZINC0630250; e (d) trajetória de ZINC4000106. Os compostos testados estão representados pelas cores indicadas na legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

Com o propósito de obter o percentual da ocorrência das ligações de hidrogênio existentes nos complexos resultantes, averiguou-se o quanto cada par de resíduos (grupos aceptores e doadores) permaneceu em interação durante a simulação. Um percentual próximo de 0% indica a inexistência de ocorrência de ligações de hidrogênio, enquanto próximo de 100% significa que os resíduos estiveram interagindo o tempo todo (SOARES, 2009). A figura 28 mostra a porcentagem de ocorrência de ligações de hidrogênio existentes para os sistemas controles. Nesta figura, é possível observar que esses sistemas se diferenciam tanto em relação ao número de pares que participam de ligações de hidrogênio, quanto aos valores de ocorrência. O sistema Rab10_GTP apresentou relativamente maiores números de pares que participam de ligações de hidrogênio e maior intensidade de ocorrência destas ligações. Aqui, pares (de 1 a 14) foram formados pela interação dos nucleotídeos GDP e GTP com o motivo PM1 da Rab10. Entretanto, apenas GTP consegue formar interações com os motivos PM2 e PM3 devido ao seu grupo γ -fosfato (pares 22 a 24). O resíduo T41 do motivo PM2, é um resíduo de aminoácido que quando interage com GTP induz mudanças conformacionais na Rab10, ativando-a. Nesta análise é possível visualizar que o par 23 (referente a T41) possui um pico que representa 96,2% de ocorrência de ligações de hidrogênio. Curiosamente, os resíduos S18 (motivo PM1) e S40 (vizinho de PM2) também aparentam ter um papel na indução da conformação ativa, pois ambos mostraram valores acima de 99,5% de ocorrência de ligações de hidrogênio quando a Rab10 estava associada a GTP (par 2 e 21, respectivamente). Esperava-se que ambos os nucleotídeos formassem ligações de hidrogênio com o resíduo S18 (par 2), pois tanto GDP quanto GTP interagem com o motivo PM1. No entanto, apenas GTP interagiu com S18. De acordo com CHERFILS e ZEGHOUF (2013), T41 é o principal resíduo de *switch1* que se liga ao γ -fosfato de GTP. Mas pelas observações da análise do percentual de ocorrência de ligações de hidrogênio, tanto S40 (da região *switch1*) quanto S18 (do motivo PM1) também aparentam exercer um papel na indução da forma ativa da Rab10. Em contrapartida, a maior ocorrência de interação de hidrogênio envolvendo os resíduos N122 (par 25) e D125 (par 28) parece favorecer a indução da conformação inativa dessa enzima.

Figura 28. Porcentagem de ocorrência de ligações de hidrogênio pelos pares correspondentes durante o tempo total de simulação (200 ns). As barras vermelhas representam os valores referentes ao sistema Rab10_GDP, enquanto as barras azuis representam o sistema Rab10_GTP. A descrição dos pares de aminoácidos apresentados no gráfico (número de 1 a 32 na abscissa) se encontram abaixo da figura, onde os resíduos de aminoácidos estão abreviados por códigos de uma única letra e as letras/números que precedem a abreviação dos resíduos correspondem aos tipos de átomos e seus posicionamentos, respectivamente. Os motivos PMs da sequência primária da Rab10 estão representados conforme as cores indicadas na legenda da imagem.



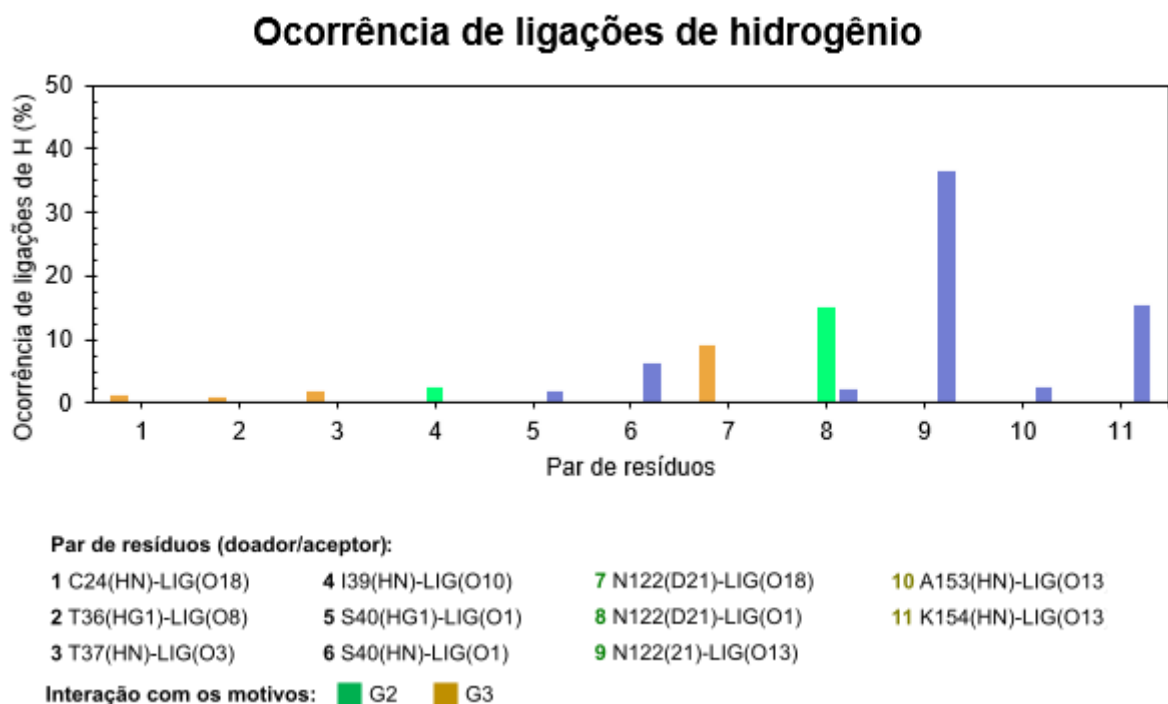
Fonte. O autor (2022).

Ao analisar o percentual de ocorrências das ligações de hidrogênio envolvidas na interação da Rab10 com os produtos naturais, observou-se que nenhum composto formou ligações de hidrogênio com os motivos PMs (figura 29). Entretanto, embora em menor intensidade, todos os produtos naturais testados mostraram ocorrência de ligações de hidrogênio com resíduos próximos ao motivo PM2. Além disso, ZINC4000106 interagiu com um resíduo vizinho do motivo PM1. Por exemplo, esse ligante formou ligações de hidrogênio com os resíduos C24 (próximo a PM1), T36 e T37 (ambos próximos a PM2). No entanto, o percentual de ocupação destas

interações de hidrogênio não foi significativo, mostrando valores inferiores a 2% (par 1 a 3). Isto indica que a formação de ligações de hidrogênio na interação de ZINC4000106 com esses resíduos pode ser esporádica. O composto ZINC0630250 foi o que mostrou maior quantidade de pares que participam de ligações de hidrogênio e maiores valores de ocorrência. O par 9 (referente a N122) mostrou um pico que representa 36,5% de ocorrência de ligações de hidrogênio, seguido pelo par 11 (referente a K154) com 15,5%. Já o composto ZINC4090657 foi capaz de formar dois pares de ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos I39 (par 4) e N122 (par 8), onde o par 8 foi responsável pela maior ocorrência de interações (de 15%). Pela análise desses resultados, o grupo cumarínico de ZINC0630250 e ZINC4000106, assim como o grupo quinolizidínico de ZINC4090657, são relativamente mais propensos a formação de ligações de hidrogênio com o motivo G2 da Rab10. Ademais, o grupo derivado de cumarina de ZINC0630250 também mostra propensão para a formação dessas interações com o motivo G3.

Dentre os três produtos naturais analisados, apenas ZINC0630250 participa de interações de hidrogênio envolvendo o resíduo S40, um resíduo que aparentemente pode induzir a conformação ativa da Rab10 pelas observações do sistema Rab10_GTP (figura 28). Entretanto, esta interação é esporádica ao longo da simulação, possuindo ocorrência de ligações de hidrogênio inferiores a 10% (par 5 e 6) e provavelmente está associada ao processo de reorientação desse ligante no sítio da enzima (figura 24). Por outro lado, os três compostos analisados mostraram maior ocorrência de ligação de hidrogênio com o resíduo N122 (par 7 a 9), um resíduo que pode ser importante na indução da conformação inativa da Rab10 pelas observações do sistema Rab10_GDP.

Figura 29. Porcentagem de ocorrência de ligações de hidrogênio pelos pares correspondentes durante o tempo total de simulação (200 ns). As barras verdes representam os valores referentes ao sistema Rab10_ZINC4090657, enquanto as barras azuis turquesa e laranja representam os sistemas Rab10_ZINC0630250 e Rab10_ZINC4000106, respectivamente. A descrição dos pares de aminoácidos apresentados no gráfico (número de 1 a 11 na abscissa) se encontram abaixo da figura, onde os resíduos de aminoácidos estão abreviados por códigos de uma única letra e as letras/números que precedem a abreviação dos resíduos correspondem aos tipos de átomos e seus posicionamentos, respectivamente. Os motivos Gs da sequência primária da Rab10 estão representados conforme as cores indicadas na legenda da imagem.



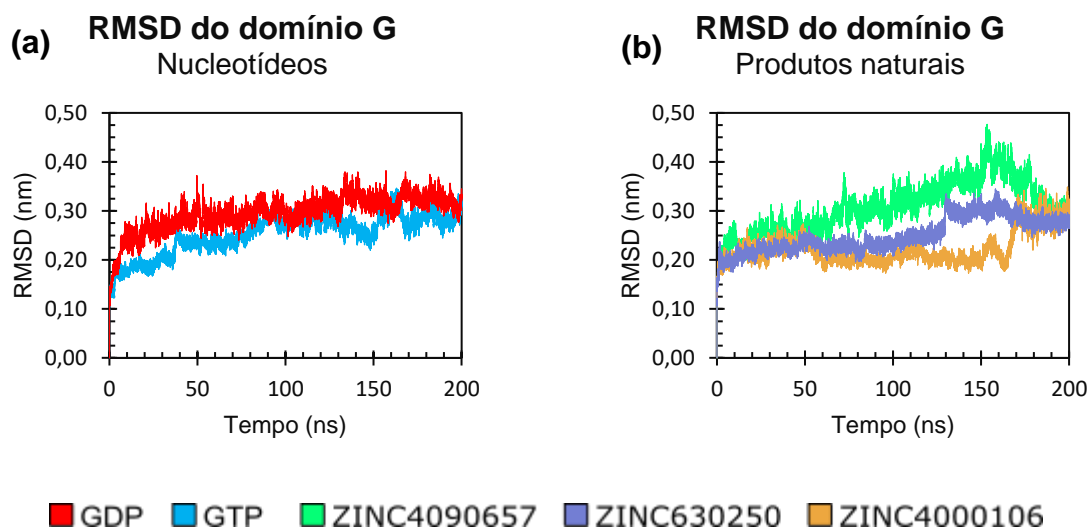
Fonte. O autor (2022).

Para verificar se a Rab10 foi estabilizada no decorrer das simulações, calculou-se o RMSD de cada complexo resultante visando o seu domínio G. Em relação aos sistemas controles, observou-se diferenças sutis nas trajetórias (figura 30a). As trajetórias indicaram que ambos os sistemas alcançaram estabilidade a partir dos 40 ns de simulação, onde o RMSD do *backbone* dos sistemas Rab10_GDP e Rab10_GTP estabilizou-se próximo a 0,30 nm e 0,25 nm, respectivamente. Por meio da análise das trajetórias foi possível observar que o complexo Rab10_GTP possui movimentos mais restritos, pois esse complexo mostrou predominantemente picos mais baixos que Rab10_GDP. Vale ressaltar que não era esperado encontrar

diferenças perceptíveis entre o sistema ativo e inativo por meio do cálculo do RMSD do domínio G. Tal análise foi feita exclusivamente para verificar a estabilidade de ambos os sistemas.

Ao analisar os valores de RMSD computados para os produtos naturais, observou-se que as trajetórias obtidas para cada sistema são relativamente menos estáveis que as trajetórias dos controles (figura 30b). A trajetória do sistema Rab10_ZINC4090657 mostrou um comportamento crescente até os primeiros 150 ns e, depois disso, um comportamento decrescente. Em relação aos outros sistemas, observou-se saltos nos valores de RMSD em momentos de cada trajetória. Isto ocorre em um tempo aproximado de 130 ns para Rab10_ZINC0630250 e 160 ns para Rab10_ZINC4000106. A partir destes tempos, as trajetórias tendem a estabilizarem-se. A trajetória do sistema Rab10_ZINC4090657 mostrou picos mais acentuados, apresentando comportamentos similares aos observados em Rab10_GDP.

Figura 30. RMSD do *backbone* do domínio G da Rab10. (a) trajetórias do domínio G dos sistemas controles; (b) trajetórias do domínio G dos sistemas formados por produtos naturais. Os compostos analisados estão representados pelas cores indicadas na legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

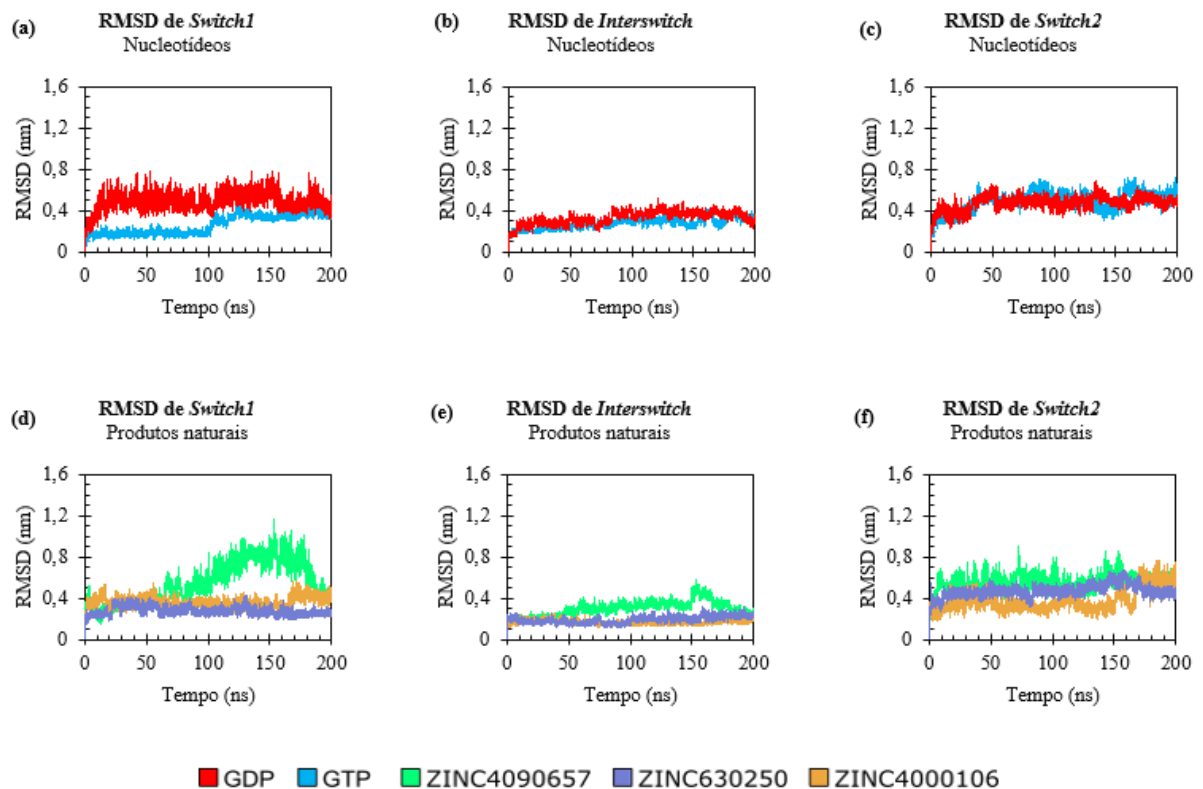
A análise local do RMSD foi necessária para estudar a flexibilidade inerente das regiões *switchs*. A região *interswitch* foi escolhida como controle porque possui menor mobilidade que *switch1* e *switch2*, independentemente do estado ativo e inativo da enzima (PYLYPENKO; HAMMICH; HOUDUSSE, 2018). A figura 31 mostra o RMSD local dessas regiões, onde é possível visualizar diferenças no *backbone*

quando a Rab10 está vinculada a GDP e GTP. Nesses resultados, o RMSD de *switch1* mostrou diferenças perceptíveis quando a Rab10 estava associada a GDP e GTP, pois a flexibilidade dessa região é cerca de duas vezes maior que o sistema Rab10_GTP (figura 31a). Isso pode ser explicado porque a porção fosfato de GDP contém somente α e β -fosfato, fazendo com que *switch1* sofra maior flexibilidade conformacional devido a existência de menores interações intermoleculares envolvendo os motivos PM2 e PM3. Por outro lado, a presença de γ -fosfato em GTP proporciona menor flexibilidade em *switch1* devido a presença de maiores interações estabilizadoras com esses motivos. Ademais, a trajetória do sistema Rab10_GTP mostrou um aumento nos valores de RMSD entre o intervalo de 100 a 130 ns, onde o RMSD estabilizou-se próximo a 0,36 nm a partir dos 130 ns. Esse fato representa um aumento na flexibilidade de *switch1*, a qual estabiliza-se novamente até o final da simulação. Entretanto, a flexibilidade encontrada em *switch1* para Rab10_GDP é maior do que Rab10_GTP.

Conforme esperado, a região *interswitch* mostrou valores de RMSD similares, onde Rab10_GTP e Rab10_GDP estabilizaram-se em 0,27 e 0,33 nm, respectivamente (figura 31b). Entretanto, a região *switch2* não mostrou diferenças de RMSD perceptíveis (figura 31c). Tal resultado pode estar associado a presença de uma α -hélice que é formada pelo segmento de F71-A82, o que pode gerar movimentos mais restritivos com a variação do tempo, pois cada volta sucessiva da α -hélice é mantida por voltas adjacentes por três ou quatro ligações de hidrogênio, o que confere uma significativa estabilidade em relação a outras estruturas secundárias da enzima (MAKHATADZE, 2005).

Em relação aos sistemas da Rab10 associados aos produtos naturais, os valores de RMSD computados para as regiões *switchs* sugerem que ZINC4090657 possui o potencial de aumentar a flexibilidade da região *switch1*, pois o comportamento da trajetória do sistema Rab10_ZINC4090657 assemelhou-se a de Rab10_GDP (figura 31d). No entanto, a flexibilidade da região *switch1* é mais sutil quando a Rab10 interage com ZINC0630250 e ZINC4000106, obtendo resultados similares ao sistema Rab10_GTP. Já em relação às regiões *interswitch* e *switch2*, as trajetórias não mostraram diferenças perceptíveis em relação aos sistemas controles (figuras 31e e 31f).

Figura 31. RMSD do *backbone* das regiões *switchs* da Rab10. (a) trajetórias de *switch1* para os sistemas controles (b) trajetórias de *interswitch* para os sistemas controles; (c) trajetórias de *switch2* para os sistemas controles (d) trajetórias de *switch1* para os sistemas formados por produtos naturais; (e) trajetórias de *interswitch* para os sistemas formados por produtos naturais (f) trajetórias de *switch2* para os sistemas formados por produtos naturais. Os compostos analisados estão representados pelas cores indicadas na legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

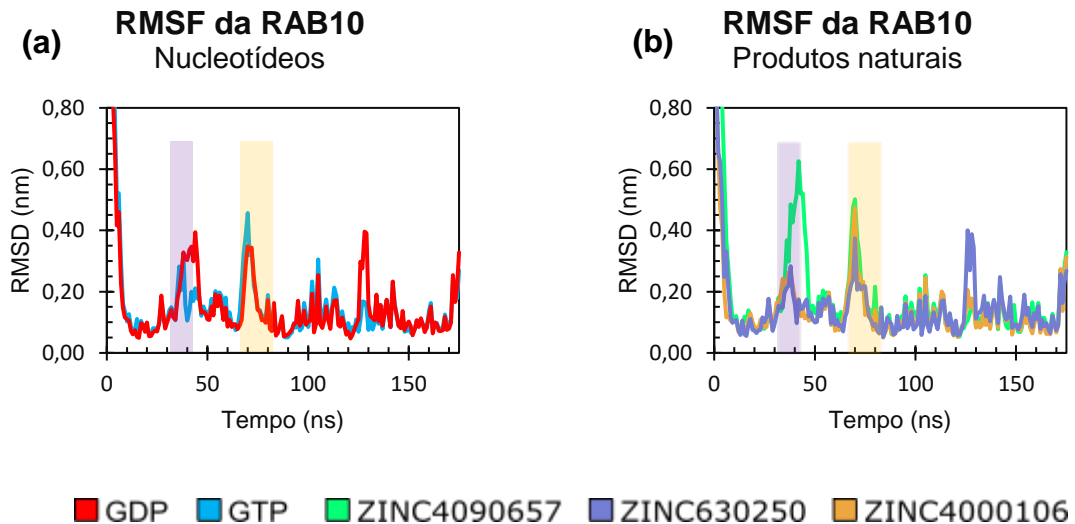
A fim de verificar quais resíduos de aminoácidos contribuem nas flutuações durante as simulações, analisou-se o RMSF de toda a extensão da enzima. Sabe-se que o valor do RMSF é diretamente proporcional à mobilidade dos resíduos de aminoácidos da proteína, ou seja, baixos valores de RMSF indicam baixa mobilidade devido aos movimentos limitados durante a simulação e vice-versa (JUNAID *et al.*, 2014). A figura 32 representa o RMSF dos resíduos de aminoácidos da Rab10, onde é possível analisar as regiões onde ocorrem maiores flutuações. O segmento C-terminal é a região onde ocorrem as maiores flutuações em todos os sistemas. Os resíduos M1, A2, K3, K4, T5, Y6 e D7 mostraram valores de RMSF superiores a 0,2 nm, onde M1 possui os picos mais altos e D7 os mais baixos. Em relação ao N-terminal, os resíduos K173, T174 e P175 mostraram valores de RMSF superiores a 0,15 nm, onde K173 apresenta os picos mais baixos e P175 os mais altos. Entretanto,

a flexibilidade inerente das regiões terminais não afeta os resultados do RMSD global, visto que tal análise foi feita considerando somente o domínio G da enzima.

Além disso, por meio da análise do RMSF também foi possível observar que os resíduos de aminoácidos da região *switch1* mostraram maiores flutuações quando a Rab10 estava interagindo com GDP e menores flutuações quando essa enzima interagia com GTP (figura 32a). O resíduo I42 é responsável pelo maior pico (0,35 nm) nas trajetórias do sistema Rab10_GDP. Em relação a região *switch2*, os valores de RMSF refletiram maiores flutuações quando a Rab10 está associada a GTP, onde o resíduo R70 é responsável pelo maior pico (0,46 nm). Sendo assim, as flutuações observadas em *switch2* não representaram o comportamento biológico da Rab10 visto que esperava-se que *switch2* apresentasse maior flexibilidade no sistema Rab10_GDP. Além disso, as trajetórias do complexo Rab10_GDP também mostraram picos acentuados em uma região de *loop* que conecta duas α -hélices, a qual é composta por resíduos de aminoácidos nas posições 125-130. Tal *loop* fica próximo ao motivo G2 da Rab10 (localizado nas posições 121-124), o qual é responsável pela interação com a base guanina dos nucleotídeos GDP e GTP. Entretanto, ainda não existem evidências experimentais que a flexibilidade acentuada desse *loop* é resultado de alterações conformacionais no processo ativação e inativação da Rab10.

Os valores de RMSF obtidos para os sistemas associados aos produtos naturais mostraram que ZINC4090657 possui o potencial de deixar a região *switch1* mais flexível (figura 32b). Aqui, os resíduos nas posições 31-43 da sequência primária da Rab10 mostraram valores de RMSF superiores a 0,4 nm, onde o resíduo I42 é responsável pelo maior pico (0,63 nm). Esse mesmo comportamento também foi observado nos RMSFs computados para Rab10_GDP, sugerindo que ZINC4090657 pode manter-se acoplado no alvo biológico e, inclusive, contribuir com a indução da forma inativa da enzima. Por outro lado, a região *switch1* mostrou menores valores de RMSF quando os ligantes ZINC0630250 e ZINC4000106 estavam associados ao alvo, assemelhando aos valores encontrados no sistema Rab10_GTP. Vale ressaltar, que ZINC0630250 e ZINC4000106 reposicionaram-se de forma mais lenta na cavidade proteica da Rab10 (figura 24-25). O processo de reorientação desses ligantes provavelmente deixou a região *switch1* com movimentos mais restritivos.

Figura 32. RMSF dos resíduos de aminoácidos da Rab10. A região *switch1* (destacada pelo retângulo lilás) é definida pelas posições 31-43, enquanto *switch2* (destacada pelo retângulo amarelo), pelas posições 66-82. Os compostos analisados estão representados pelas cores indicadas na legenda da imagem.



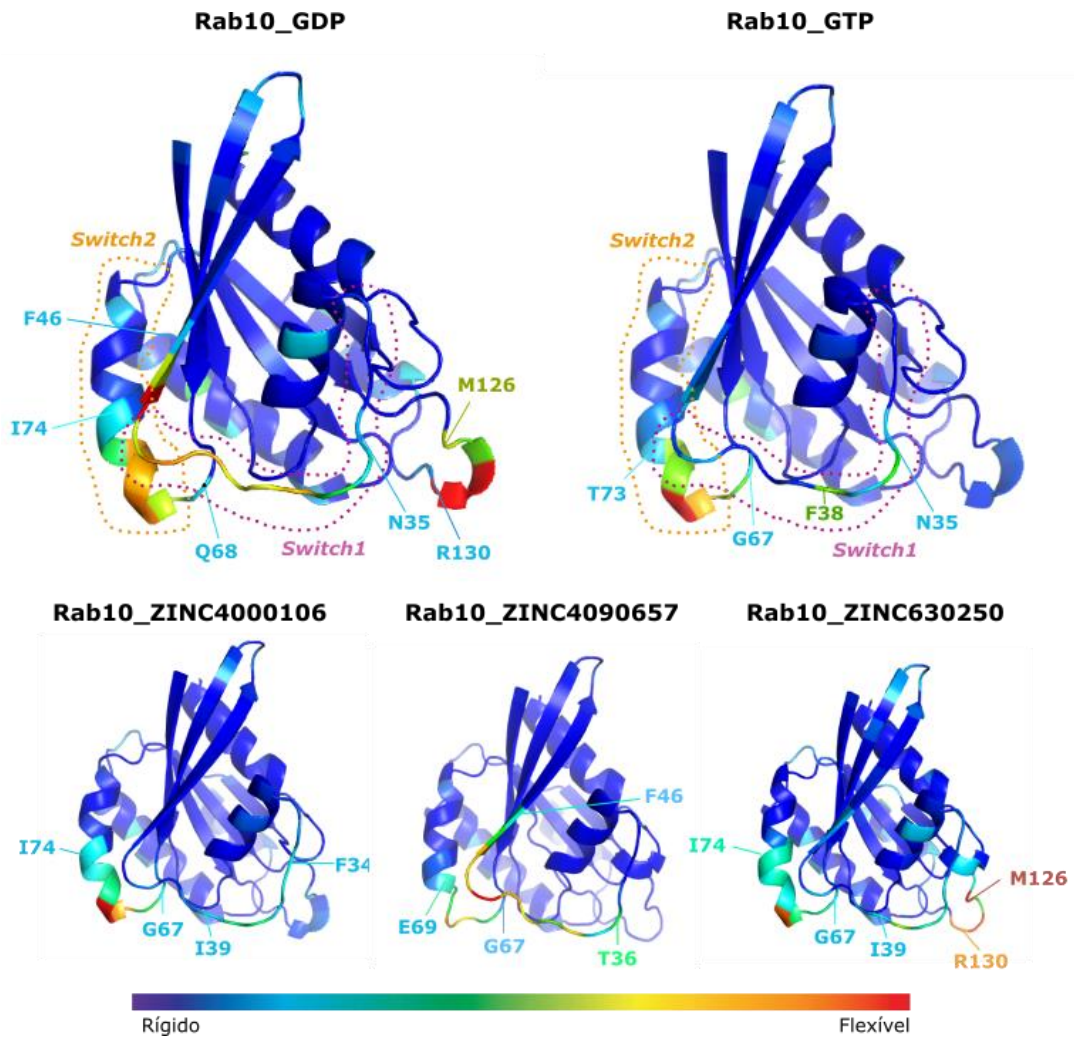
Fonte. O autor (2022).

A flexibilidade do domínio G da Rab10 associado aos diferentes ligantes foi analisada por meio dos valores do *B-factor*, como mostrado na figura 33. Em geral, a região *switch2* formada pelos resíduos A66-A82 não mostrou diferenças perceptíveis em relação à flexibilidade. Entretanto, a região *switch1* mostrou uma flexibilidade acentuada no sistema Rab10_GDP (forma inativa). De acordo com DAHANAYAKE e METCHELL-KOCH (2018), a flexibilidade de um *loop* está correlacionada com a mobilidade relativa do solvente. Como *switch1* é uma região de *loop* exposta ao solvente, quando a Rab10 está associada à GDP, tal região é mais suscetível aos movimentos *brownianos* do que *switch2*. Além disso, a região formada pelo segmento M126-R130 também apresentou uma alta flexibilidade no sistema Rab10_GDP, enquanto é relativamente mais rígida no sistema Rab10_GTP.

Quanto aos valores de *B-factor* obtidos para os produtos naturais, observou-se que a região *switch1* do sistema Rab10_ZINC4090657 é relativamente mais flexível quando comparada aos outros sistemas, assemelhando-se ao padrão observado em Rab10_GDP. Já em relação a *switch2*, notou-se uma maior flexibilidade nos sistemas Rab10_ZINC0630250 e Rab10_ZINC4000106; entretanto, esse comportamento também foi observado nos sistemas controles. O sistema Rab10_ZINC0630250

também mostrou alta mobilidade na região formada pelo *loop* M126-R130, assim como observado em Rab10_GDP.

Figura 33. Representação colorida dos valores do *B-factor* do domínio G da Rab10. As áreas (dadas em Å²) mais flexíveis são coloridas em vermelho, enquanto as áreas mais rígidas, em azul.



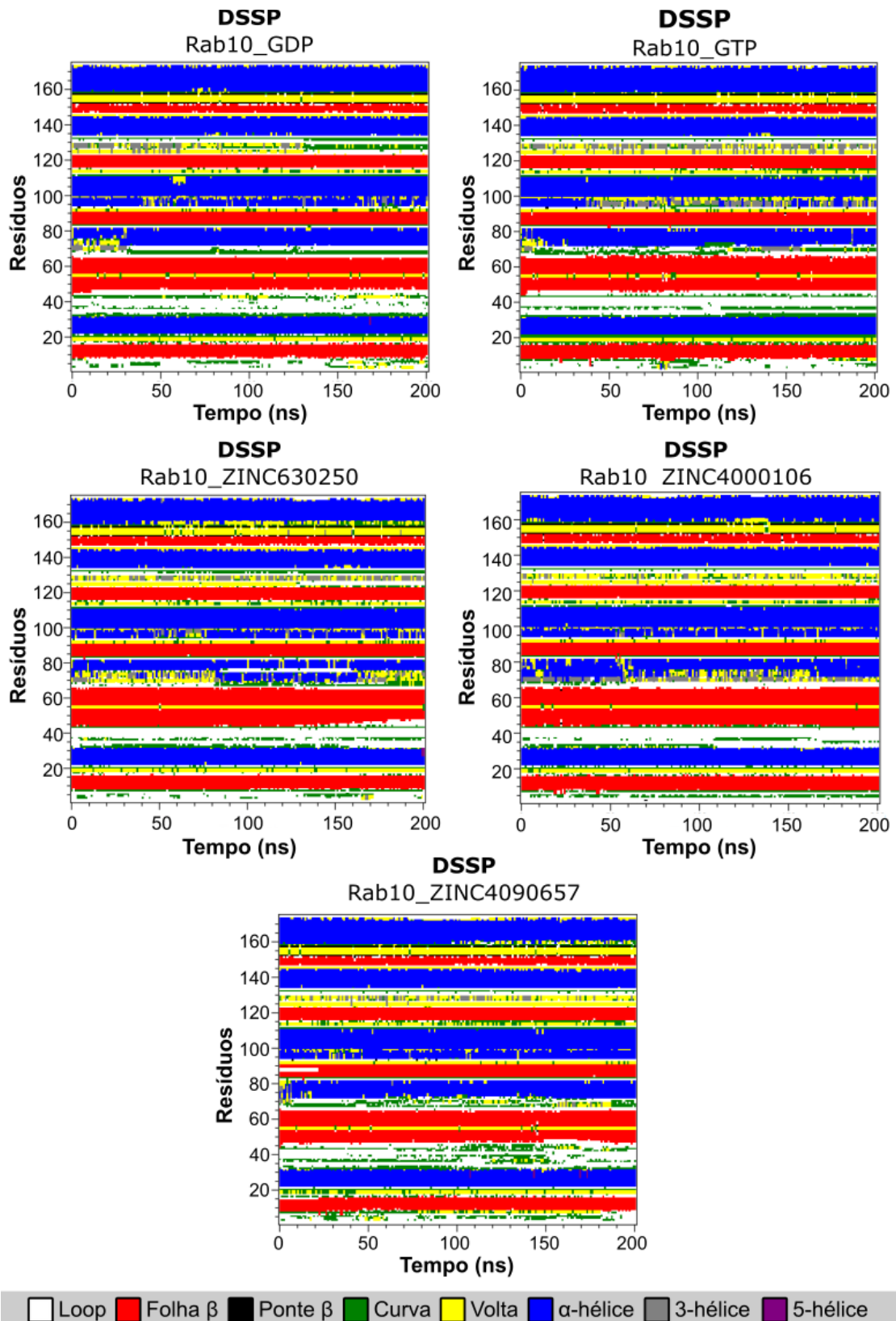
Fonte. O autor (2022).

Com o intuito de verificar se as mudanças na flexibilidade conformacional da Rab10 induzem alterações nas estruturas secundárias da Rab10, analisou-se o DSSP. Isso foi feito porque as proteínas não possuem estruturas rígidas em solução e, conseqüentemente, algumas flutuações podem induzir mudanças em suas estruturas secundárias (ANDERSEN *et al.*, 2002). A figura 34 ilustra as variações estruturais dos resíduos de aminoácidos da Rab10 em relação à evolução temporal. Como é possível visualizar na figura, não há mudanças significativas na estrutura secundária da Rab10 quando associada a GDP e GTP. A figura mostra que houve

ligeiras transições para estruturas desdobradas, como voltas e curvas e, às vezes, a formação de 3-hélice, que é uma variação da α -hélice que é formada pela repetição de três resíduos de aminoácidos por turno. Desse modo, as mudanças na flexibilidade conformacional aparentam não induzir variações na estrutura secundária da Rab10 no processo de ativação e inativação. Segundo PYLYPENKO, HAMMICH e HOUDUSSE A (2018), quando essa enzima está vinculada a GDP, ela demonstra um alto nível de flexibilidade e de desordem nas suas regiões *switch1* e *switch2*, permitindo-lhe explorar uma ampla gama de conformações. Nesse sentido, esperava-se que a região *switch2* do sistema Rab10_GDP (a qual é formada majoritariamente por α -hélice) desestabilizasse formando regiões desdobradas no segmento A66-A82. No entanto, essa tênue desestabilização ocorreu nos dois sistemas analisados.

Nos sistemas da Rab10 associada aos produtos naturais, observou-se que a desestabilização da estrutura secundária da região *switch2* é relativamente maior que as observadas nos sistemas controles. Por exemplo, nos sistemas Rab10_ZINC0630250 e Rab10_ZINC4000106 a α -hélice da região *switch2* possui transições mais acentuadas, formando estruturas desdobradas em maior intensidade. O mesmo comportamento foi observado em Rab10_ZINC4090657, embora em menor intensidade que os outros sistemas de produtos naturais. Em relação a região *switch1*, a análise do DSSP mostrou que, em todos os sistemas analisados, a estrutura secundária é preservada ao longo do tempo de simulação.

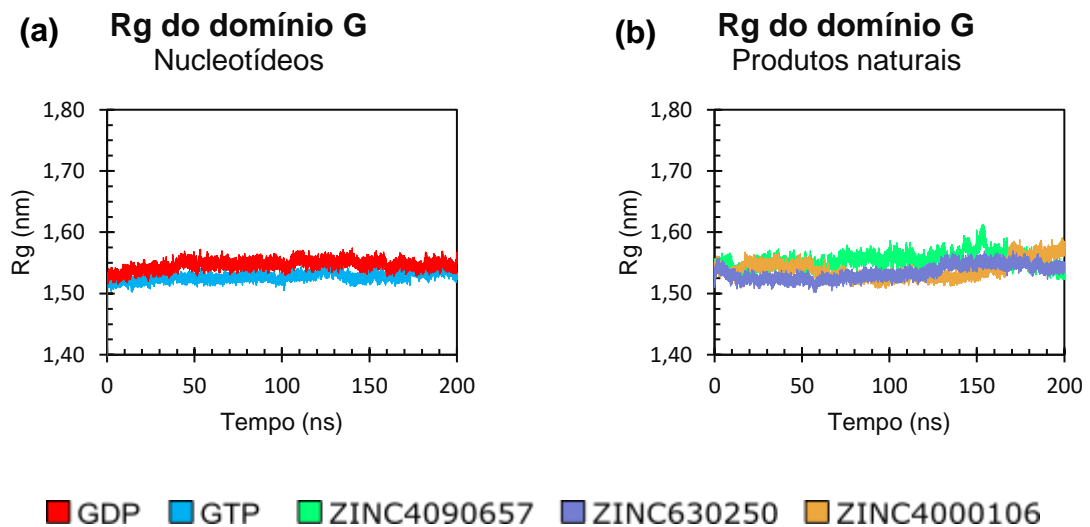
Figura 34. Ilustração gráfica do DSSP da Rab10 complexada aos controles e produtos naturais. A região *switch1* é definida pelas posições 31-43, enquanto *switch2* pelas posições 66-82. As estruturas secundárias estão representadas conforme as cores indicadas na legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

As trajetórias de R_g do domínio G da Rab10 são mostradas na figura 37. A análise das trajetórias mostrou que os sistemas controles entraram em equilíbrio conformacional (figura 35a). Do mesmo modo, as trajetórias obtidas para os sistemas formados por produtos naturais também indicaram equilíbrio conformacional, visto que os valores de R_g são constantes (figura 35b).

Figura 35. R_g do domínio G da Rab10 associada aos controles e produtos naturais. Os compostos analisados estão representados pelas cores indicadas na legenda da imagem.

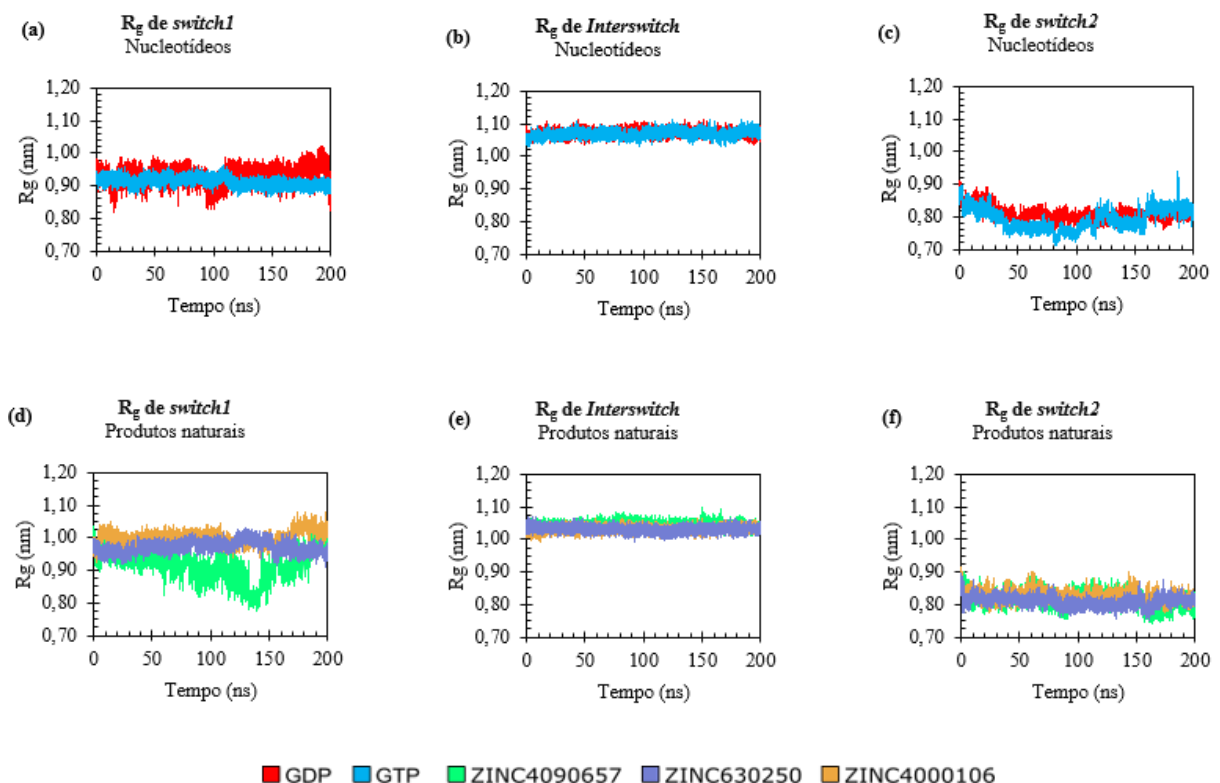


Fonte. O autor (2022).

Ao analisar os resultados de R_g das regiões *switchs*, observou-se que *switch1* possui dobras mais desordenadas quando a Rab10 estava associada ao nucleotídeo GDP (figura 36a). Como dito anteriormente, valores constantes de R_g indicam estruturas dobradas de modo estável. Isto sugere que a região *switch1* possui dobras mais conservadas quando Rab10 interage com GTP. Além disso, os valores obtidos para o sistema Rab10_GDP sugerem que a região *switch1* compacta e descompacta ao longo da simulação. Embora isto ocorra de forma sutil, tal resultado demonstra a flexibilidade inerente dessa região. A análise do R_g de *interswitch* mostrou que as dobras são estáveis para os dois sistemas estudados, conforme o esperado (figura 36b). Já em *switch2*, ambos os sistemas mostraram desordem nos movimentos das dobras (figura 36c), isso pode ser explicado devido a uma tênue desestabilização localizada no turno composto pelos resíduos F71-T73 (da α -hélice) de *switch2*, a qual pode transigir para estruturas desdobradas (figura 34).

Em relação aos resultados obtidos para os sistemas formados por produtos naturais, observou-se que quando a Rab10 estava interagindo com ZINC0630250 e ZINC4000106, a região *switch1* possui valores de R_g relativamente mais constantes, enquanto ZINC4090657 tende a desestabilizar em maior intensidade essa região, mostrando o potencial de torná-la mais flexível e desordenada (figura 36d). Quanto às regiões *interswitch* e *switch2*, os valores obtidos para R_g são semelhantes aos controles (figura 36e-f).

Figura 36. R_g do *backbone* das regiões *switchs*.da Rab10. (a) trajetórias de *switch1* para os sistemas controles (b) trajetórias de *interswitch* para os sistemas controles; (c) trajetórias de *switch2* para os sistemas controles (d) trajetórias de *switch1* para os sistemas formados por produtos naturais; (e) trajetórias de *interswitch* para os sistemas formados por produtos naturais (f) trajetórias de *switch2* para os sistemas formados por produtos naturais. Os compostos analisados estão representados pelas cores indicadas na legenda da imagem.

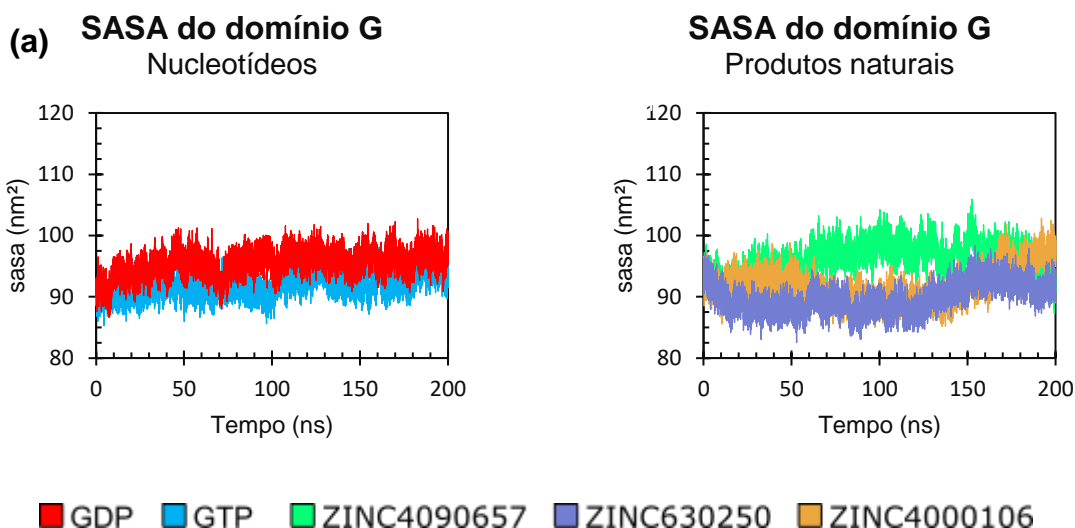


Fonte. O autor (2022).

A figura 37 mostra a SASA do domínio G da Rab10 ao interagir com diferentes ligantes. O sistema Rab10_GDP possui predominantemente picos maiores que Rab10_GTP no decorrer da simulação (figura 37a). O ligeiro aumento da SASA do sistema Rab10_GDP pode ser explicado pela maior flexibilidade de *switch1* e do *loop*

composto por resíduos nas posições 125-130. Ao analisar os sistemas associados aos produtos naturais, observou-se que Rab10_ZINC4090657 possui SASA relativamente maior que os outros sistemas estudados (figura 37b). Dentre os compostos testados, ZINC4090657 é o que possui uma maior capacidade de aumentar a flexibilidade de *switch1* e, conseqüentemente, deixar tal região mais exposta ao solvente. Esse comportamento assemelha-se aos dados obtidos para Rab10_GDP. Por outro lado, os sistemas Rab10_ZINC0630250 e Rab10_ZINC4000106 mostraram um comportamento de SASA semelhante aos dados obtidos para Rab10_GTP.

Figura 37. SASA do domínio G da Rab10 em interação com: (a) nucleotídeos GDP e GTP; (b) produtos naturais. Os compostos analisados estão representados pelas cores indicadas na legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

Por meio da análise MM/PBSA foi possível obter a predição da energia de ligação para os nucleotídeos controles e os três produtos naturais analisados. Os valores da energia de ligação estão resumidos na tabela 4, onde é possível visualizar que os compostos ZINC4090657 e ZINC4000106 mostraram maior afinidade para a Rab10 ($-99,55 \pm 11,58 \text{ KJ.mol}^{-1}$ e $-104,82 \pm 11,61 \text{ KJ.mol}^{-1}$, respectivamente) em comparação com GDP ($-80,28 \pm 15,32 \text{ KJ.mol}^{-1}$). Além disso, tais compostos apresentam valores de energia de ligação próximo a GTP ($-118,57 \pm 16,63 \text{ KJ.mol}^{-1}$). Já o composto ZINC0630250 mostrou uma energia de ligação próxima a GDP ($-61,493 \pm 13,02 \text{ KJ.mol}^{-1}$). A decomposição de energia residual do MM/PBSA mostrou que as interações de vdWs são os principais componentes para estabilizar os

compostos testados no sítio ativo da Rab10, visto que contribuíram em maior intensidade na interação proteína-ligante.

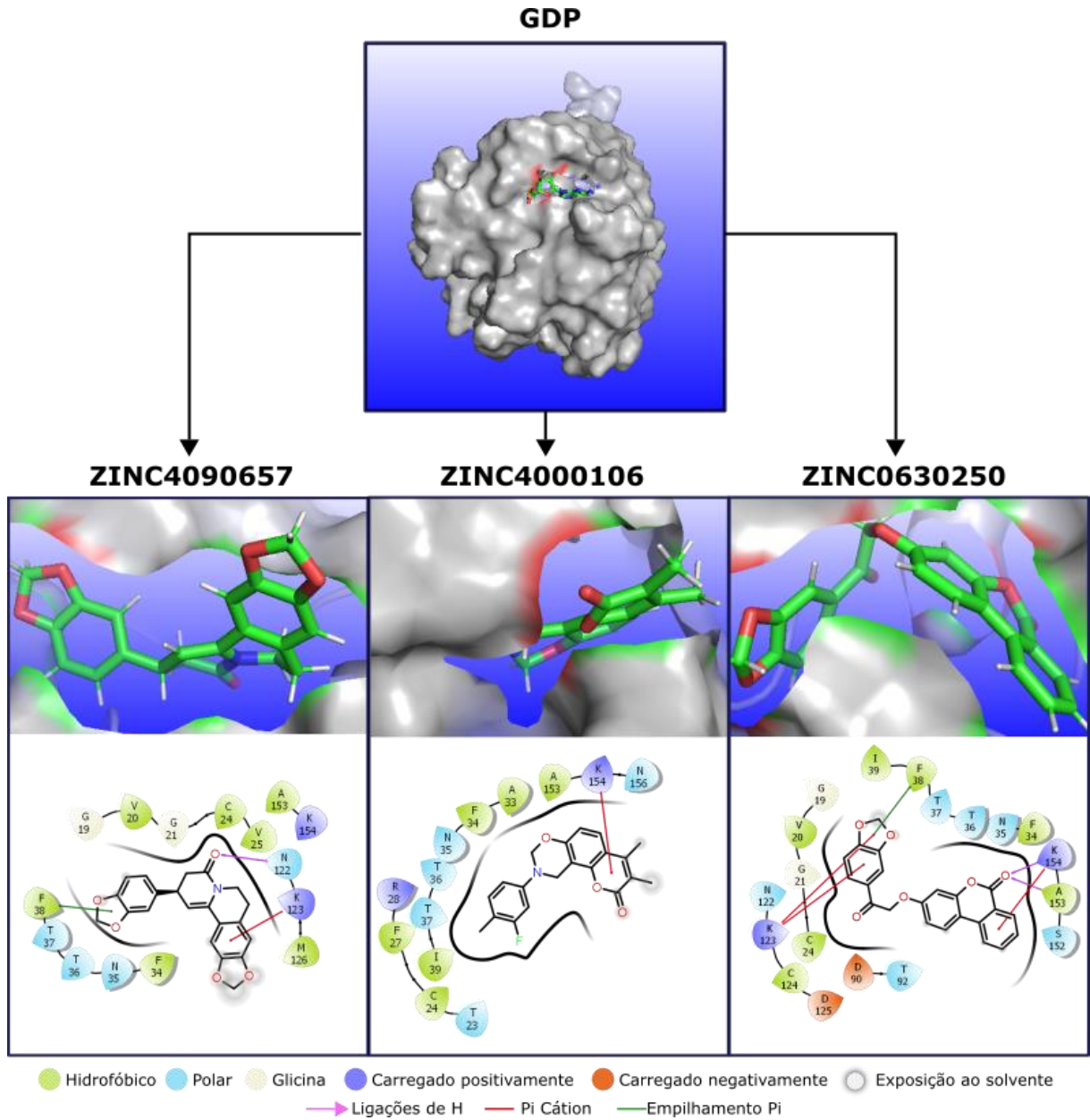
Tabela 4. Decomposição residual e energia de ligação (dada em Kj.mol^{-1}) na interação proteína-ligante.

LIG	ΔEvdW	ΔEelec	Energia polar de solvatação	Energia SASA	Energia de ligação
ZINC4090657	$-152,41 \pm 7,91$	$-35,41 \pm 7,22$	$101,33 \pm 12,58$	$-13,06 \pm 0,82$	$-99,55 \pm 11,58$
ZINC4000106	$-153,19 \pm 11,38$	$-8,92 \pm 6,70$	$73,577 \pm 13,51$	$-16,30 \pm 1,00$	$-104,82 \pm 11,61$
ZINC0630250	$-164,15 \pm 10,16$	$-53,37 \pm 9,25$	$173,15 \pm 16,31$	$-17,13 \pm 0,76$	$-61,49 \pm 13,02$
GDP	$-146,13 \pm 18,27$	$-910,70 \pm 11,95$	$994,16 \pm 15,77$	$-17,62 \pm 0,76$	$-80,28 \pm 15,32$
GTP	$-172,24 \pm 20,73$	$-1150,56 \pm 13,80$	$1223,87 \pm 16,85$	$-20,20 \pm 0,66$	$-118,57 \pm 16,63$

Em resumo, as análises de RMSD, RMSF, *B-factor*, ocorrência de ligações de hidrogênio, Rg e SASA sugerem que o composto ZINC4090657 possui maior potencial para inativar a Rab10. Quando ele interage com o alvo, a região *switch1* apresenta movimentos característicos aos observados nos sistemas Rab10_GDP. Porém, a inativação do alvo biológico pelos ligantes ZINC0630250 e ZINC4000106 não pode ser descartada, visto que assumem uma nova conformação no sítio ativo da Rab10 durante o decorrer das simulações (figura 24 e 25). Tanto ZINC4090657 quanto ZINC4000106 não participam de ligações de hidrogênio envolvendo S18, S40 e T41, resíduos que aparentam exercer um papel na indução da forma ativa da Rab10. Em relação ao ligante ZINC0630250, a interação de hidrogênio com S40 ocorre em baixa intensidade pois mostrou valores de ocorrência abaixo de 10% (figura 29). Além disso, não foi observada a presença de ligações de hidrogênio com os motivos PMs, sugerindo que o acoplamento destes ligantes no sítio ativo é mantido principalmente por forças de vdW's.

As poses dos produtos naturais obtidas no *docking* molecular não foram preservadas nas simulações de DM. Esses compostos mostraram variações em suas conformações, onde assumiram novas poses ao longo do tempo (sendo ZINC4090657 o composto mais estável). Entretanto, todos os 3 compostos permaneceram no bolsão de ligação de GDP, formado pelos resíduos de aminoácidos G21, K22, T23, C24, F34, D125 e K154. A figura 38 mostra as poses obtidas no último *frame* das simulações ($t = 200$ ns) para cada produto natural acoplado no sítio ativo da Rab10.

Figura 38. Poses finais da simulação com a superfície da Rab10. As interações intermoleculares e as propriedades dos resíduos de aminoácidos estão representadas conforme a legenda da imagem.



Fonte. O autor (2022).

5. CONCLUSÃO

Sob a hipótese que produtos naturais podem inibir a proteína Rab10, este estudo investigou potenciais substâncias bioativas (provenientes de produtos naturais) contra o alvo Rab10 com o objetivo de propor possíveis candidatos com ação terapêutica na luta contra a DA. Em conclusão, os resultados sugerem que o composto ZINC4090657 (derivado de quinolizidina) e os compostos ZINC4000106 e ZINC0630250 (derivados de cumarina) possuem características farmacológicas favoráveis para a inibição da Rab10, sendo ZINC4090657 o mais promissor. Tais compostos apresentaram aptidão farmacodinâmica com o sítio de ligação de GDP, um nucleotídeo que induz a conformação inativa da Rab10. Quanto à farmacocinética, os resultados sugerem que eles podem ser administrados por dosagem oral. Entretanto, estudos clínicos devem ser feitos para avaliar se esses compostos possuem bons perfis de biodisponibilidade e se estão sujeitos a interações medicamentosas indesejáveis. Contudo, esses compostos possuem o potencial de exercer atividade terapêutica contra a DA, podendo ser usados em estudos adicionais no processo de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos.

6. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [S. l.], v. 1, p. 19-25, 2015.

AGARWAL, M. *et al.* Alzheimer's Disease: An Overview of Major Hypotheses and Therapeutic Options in Nanotechnology. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 11, n.1, p. 59, dec. 2020.

ALZHEIMER'S DISEASE REPORTS. Numbers of people with dementia around the world. Alzheimer's Disease International: The global voice on dementia. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.alzint.org/resource/numbers-of-people-with-dementia-worldwide/>. Acesso em: 17 dez. 2021.

ANDERSEN, C. A. F. *et al.* Continuum Secondary Structure Captures Protein Flexibility. **Structure**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 175-184, feb. 2002.

ANDRADE, S. *et al.* Natural Compounds for Alzheimer's Disease Therapy: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n.9, p. 2312, may. 2019.

ARAYA, J. A. *et al.* Modulation of Neuronal Nicotinic Receptor by Quinolizidine Alkaloids Causes Neuroprotection on a Cellular Alzheimer Model. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 42, n. 1, p. 143-155, aug. 2014.

BHATT, T. K.; NIMESH, S. The Design & Development of Novel Drugs and Vaccines. *In*: ARAYA, J. A. *et al.* **Introduction of structural bioinformatics with respect to drug discovery**. Cham: Academic Press, [S. l.], p. 3-9, 2021. *E-Book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821471-8.00001-5>. Acesso em: 17 dez 2021.

ASHA, H. Review: Natural Compounds as Anti-Alzheimer's Disease Agents. **Current Nutrition & Food Science**, [S. l.], v. 13, n. 4, 2017.

ATHAR, T.; BALUSHI, K. A.; KHAN, S. A. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 48, p. 5629-5645, 2021.

AZEVEDO, J. R. Docking screens for drug discovery. *In*: SANTOS, L. H. S.; FERREIRA, R. S.; CAFFARENA, E. R. **Integrating Molecular Docking and**

Molecular Dynamics Simulations, Porto Alegre, p. 13-34, 2019. *E-Book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7>. Acesso em: 17 dez 2021.

BACHURIN, S. O.; BOVINA, E. V.; USTYUGOV, A. A. Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. **Medical Research Reviews**, [S. l.], v. 37, p. 1186-1225, jan. 2017.

BANERJEE, P. *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, p. W257-263, jul. 2018.

BATOOL, M.; AHMAD, B.; CHOI, S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 2783, jun. 2019.

BEARD, J. R.; BLOOM, D., E. Towards a comprehensive public health response to population ageing. **The Lancet**, [S. l.], v. 385, n. 9968, p. 658-661, feb. 2015.

BECK, D. A. C.; DAGGETT, V. Methods for molecular dynamics simulations of protein folding/unfolding in solution. **Methods**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 112-120, sep. 2004.

BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 235-242, jan. 2000.

BOWERS K. J. *et al.* Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *In: SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*. Tampa: IEEE Computer Society, p. 43-43, nov. 2006.

BOYD, B. J. *et al.* Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 137, n. 107, p. 2411-2502, jun 2019.

BRÜSCHWEILER R. Efficient RMSD measures for the comparison of two molecular ensembles. **Proteins**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 26-34, jan. 2003.

CHEN, Y. T.; HOLCOMB, C.; MOORE, H. P. Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 90, n. 14, p. 6508–6512, jul. 1993.

CHENG, T. *et al.* Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review. **The AAPS Journal**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 133-41, mar. 2012.

CHERFILS, J.; ZEGHOUF, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. **Physiological Reviews**, [S. l.], v.93, n. 1, p. 269-309, jan. 2013.

CHOY, R. W.; CHENG, Z.; SCHEKMAN, R. Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β ($A\beta$) production in the trans-Golgi network. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 30, p. E2077-E2082, jul. 2012.

CHUA C. E. L., TANG B. L. Rab 10—a traffic controller in multiple cellular pathways and locations. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 233, n. 9, p. 6483-6494, sep. 2018.

CROMM, P. M. *et al.* Direct Modulation of Small GTPase Activity and Function. **Angewandte Chemie e Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 54, n. 46, p. 13516-13537, nov. 2015.

CUMMINGS, J. *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, [S. l.], v. 5, n. p. 272–293, jul. 2019.

DAHANAYAKE, J. N.; METCHELL-KOCH, K. R. How Does Solvation Layer Mobility Affect Protein Structural Dynamics? **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S. l.], v. 5, p. 65, jul. 2018.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1117-1121, jun. 2016.

DAINA, A. *et al.* SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, p. 42717, mar. 2017.

DE VIVO, M. *et al.* Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 9, p. 4035-4061, jan. 2016.

- DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, [S.l.], v. 47, p. 20-33, may. 2016.
- DU, X.; WANG, X.; GENG, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. **Translational Neurodegeneration**, [S. l.], v. 7, p. 2, jan. 2018.
- EDLER, E.; STEIN, M. Probing the druggability of membrane-bound Rab5 by molecular dynamics simulations. **Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 434-443, dec. 2017.
- EDWARDS III, G. A. *et al.* Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. **Frontiers Aging Neuroscience**, [S. l.], v. 11, p. 146, jun. 2019.
- EISENHABER, F. *et al.* The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 273-284, mar. 1995.
- ENGLISH, A. R.; VOELTZ, G. K. Rab10 GTPase regulates ER dynamics and morphology. **Nature Cell Biology**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 169-178, dec. 2013.
- ESPOSITO, M.; SHERR, G. L. Epigenetic Modifications in Alzheimer's Neuropathology and Therapeutics. **Frontiers. Neuroscience**, [S. l.], v. 13, p. 476, may 2019.
- FERREIRA, L. G. *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, [S.l.], v. 20, n. 7, p. 13384-13421, jul. 2015.
- FISCHER, E. Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, [S. l.], v. 27, p. 2985-2993, dec.1894.
- FLIEGE, J.; SVAITER, B. F. Steepest descent method for multicriteria optimization. **Mathematical Methods of Operations Research**, [S. l.], v. 51, p. 479-494, aug. 2000.
- FRENKEL, D.; SMIT B. **Understanding Molecular Simulation: from Algorithms to Applications**. 2. nd., London: Academic Press, oct 2001. *E-book*. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/understanding-molecular-simulation/frenkel/978-0-12-267351-1>. Acesso em: 18 dez 2021.

FRIESNER, R. A. *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 49, p. 6177-6196, sep. 2006.

GALZITSKAYA, O. V.; GALUSHKO, E. I.; SELIVANOVA, O. M. Studies of the Process of Amyloid Formation by A β Peptide. Biochemistry. **Biochemistry (Moscow)**, Moscow, v. 83, p. S62-S80, jan. 2018.

GOODY, R. S.; MÜLLER, M. P.; WU, Y. Mechanisms of action of Rab proteins, key regulators of intracellular vesicular transport. **Biological Chemistry**, [S.I.], v. 398, n. 5-6, p. 565-575, nov. 2017.

GUADAGNO, N. A.; PROGIDA, C. RAB GTPases: Switching to Human Diseases. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 909, aug. 2019.

HAEUSSLER, C.; ASSMUS, A. Bridging the gap between invention and innovation: Increasing success rates in publicly and industry-funded clinical trials. **Research Policy**, [S.I.], v. 50, n. 2, 104155, mar. 2021.

HAMMES, G. G. Multiple Conformational Changes in Enzymes Catalysis. **Biochemistry**, [S.I.], v. 41, n. 26, p. 8221-8228, jun. 2002.

HAMMULAKOVA S. *et al.* Synthesis, in vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking of new acridine-coumarin hybrids. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 104, p. 333-338, nov. 2017.

HARDY, J; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, [S.I.], v. 256, p. 184–185, Apr. 1992.

HARDY, J.; ALLSOP, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S.I.], v. 12, p. 383–388, Oct, 1991.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The Amyloid hypothesis of Alzheimer's Disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, [S.I.], v. 297, p. 353–356, jul. 2002.

HE, Q. *et al.* Coumarin-dithiocarbamate hybrids as novel multitarget AChE and MAO-B inhibitors against Alzheimer's disease: Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic Chemistry**, [S.I.], v. 81, p. 512-528, dec. 2018.

LENNARZ, W. J.; LANE, M. D. Encyclopedia of Biological Chemistry. *In*: HEIRIKISON R. L. **Secretases**. 2 nd., [S.l.]: Academic Press, p. 199-202, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00172-9>. Acesso em: 18 dez 2021.

HERVÉ, J. C.; BOURMEYSTER, N. Rab GTPases, master controllers of eukaryotic trafficking. **Small GTPases**, [S.l.], v. 9, n. 1-2, p. 1-4, jan. 2018.

HEVENER, K. E. *et al.* Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, [S. l.], v. 49, n. 2, p. 444-460, jan. 2009.

HOMMA, Y.; HIRAGI, S.; FUKUDA, M. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. **The FEBS Journal**, [S. l.], v. 288, p. 36-55, jun. 2021.

HUANG, J. *et al.* CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, [S. l.], v. 14, p. 71-73, nov. 2017.

JAGHOORI, M. M.; BLEIJLEVENS, B.; OLABARRIAGA, S. D. 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [S. l.], v. 30, p. 237-249, mar. 2016.

JUNAID, M. *et al.* Molecular modeling and molecular dynamics simulation study of the human Rab9 and RhoBTB3 C-terminus complex. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 10(12), p. 757-763, dec. 2014.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, [S. l.], v. 22(12), p. 2577-2637, dec. 1983.

KAMETANI, F.; HASEGAWA, M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Frontiers. Neurosciences.**, [S. l.], v. 12, p. 25, jan. 2018.

KARPOVA, N. N.; SALES, A. J.; JOCA, S. R. Epigenetic basis of neuronal and synaptic plasticity. **Current topics in medicinal chemistry**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 771-793, 2017.

KOSHLAND, D. E. J. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. **Angewandte Chemie e Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 33, p. 2375-2378, 1995.

- KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 857, p. 231-257, 2012.
- KUHN, A. J. *et al.* The Alzheimer's Disease "non-amyloidogenic" p3 peptide revisited: a case for Amyloid- α . **ACS Chemical Neuroscience**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1539-1544, jun 2020.
- KUMARI, R.; KUMAR, R., Open Source Drug Discovery Consortium *et al.* g_mmpbsa—A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. **Journal of Chemical Information Model**, [S. l.], v. 54, n. 7, p. 1951-1962, may. 2014.
- KUSMANIC, A.; ZAGROVIC, B. Determination of Ensemble-Average Pairwise Root Mean-Square Deviation from Experimental B-Factors. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 98, n. 5, p. 861-871, mar. 2010.
- LANCTÔT, K. L. *et al.* Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 440-449, aug. 2017.
- LANOISELÉE, H. *et al.* APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Medicine*, [S. l.], v. 14, n. 3, e1002270, mar. 2017.
- LEAF, D. S.; BLUM, L. D. Analysis of Rab10 localization in sea urchin embryonic cells by three-dimensional reconstruction. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 243, p. 39-49, aug. 1998.
- LESAR R. **Introduction to Computational Materials Science: Fundamentals to Applications**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 131-57, 2013. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781139033398>. Acesso em: 18 dez. 2021.
- LI, X.; TANG, X. Characterizing interdisciplinarity in drug research: A translational science perspective. **Journal of Informetrics**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 101216, nov. 2021.
- LICHTENTHALER, F. W. 100 Years "Schlüssel-Schloss-Prinzip": What Made Emil Fischer Use this Analogy? **Angewandte Chemie e Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 33, p. 2364-2374, jan. 1995.

LIONTA, E. *et al.* Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. **Current Topic in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 14, n. 16, p. 1923-1938, 2014.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 235-249, aug. 2000.

LOBANOV, M. Y.; BOGATYREVA, N. S.; GALZITSKAYA, O. V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. **Molecular Biological**, [S. l.], v. 42, p. 623-628, aug. 2008.

MA Y. *et al.* Therapeutic Effects of Natural Drugs on Alzheimer's Disease. **Frontiers Pharmacological**, [S. l.], v. 10, n. 1355, dec. 2019.

MACALINO, S. J. Y. *et al.* Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 1686-701, sep. 2015.

MAKHATADZE, G. I. Thermodynamics Of α -Helix Formation. **Advances in Protein Chemistry**, [S. l.], v. 72, p. 199-226, 2005.

MALATHI, K.; RAMAIAH, S. Bioinformatics approaches for new drug discovery: a review. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 243-260, oct. 2018.

MANUAL DO GROMACS. Disponível em:

https://www.gromacs.org/Documentation_of_outdated_versions/Manual. Acesso em 18 dez. 2021.

MIMA, J. Reconstitution of membrane tethering mediated by Rab-family small GTPases. **Biophysical Reviews**, [S. l.], v. 10, p. 543-549, apr. 2018.

MORLEY, J. E.; FARR, S. A.; NGUYEN, A. D. Alzheimer Disease. **Clinics in Geriatric Medicine**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 591-601, nov. 2018.

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal Computational Chemistry**, [S. l.], v. 30, p. 2785-2791, dec. 2009.

MULLARD, A. Pharma pumps up anti-tau Alzheimer pipeline despite first Phase III failure. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 15, n. 9, aug. 2016.

MÜLLER, M. P.; GOODY, R. S. Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI. **Small GTPases**, [S. l.], v. 9, n. 1-2, p. 50-21, mar. 2018.

MUTHUMANICKAM, P. B. *et al.* An Insight of Protein Structure Predictions Using Homology Modeling. *In*: BALAMURUGAN, S. *et al.* Computation in Bioinformatics. 2021. *E-Book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119654803.ch13>. Acesso em: 18 dez. 2021.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NELSON, M. T. *et al.* NAMD: a Parallel, Object-Oriented Molecular Dynamics Program. **The International Journal of Supercomputer Applications and High Performance Computing**, [S. l.], v. 10(4), p. 251-268, 1996.

NITTINGER, E. *et al.* Large-Scale Analysis of Hydrogen Bond Interaction Patterns in Protein-Ligand Interfaces. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 4245-4257, may. 2017.

NOVICK P. Regulation of membrane traffic by Rab GEF and GAP cascades. **Small GTPases**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 252-256, 2016.

O'BOYLE N. M. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, [S. l.], v. 3, p. 33, oct. 2011.

OKIMOTO, N. *et al.* High-Performance Drug Discovery: Computational Screening by Combining Docking and Molecular Dynamics Simulations. **PLoS Computational Biology**, [S. l.], v. 5, n. 10, e100528, oct. 2009.

OLUTU, A. F.; SOLIMAN, M. E. S. From mutational inactivation to aberrant gain-of-function: Unraveling the structural basis of mutant p53 oncogenic transition. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 19, n. 3, p. 2646-52, mar. 2018.

ORLANGO, G.; RAIMOND, D.; VRANKEN, W. F. Observation selection bias in contact prediction and its implications for structural bioinformatics. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, p. 36679, nov. 2016.

PAN, A. C. *et al.* Molecular determinants of drug–receptor binding kinetics. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 13-14, p. 667-673, jul. 2013.

PAQUET, E.; VIKTOR, H. L. Molecular Dynamics, Monte Carlo Simulations, and Langevin Dynamics: A Computational Review. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2015, p. 1-18, feb. 2015.

PARDOSSI-PIQUARD, R.; CHECLER, F. The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 120, p. 109-124, jan. 2012.

PARONI, G.; BISCEGLIA, P.; SERIPA D. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimers Disease**, [S. l.], v. 68, p. 493-510, 2019.

PAUL, M.; PANDA, M. K.; THATOI, H. Developing Hispolon-based novel anticancer therapeutics against human (NF- κ B) using in silico approach of modelling, docking and protein dynamics. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 15, p. 3947-3967, sep. 2018.

PAULING L., COREY R. B. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 37, p. 729-740, 1951.

PAULING, L.; COREY, R. B.; BRANSON, H. R. Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 37, p. 205-211, 1951.

PEREIRA, J. C.; CAFFARENA, E. R.; SANTOS, C. N. Boosting Docking-Based Virtual Screening with Deep Learning. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 56, n. 12, p. 2495-506, nov. 2016.

PIÑERO, J.; FURLONG, L. I.; SANZ, F. In silico models in drug development: where we are. **Current Opinion in Pharmacology**, [S. l.], v. 42, p. 111-21, 2018.

PINZI L. RASTELLI G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Moleculas Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 18, n. 4331, sep. 2019.

PITERA, J. W. Expected Distributions of Root-Mean-Square Positional Deviations in Proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, [S. l.], v. 118, n. 24, p. 6526-6530, 2014.

PLIMPTON, S. Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics. **Journal of Computational Physics**, v. 117, n. 1, p. 1-19, 1995.

PYLYPENKO O. *et al.* RAB GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into RAB functional diversity. **Small GTPases**, [S. l.], v. 9, n. 1-2, p. 22-48, mar. 2018.

QIU T. *et al.* A β 42 and A β 40: similarities and differences. **Journal of Peptide Science**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 522-29, may. 2015.

RAHMAN, M. H. *et al.* Therapeutic Potential of Natural Products in Treating Neurodegenerative Disorders and Their Future Prospects and Challenges. **Molecules**, [S. l.], v. 26(17), n. 5327, 2021.

RIDGE, P. G. *et al.* Linkage, whole genome sequence, and biological data implicate variants in Rab10 in Alzheimer's disease resilience. **Genome Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 100, p. 1-14, nov. 2017.

ROY, K.; KAR, S.; DAS, R. N. **Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment**. 1. ed. London: Academic Press, p. 151-189, 2015. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00286-9>. Acesso em: 18 dez 2021.

SABBAGH, M. N.; HENDRIX, S.; HARRISON, J. E. FDA position statement "Early Alzheimer's disease: Developing drugs for treatment, Guidance for Industry". **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, [S. l.], v. 5, p. 13-19, 2019.

SAHNI, T. *et al.* Overview of Coumarins and its Derivatives: Synthesis and Biological Activity. **Letters in Organic Chemistry**, [S. l.], v. 18, p. 1-23, 2021.

SARGSYAN K., GRAUFFEL C., LIM C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 1518-1524, 2017.

SCHRÖDINGER RELEASE 2021-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021a

SCHRÖDINGER RELEASE 2021-2: *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021b.

SELKOE, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. **Neuron**, [S. l.], v. 6, p. 487–498, apr. 1991.

SHAKER, B. *et al.* In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*, [S. l.], v. 137, p. 104851, 2021.

SILVA, M. V. F. *et al.* Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, v. 26, n. 33, 2019.

SILVA, T.; REIS, J.; BORGES, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, [S. l.], v. 15, p. 116-145, 2014.

SINGH A. *et al.* Application of molecular dynamic simulation to study food proteins: A review. **Journal Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 58, p. 2779-2789, 2017.

SLEDZ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 48, p. 93-102, 2018.

SMALL, S. A. *et al.* Endosomal Traffic Jams Represent a Pathogenic Hub and Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. **Trends in Neurosciences: Cell Press**, [S. l.], v. 40, n. 10, p. 592-602, 2017.

SOARES R. O. S. **Dinâmica Molecular de Proteínas: estabilidade e renaturação térmica**. 2009. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SPOEL, D. V. D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 26, p. 1701-1718, 2005.

SRINIVASA, V. R.; SRINIVAS, K. Modern drug discovery process: An in silico approach. **Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis**, [S. l.], v. 2, n. 5, p. 89-94, 2011.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 55, n. 11, p. 2324-2337, 2015.

STEWART, K. D. *et al.* Preference for pharmaceutical formulation and treatment process attributes. **Patient Preference and Adherence**, [S. l.], v. 10, p. 1385-1399, 2016.

STILLHART, C. *et al.* Impact of gastrointestinal physiology on drug absorption in special populations - An UNGAP review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 147, p. 105280, apr. 2020.

SUN, J.; ROY, S. The physical approximation of APP and BACE-1: A key event in alzheimer's disease pathogenesis. **Devel Neurobiology**, [S. l.], v. 78, p. 340-347, 2018.

SUN, X.; CHEN, W.; WANG, Y. β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Frontiers Pharmacology**, [S. l.], v. 6, n. 221, 2015.

TAVANA, J. P. *et al.* Rab10: An alzheimer's disease resilience locus and potential drug target. **Clinical Interventions in Aging**, [S. l.], v. 14, p. 73-79, 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computacional Chemistry**, [S. l.], v. 31, p. 455-61, 2009.

UDAYAR, M. *et al.* A paired RNAi and RabGAP Overexpression Screen Identifies Rab11 as a Regulator of b-Amyloid Production. *Cell Reprints*, v. 5, p. 1536-1551, 2013.

UNITED NATIONS. **World Population Ageing 2019 highlights: Living arrangements of older persons**. [S. l.]:Department of Economic and Social Affairs, 2020. Disponível em:
<https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeing2019-Highlights.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2021.

VANOMMESLAEGHE, K. *et al.* CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 671-690, 2010.

VERDONKI, M. L. *et al.* Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.

VERLET, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions. **Physical Review**, [S. l.], v. 165, p. 201-214, 1968.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. Ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. *E-Book*. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/bioinfo/ebook/>. Acesso em: 18 dez. 2021.

WANG, E. *et al.* End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 119, n. 16, p. 9478-9508, 2019.

WILLIAMS, H. D. *et al.* Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 65, n. 1, p. 315-499, 2013.

WONG, K. H. *et al.* Review of current strategies for delivering Alzheimer's disease drugs across the blood-brain barrier. International. **Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 381, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. Geneva: World Health Organization, 2021. Disponível em: <https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2021.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2021.

WU, Z. *et al.* Network-Based Methods for Prediction of Drug-Target Interactions., **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 9, p. 1134, 2018.

YAMAZAKI, Y. *et al.* Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. **CNS Drugs**, [S. l.], v. 30, n. 9, p. 773-779, 2016.

YAMAZIKI, Y. *et al.* Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. **Nature Reviews Neurology**, [S. l.], v. 15, p. 501-518, 2019.

YAN, T. *et al.* Rab10 Phosphorylation is a Prominent Pathological Feature in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease**, [S. l.], v. 63, p. 157-165, 2018.

YUAN, Z.; BAILED, T. L.; TEASDALE, R. D. Prediction of protein B-factor profiles. **Proteins**, v. 58, p. 905-912, 2005.

ZHANG, H *et al.* The Retromer Complex and Sorting Nexins in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers Aging Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 79, 2018.

ZHANG X. *et al.* Role of Rab GTPases in Alzheimer's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 828-838, 2019.

ZHAO, Z. *et al.* Identification of Biomarkers Associated With Alzheimer's Disease by Bioinformatics Analysis. American **Journal of Alzheimer's disease and other dementia**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 163-168, 2015.

ZOU, W. *et al.* RAB-10-Dependent Membrane Transport Is Required for Dendrite Arborization. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 9, e1005484, 2015.

7. ANEXOS

ANEXO A. Resultados do *redocking* do nucleotídeo GNP pelo Autodock Vina.

<i>Redocking</i>	<i>Exhaustiveness</i>	Semente de randomização	Menor score (Kcal.mol ⁻¹)	RMSD (Å)
1ª etapa	10	1430574698	-11,9	0,60
2ª etapa	20	-1714195298	-11,9	0,60
3ª etapa	70	890168717	-11,9	0,59

ANEXO B. Análise quantitativa das poses provenientes do Autodock Vina.

LIG	Semente de randomização	Etapa	Score (Kcal.mol ⁻¹)	Ligações de H	Pontes salinas	Empilamento Pi	Pi-Cation	Interações de vdW's		
								Boas	Ruins	Péssimas
GDP	-1953720916	1	-10,6	6	3	2	0	392	11	0
GDP	-1829553834	2	-10,6	6	3	2	0	392	12	0
GDP	-1686368472	3	-10,6	6	3	2	0	391	12	0
GTP	646741952	1	-11,5	8	3	2	0	451	21	0
GTP	-996027743	2	-11,5	8	3	2	0	451	20	0
GTP	-585806152	3	-11,5	9	3	2	0	451	19	0

* Os compostos em negrito representam as poses escolhidas para análise de DM.

ANEXO C. Scores dos complexos resultantes pelo Autodock Vina.

Nº	ZINC ID	Semente de randomização	1ª etapa	Semente de randomização	2ª etapa	Semente de randomização	3ª etapa
1	ZINC000096221711	1133430599	-12,4	-1729818574	-12,4	1704422232	-12,4
2	ZINC000217739254	1741241078	-11,9	-1696643200	-11,9	-319088852	-11,9
3	ZINC000253415056	-1804999318	-11,9	405517720	-12,0	-1216295482	-11,9
4	ZINC000000519085	658002271	-11,8	-482175600	-11,8	35555048	-11,8
5	ZINC000253623637	-1925455588	-11,8	356195330	-11,8	-1329102940	-11,8
6	ZINC000096221187	1295582353	-11,7	1355049414	-11,7	-1885942418	-11,7
7	ZINC000000138791	1083282128	-11,4	2016504256	-11,4	2106550081	-11,4
8	ZINC000000238468	-1796112768	-11,4	692707618	-11,4	1888162776	-11,4
9	ZINC000217743874	1111993345	-11,4	-1584418923	-11,4	1620663187	-11,4
10	ZINC000217827813	-246484504	-11,5	1907578010	-11,4	-1343772174	-11,4
11	ZINC000253403161	-1312642368	-11,4	448131975	-11,4	2138657550	-11,4
12	ZINC000252485574	-412619792	-11,4	-1009246146	-11,3	-2001554224	-11,4
13	ZINC000253406567	-2111320516	-11,4	-33510992	-11,4	-1019615216	-11,4
14	ZINC000409415519	171490816	-11,4	34861489	-11,4	993261036	-11,4
15	ZINC000011867457	-27093143	-11,3	-720490010	-11,3	1697388872	-11,3
16	ZINC000217904353	647096608	-11,3	-878228064	-11,3	-1848805552	-11,3
17	ZINC000004000106	2100656970	-11,2	460868032	-11,2	-1816207551	-11,2
18	ZINC000002123626	849247072	-11,2	-845072094	-11,2	331013328	-11,2
19	ZINC000217901212	783830103	-11,2	-128864102	-11,2	-1358627382	-11,2
20	ZINC000217758207	-737774406	-11,2	-2050239150	-11,2	-47279004	-11,2
21	ZINC000217613187	1037195308	-11,2	-106889856	-11,3	-640992248	-11,2
22	ZINC000253413297	-290028054	-11,2	1817652146	-11,2	1151166010	-11,2

23	ZINC000000630267	1313229504	-11,1	-580028696	-11,1	336100338	-11,1
24	ZINC000000519122	485802206	-11,1	-1179312950	-11,1	-380002747	-11,1
25	ZINC000000630250	-1213504426	-11,1	-286604395	-11,3	-283490051	-11,3
26	ZINC000002101104	-2011309177	-11,1	2016123530	-11,1	-1848239574	-11,1
27	ZINC000002117748	-1041841224	-11,1	-1554128076	-11,1	-1971345264	-11,1
28	ZINC000004090657	943034012	-11,1	8289204	-11,1	1449487360	-11,1
39	ZINC000011867465	326689918	-11,2	1074678150	-11,1	-1412283128	-11,1
30	ZINC000020714451	751934182	-11,1	-281382760	-11,0	1036131312	-11,1
31	ZINC000217824009	64715689	-11,1	-967551054	-11,1	1028229296	-11,1
32	ZINC000217905233	-1466652096	-11,1	-883297756	-11,1	124601622	-11,1
33	ZINC000096220848	424766014	-11,1	-1391709366	-11,1	-48874458	-11,1
34	ZINC000253623949	1346186869	-11,1	1921353711	-11,1	1780556803	-11,1
35	ZINC000001504468	421202308	-11,4	-2126280700	-11,0	-2049859173	-11,0
36	ZINC000006345037	142436643	-11,0	2071541025	-11,0	825093356	-11,0
37	ZINC000020412587	489311144	-11,1	142644816	-11,0	-212981873	-11,0
38	ZINC000055393785	1428983750	-11,0	-1300637750	-11,0	-1549646747	-11,0
39	ZINC000035446879	-10865785	-10,9	-127429503	-10,8	1411607523	-11,0
40	ZINC000238899386	-285181574	-11,0	-1266951192	-11,0	2032256964	-11,0
41	ZINC000217718807	762518384	-11,0	-1619930368	-11,0	-919067356	-11,0
42	ZINC000100245022	-528247173	-11,0	461407078	-11,0	-1935040382	-11,0
43	ZINC000217728714	-1913824204	-11,0	1321796966	-11,0	-97752104	-11,0
44	ZINC000409415362	-1435433245	-11,0	1036964043	-11,0	-1828058112	-11,0
45	ZINC000409415542	270511097	-11,0	19035141	-11,0	1593906464	-11,0
46	GDP	-1953720916	-10,6	-1829553834	-10,6	-1686368472	-10,6
47	GNP	1430574698	-11,9	-800576960	-11,9	890168717	-11,8
48	GTP	646741952	-11,5	-996027743	-11,5	-58586152	-11,5

ANEXO D. Características gerais dos produtos naturais testados por SwissADME.

Nº	ZINC ID	Fórmula molecular	Canonical SMILES	Massa molecular (g/mol)
1	ZINC000096221711	C23H14N4O3	<chem>Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1cc3cccc4c3n(c1=O)CC4)c[nH]n2</chem>	394,38
2	ZINC000217739254	C22H14N4O4	<chem>COc1ccc2c(c1)cc(c(=O)[nH]2)c1c2c[nH]nc2nc2c1oc1c2ccc(c1)O</chem>	398,37
3	ZINC000253415056	C23H16N4O3	<chem>Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1cc3cccc3n(c1=O)C)cnn2C</chem>	396,40
4	ZINC000000519085	C21H16O4	<chem>O=C1C[C@@H](O)c2c1ccc1c2cccc1)c1cc2c(c1)OCCO2</chem>	332,35
5	ZINC000253623637	C22H14N4O3	<chem>Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1cc3cccc3[nH]c1=O)cnn2C</chem>	382,37
6	ZINC000096221187	C21H12N4O3	<chem>Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1cc3cccc3[nH]c1=O)c[nH]n2</chem>	368,34
7	ZINC000000138791	C21H14O4	<chem>O=c1oc2ccc3c(c2cc1c1ccc2c(c1)OCCO2)cccc3</chem>	330,33
8	ZINC000000238468	C21H14O4	<chem>O=c1cc(oc2c1ccc1c2cccc1)c1ccc2c(c1)OCCO2</chem>	330,33
9	ZINC000217743874	C22H14N4O4	<chem>COc1ccc2c(c1)[nH]c(=O)c(c2)c1c2c[nH]nc2nc2c1oc1c2ccc(c1)O</chem>	398,37
10	ZINC000217827813	C22H13N3O5	<chem>COc1ccc2c(c1)c(=O)c(co2)c1c2c[nH]nc2nc2c1oc1c2ccc(c1)O</chem>	399,36

11	ZINC0002 53403161	C22H15N3O3	Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1C1=Cc3c(OC1)cccc3)cnn2C	369,37
12	ZINC0002 52485574	C22H14N4O2	Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1ccc3c(c1)ccn3)cnn2C	366,37
13	ZINC0002 53406567	C21H15N3O5	COc1cc(cc2c1OCO2)c1c2cnn(c2nc2c1oc1c2ccc(c1)O)C	389,36
14	ZINC0004 09415519	C22H14N4O4	Oc1cc(O)c2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1cc3cccc3[nH]c1=O)cnn2C	398,37
15	ZINC0000 11867457	C22H18O6	O=C1C[C@@H](Oc2c1c(C)cc1c2c(C)c(c(=O)o1)C)c1ccc2c(c1)OCO2	378,37
16	ZINC0002 17904353	C21H13N3O3	Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1C1=Cc3c(OC1)cccc3)c[nH]n2	355,35
17	ZINC0000 04000106	C20H18FNO3	Fc1cc(ccc1C)N1COc2c(C1)c1oc(=O)c(c1cc2)C)C	339,36
18	ZINC0000 02123626	C20H17NO5	Cc1c(=O)oc2c(c1C)ccc1c2CN(CO1)c1ccc2c(c1)OCO2	351,35
19	ZINC0002 17901212	C21H15N3O5	COc1cc(cc2c1OCO2)c1c2c[nH]nc2nc2c1oc1c2ccc(c1)O	389,36
20	ZINC0002 17758207	C20H13N3O4	Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1ccc3c(c1)OCCO3)c[nH]n2	359,33
21	ZINC0002 17613187	C20H13N3O5	COc1cc(cc2c1OCO2)c1c2c[nH]nc2nc2c1oc1c2ccc(c1)O	375,33
22	ZINC0002 53413297	C20H13N3O4	Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1ccc3c(c1)OCCO3)cnn2C	359,33
23	ZINC0000 00630267	C20H17ClO6	COC(=O)c1oc(c(c1)COc1cc2oc(=O)c3c(c2cc1Cl)CCC3)C	388,80
24	ZINC0000 00519122	C20H12O4	O=c1oc2ccc3c(c2cc1c1ccc2c(c1)OCO2)ccc3	316,31
25	ZINC0000 00630250	C22H14O6	O=C(c1ccc2c(c1)OCO2)COc1ccc2c(c1)oc(=O)c1c2cccc1	374,34
26	ZINC0000 02101104	C21H16O6	O=C(c1ccc2c(c1)OCO2)COc1ccc2c(c1)oc(=O)c1c2CCC1	364,35
27	ZINC0000 02117748	C19H15NO5	O=c1cc(C)c2c(o1)c1CN(COc1cc2)c1ccc2c(c1)OCO2	337,33
28	ZINC0000 04090657	C21H17NO5	O=C1C[C@@H](C=C2N1CCc1c2cc2c(c1)OCO2)c1ccc2c(c1)OCO2	363,36
29	ZINC0000 11867465	C23H18O6	O=C1C[C@@H](Oc2c1c(C)cc1c2c2CCCc2c(=O)o1)c1ccc2c(c1)OCO2	390,39
30	ZINC0000 20714451	C16H13N3O6S	COC(=O)c1nns1NC(=O)COc1ccc2c(c1)oc(=O)cc2C	375,36
31	ZINC0002 17824009	C21H11N3O4	Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1ccc3c(c1=O)cccc3)c[nH]n2	369,33
32	ZINC0002 17905233	C21H13N3O4	Oc1ccc2c(c1O)oc1c2nc2c(c1C1=Cc3c(OC1)cccc3)c[nH]n2	371,35
33	ZINC0000 96220848	C19H11N3O4	Oc1ccc2c(c1)oc1c2nc2c(c1c1ccc3c(c1)OCCO3)c[nH]n2	345,31
34	ZINC0002 53623949	C23H16N4O3	O=c1[nH]c2cccc2cc1c1c2cnn(c2nc2c1oc1c2ccc(c1C)O)C	396,40
35	ZINC0000 01504468	C20H18O6	OC(=O)c1cc2COCOc2c(c1)[C@@H]1CC(=O)c2c(O1)cc(c(c2)C)C	354,35
36	ZINC0000 06345037	C24H13NO5	O=C1c2cccc(c2C(=O)c2c1cccc2)NC(=O)c1ccc2c(c1=O)cccc2	395,36
37	ZINC0000 20412587	C21H14O6	OC(=O)c1ccc(cc1)COc1cc(O)c2c(c1)oc1c(c2=O)cccc1	362,33
38	ZINC0000 55393785	C22H20NO5	O=c1oc2c3C[NH+](COc3ccc2c2c1CCC2)Cc1ccc2c(c1)OCO2	378,40
39	ZINC0000 35446879	C21H22N3O3S	N#Cc1cccc(c1)C[NH+][1CC[C@@H](C1)c1nc2c(o1)ccc(c2)S(=O)(=O)CC	396,48
40	ZINC0002 38899386	C21H25NO6	O=C([C@@H](Oc1ccc2c(c1)oc(=O)cc2C)C)NC[C@@H]1CC[C@H](CC1)C(=O)O	387,43

41	ZINC0002 17718807	C20H13N3O6	<chem>COc1cc(cc2c1OCO2)c1c2c[nH]nc2nc2c1oc1c2ccc(c1O)O</chem>	391,33
42	ZINC0001 00245022	C19H12N4O3	<chem>Oc1cn2c(c1c1nc3cccc3c(=O)[nH]1)[nH]c(=O)c1c2cccc1</chem>	344,32
43	ZINC0002 17728714	C20H13N3O5	<chem>Oc1ccc2c(c1O)oc1c2nc2c(c1c1ccc3c(c1)OCCO3)c[nH]n2</chem>	375,33
44	ZINC0004 09415362	C22H15N3O4	<chem>Oc1cc(=O)c2c(c1)oc1c2[nH]c2c(c1C1=Cc3c(OC1)cccc3)cnn2C</chem>	385,37
45	ZINC0004 09415542	C21H15N3O5	<chem>Oc1cc(=O)c2c(c1)oc1c2[nH]c2c(c1c1ccc3c(c1)OCCO3)cnn2C</chem>	389,36

ANEXO E. Lipofilicidade dos produtos naturais por SwissADME.

Nº	ZINC ID	iLOGP	XLOGP3	WLOGP	MLOGP	Silicos-IT Log P	Consensus Log P
1	ZINC000096221711	2,24	3,55	4,10	3,13	4,24	3,45
2	ZINC000217739254	2,07	3,31	4,08	2,40	4,46	3,26
3	ZINC000253415056	3,11	3,54	4,09	2,86	3,35	3,39
4	ZINC000000519085	3,13	3,87	3,99	2,49	4,62	3,62
5	ZINC000253623637	2,72	3,36	4,08	2,65	3,88	3,34
6	ZINC000096221187	1,82	3,34	4,07	2,70	4,42	3,27
7	ZINC000000138791	3,29	4,51	4,38	3,12	5,09	4,08
8	ZINC000000238468	3,32	4,15	4,38	2,31	5,09	3,85
9	ZINC000217743874	2,07	3,31	4,08	2,40	4,46	3,26
10	ZINC000217827813	2,29	3,52	4,34	1,59	4,33	3,21
11	ZINC000253403161	3,23	3,82	4,40	2,81	3,59	3,57
12	ZINC000252485574	2,92	4,20	4,79	2,70	3,75	3,67
13	ZINC000253406567	3,24	3,72	3,98	2,01	3,20	3,23
14	ZINC000409415519	2,65	3,00	3,79	2,13	3,39	2,99
15	ZINC000011867457	3,39	3,36	3,83	2,48	5,36	3,68
16	ZINC000217904353	2,32	3,80	4,39	2,59	4,13	3,44
17	ZINC000004000106	3,49	4,12	4,10	3,87	5,12	4,14
18	ZINC000002123626	3,38	3,47	2,96	2,79	4,04	3,33
19	ZINC000217901212	2,46	3,60	4,01	1,87	3,95	3,18
20	ZINC000217758207	2,27	3,26	4,00	1,90	3,92	3,07
21	ZINC000217613187	2,32	3,70	3,97	2,06	3,73	3,15
22	ZINC000253413297	3,02	3,75	3,97	2,31	3,16	3,24
23	ZINC000000630267	3,57	4,05	4,05	2,71	5,51	3,98
24	ZINC000000519122	3,15	4,61	4,34	3,31	4,86	4,05
25	ZINC000000630250	3,12	4,23	3,94	2,30	4,67	3,65
26	ZINC000002101104	3,22	3,50	3,27	2,26	4,78	3,41
27	ZINC000002117748	3,15	3,10	2,65	2,56	3,54	3,00
28	ZINC000004090657	3,51	2,87	2,68	2,45	3,24	2,95
29	ZINC000011867465	3,41	3,47	3,70	2,70	5,44	3,74
30	ZINC000020714451	2,41	2,29	1,57	0,32	3,03	1,92
31	ZINC000217824009	2,12	3,55	4,34	1,89	4,28	3,24
32	ZINC000217905233	2,29	3,44	4,09	2,06	3,63	3,10
33	ZINC000096220848	2,15	3,36	3,96	2,08	3,70	3,05
34	ZINC000253623949	2,88	3,72	4,39	2,86	4,40	3,65

35	ZINC000001504468	2,81	2,65	3,10	1,96	4,05	2,91
36	ZINC000006345037	2,67	4,09	3,63	1,48	4,68	3,31
37	ZINC000020412587	2,85	4,15	3,78	1,95	3,85	3,32
38	ZINC000055393785	3,74	3,29	1,26	-0,72	4,51	2,41
39	ZINC000035446879	3,40	2,84	2,61	-1,72	3,36	2,10
40	ZINC000238899386	2,70	2,53	2,88	1,89	3,27	2,65
41	ZINC000217718807	2,13	3,35	3,67	1,55	3,24	2,79
42	ZINC000100245022	2,25	1,64	2,39	2,19	3,09	2,31
43	ZINC000217728714	2,30	2,91	3,71	1,38	3,43	2,75
44	ZINC000409415362	2,73	1,47	3,69	2,21	3,73	2,76
45	ZINC000409415542	2,71	1,30	3,30	1,54	3,52	2,47

ANEXO F. Solubilidade em água dos produtos naturais por SwissADME

Nº	ZINC ID	ESOL		
		Log S	Solubilidade (mg/L)	Classe
1	ZINC000096221711	-5,10	3,15	Moderadamente solúvel
2	ZINC000217739254	-4,90	4,96	Moderadamente solúvel
3	ZINC000253415056	-5,10	3,13	Moderadamente solúvel
4	ZINC000000519085	-4,75	5,96	Moderadamente solúvel
5	ZINC000253623637	-4,92	4,54	Moderadamente solúvel
6	ZINC000096221187	-4,85	5,21	Moderadamente solúvel
7	ZINC000000138791	-5,26	1,83	Moderadamente solúvel
8	ZINC000000238468	-5,03	3,09	Moderadamente solúvel
9	ZINC000217743874	-4,90	4,96	Moderadamente solúvel
10	ZINC000217827813	-5,04	3,62	Moderadamente solúvel
11	ZINC000253403161	-5,05	3,28	Moderadamente solúvel
12	ZINC000252485574	-5,38	1,53	Moderadamente solúvel
13	ZINC000253406567	-5,03	3,66	Moderadamente solúvel
14	ZINC000409415519	-4,78	6,68	Moderadamente solúvel
15	ZINC000011867457	-4,66	8,29	Moderadamente solúvel
16	ZINC000217904353	-4,97	3,77	Moderadamente solúvel
17	ZINC000004000106	-4,95	3,83	Moderadamente solúvel
18	ZINC000002123626	-4,59	8,95	Moderadamente solúvel
19	ZINC000217901212	-4,95	4,35	Moderadamente solúvel
20	ZINC000217758207	-4,66	7,89	Moderadamente solúvel
21	ZINC000217613187	-4,95	4,24	Moderadamente solúvel
22	ZINC000253413297	-4,97	3,87	Moderadamente solúvel
23	ZINC000000630267	-4,88	5,09	Moderadamente solúvel
24	ZINC000000519122	-5,26	1,75	Moderadamente solúvel
25	ZINC000000630250	-5,09	3,04	Moderadamente solúvel
26	ZINC000002101104	-4,48	12,1	Moderadamente solúvel
27	ZINC000002117748	-4,29	17,2	Moderadamente solúvel
28	ZINC000004090657	-4,16	24,9	Moderadamente solúvel
29	ZINC000011867465	-4,79	6,35	Moderadamente solúvel
30	ZINC000020714451	-3,57	99,9	Solúvel

31	ZINC000217824009	-4,99	3,8	Moderadamente solúvel
32	ZINC000217905233	-4,82	5,56	Moderadamente solúvel
33	ZINC000096220848	-4,66	7,59	Moderadamente solúvel
34	ZINC000253623949	-5,22	2,41	Moderadamente solúvel
35	ZINC000001504468	-3,92	43	Solúvel
36	ZINC000006345037	-5,21	2,42	Moderadamente solúvel
37	ZINC000020412587	-4,99	3,75	Moderadamente solúvel
38	ZINC000055393785	-4,55	10,7	Moderadamente solúvel
39	ZINC000035446879	-4,15	27,8	Moderadamente solúvel
40	ZINC000238899386	-3,64	89,1	Solúvel
41	ZINC000217718807	-4,81	6,12	Moderadamente solúvel
42	ZINC000100245022	-3,60	87,2	Solúvel
43	ZINC000217728714	-4,52	11,4	Moderadamente solúvel
44	ZINC000409415362	-3,65	86,1	Solúvel
45	ZINC000409415542	-3,57	105	Solúvel

ANEXO G. Parâmetros farmacocinéticos dos produtos naturais por SwissADME

Nº	ZINC ID	Absorção GI	Perm. BBB	P-gp substrato	Inibidor CYP				
					*1A2	*2C19	*P2C9	*2D6	*3A4
1	ZINC000096221711	Alto	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
2	ZINC000217739254	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
3	ZINC000253415056	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
4	ZINC000000519085	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
5	ZINC000253623637	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
6	ZINC000096221187	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
7	ZINC000000138791	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
8	ZINC000000238468	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
9	ZINC000217743874	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
10	ZINC000217827813	Alto	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não
11	ZINC000253403161	Alto	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
12	ZINC000252485574	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
13	ZINC000253406567	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
14	ZINC000409415519	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
15	ZINC000011867457	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
16	ZINC000217904353	Alto	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
17	ZINC000004000106	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
18	ZINC000002123626	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
19	ZINC000217901212	Alto	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
20	ZINC000217758207	Alto	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
21	ZINC000217613187	Alto	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
22	ZINC000253413297	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
23	ZINC000000630267	Alto	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
24	ZINC000000519122	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
25	ZINC000000630250	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
26	ZINC000002101104	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

27	ZINC000002117748	Alto	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
28	ZINC000004090657	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
29	ZINC000011867465	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
30	ZINC000020714451	Baixo	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
31	ZINC000217824009	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
32	ZINC000217905233	Alto	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
33	ZINC000096220848	Alto	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
34	ZINC000253623949	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não
35	ZINC000001504468	Alto	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim
36	ZINC000006345037	Alto	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
37	ZINC000020412587	Alto	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não
38	ZINC000055393785	Alto	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
39	ZINC000035446879	Alto	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim
40	ZINC000238899386	Alto	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim
41	ZINC000217718807	Alto	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
42	ZINC000100245022	Alto	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
43	ZINC000217728714	Alto	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
44	ZINC000409415362	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim
45	ZINC000409415542	Alto	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim

ANEXO H. Semelhança a medicamentos dos produtos naturais por SwissADME

Nº	ZINC ID	Violações nas regras de:					Score de biodisp,	Acess, de síntese
		Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge		
1	ZINC000096221711	0	0	0	0	0	0,55	3,32
2	ZINC000217739254	0	0	0	0	0	0,55	3,33
3	ZINC000253415056	0	0	0	0	0	0,55	3,37
4	ZINC000000519085	0	0	0	0	0	0,55	3,56
5	ZINC000253623637	0	0	0	0	0	0,55	3,25
6	ZINC000096221187	0	0	0	0	0	0,55	3,22
7	ZINC000000138791	0	0	0	0	0	0,55	3,31
8	ZINC000000238468	0	0	0	0	0	0,55	3,26
9	ZINC000217743874	0	0	0	0	0	0,55	3,32
10	ZINC000217827813	0	0	0	0	0	0,55	3,40
11	ZINC000253403161	0	0	0	0	0	0,55	3,58
12	ZINC000252485574	0	0	0	0	0	0,55	3,13
13	ZINC000253406567	0	0	0	0	0	0,55	3,36
14	ZINC000409415519	0	0	0	0	0	0,55	3,32
15	ZINC000011867457	0	0	0	0	0	0,55	4,09
16	ZINC000217904353	0	0	0	0	0	0,55	3,51
17	ZINC000004000106	0	0	0	0	0	0,55	3,42
18	ZINC000002123626	0	0	0	0	0	0,55	3,57
19	ZINC000217901212	0	0	0	0	0	0,55	3,42
20	ZINC000217758207	0	0	0	0	0	0,55	3,24
21	ZINC000217613187	0	0	0	0	0	0,55	3,32
22	ZINC000253413297	0	0	0	0	0	0,55	3,17

23	ZINC000000630267	0	0	0	0	0	0,55	3,77
24	ZINC000000519122	0	0	0	0	0	0,55	3,24
25	ZINC000000630250	0	0	0	0	0	0,55	3,32
26	ZINC000002101104	0	0	0	0	0	0,55	3,62
27	ZINC000002117748	0	0	0	0	0	0,55	3,44
28	ZINC000004090657	0	0	0	0	0	0,55	3,89
29	ZINC000011867465	0	0	0	0	0	0,55	4,24
30	ZINC000020714451	0	0	1	1	0	0,55	3,62
31	ZINC000217824009	0	0	0	0	0	0,55	3,26
32	ZINC000217905233	0	0	0	0	0	0,55	3,58
33	ZINC000096220848	0	0	0	0	0	0,55	3,14
34	ZINC000253623949	0	0	0	0	0	0,55	3,38
35	ZINC000001504468	0	0	0	0	0	0,56	3,79
36	ZINC000006345037	0	0	0	0	0	0,55	3,31
37	ZINC000020412587	0	0	0	0	0	0,56	3,08
38	ZINC000055393785	0	0	0	0	0	0,55	3,82
39	ZINC000035446879	0	0	0	0	0	0,55	3,88
40	ZINC000238899386	0	0	0	0	0	0,56	4,18
41	ZINC000217718807	0	0	0	0	0	0,55	3,40
42	ZINC000100245022	0	0	0	0	0	0,55	2,75
43	ZINC000217728714	0	0	0	0	0	0,55	3,32
44	ZINC000409415362	0	0	0	0	0	0,55	3,65
45	ZINC000409415542	0	0	0	0	0	0,55	3,38