

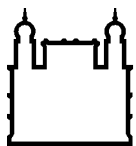
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Computacional e
Sistemas

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA INTERAÇÃO ENTRE O RECEPTOR
GABA_A E METALOCOMPOSTOS DERIVADOS DE
BENZODIAZEPÍNICOS

RONALD SODRE MARTINS

Rio de Janeiro
Março de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação Biologia Computacional e Sistemas

RONALD SODRE MARTINS

Avaliação *in silico* da interação entre o receptor GABA_A e metalocompostos derivados de benzodiazepínicos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Computacional e Sistemas

Orientador: Dr. Ernesto Raul Caffarena.

RIO DE JANEIRO

Março de 2019

Martins, Ronald Sodre.

Avaliação *in silico* da interação entre o receptor GABAA e metalocompostos derivados de *benzodiazepínicos* / Ronald Sodre Martins. - Rio de Janeiro, 2019.

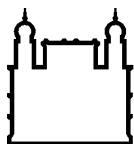
124 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2019.

Orientador: Ernesto Raul Caffarena.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Ácido gama-Aminobutírico receptor. 2. Organometallic Compounds . 3. Molecular Docking Simulation. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação Biologia Computacional e Sistemas

AUTOR: RONALD SODRE MARTINS

Avaliação *in silico* da interação entre o receptor GABA_A e compostos de coordenação derivados de benzodiazepínicos

ORIENTADOR: Dr. Ernesto Raul Caffarena.

Aprovado em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Ana Carolina Ramos Guimarães. IOC/Fiocruz - Presidente e Revisor

Prof. Dr. André Silva Pimentel. PUC/Rio

Prof. Dr. Lucas Villas Boas Hoelz. Farmanguinhos/Fiocruz

Prof. Dr. Paulo Ricardo Batista. PROCC/Fiocruz - Suplente

Prof. Dr. Laurent Emmanuel Dardenne. LNCC - Suplente




Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Computacional e Sistemas de **Ronald Sodré Martins**, sob orientação do Dr. Ernesto Raúl Caffarena e Dr. Pedro Henrique Monteiro Torres. Ao vigésimo sexto dia do mês de março de dois mil e dezenove, realizou-se às dez horas, no Auditório Maria Deane - Pavilhão Leonidas Deane, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Avaliação *in silico* da interação entre o receptor GABAA e metalocompostos derivados de benzodiazepínicos**", no programa de Pós-graduação em Biologia Computacional e Sistemas do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Biologia Molecular Estrutural, na linha de pesquisa: Abordagens Computacionais no desenvolvimento de Fármacos e Vacinas. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Ana Carolina Ramos Guimarães - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. André Silva Pimentel - PUC/RJ, Dr. Lucas Villas Bôas Hoelz - FIOCRUZ/RJ e como suplentes: Dr. Paulo Ricardo Batista - PROCC/FIOCRUZ e Dr. Laurent Emmanuel Dardenne - LNCC/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa Dr^a. Ana Carolina Ramos Guimarães, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 26 de março de 2019.

Dr^a. Ana Carolina Ramos Guimarães (Presidente da Banca e Coordenadora do Programa): 

Dr. André Silva Pimentel (Membro da Banca): 

Dr. Lucas Villas Bôas Hoelz (Membro da Banca): 

Dedico essa dissertação ao meu avô paterno Reginaldo (*in memoriam*). Por cada conversa, risada, conselho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo suporte, fé, sacrifícios e por toda educação que eu recebi, jamais chegaria aonde cheguei sem ajuda deles, meus mais sinceros agradecimentos. Quero agradecer às minhas avós Lili e Neuza, e minha irmã Rianne, por sempre acreditarem no meu potencial, até quando eu mesmo duvidava da minha capacidade.

Quero agradecer ao meu tio Péricles e ao meu avô Naldo. Cada um com seu jeito, ambos sempre foram inspirações para minha vida. Mesmo depois de partirem. Tenho certeza que sentem grande orgulho de mim, aonde quer que estejam.

Agradeço o meu orientador, Dr. Ernesto Caffarena, pela dedicação, paciência e ensinamentos. Aprendi muito nos últimos anos. Cada bronca e chamada no estacionamento valeram a pena.

Aos membros da banca, por terem gentilmente aceitado o convite para participar da avaliação desse trabalho.

Nesses últimos anos, conheci pessoas incríveis. Pessoas que estiveram do meu lado nos momentos bons e ruins, principalmente nos ruins. Me fizeram superar obstáculos, riram comigo e me abraçaram quando eu precisei. Aprendi tanto com essas pessoas. Eu conheci uma nova família. E vou sempre os levar no meu coração.

Rafael e Vanessa foram meus irmãos científicos mais velhos. Sempre estiveram comigo, me ajudando, me ensinando. Não tinham obrigação de me ajudar como o fizeram, mas com um sorriso no rosto, o fizeram. Não importava quão confuso e perdido eu estivesse, eles eram a minha luz. Não tenho palavras para agradecer-los.

Quando entrei no mestrado, tive o prazer e a honra de conhecer três mulheres incríveis: Alessandra, Gisele e Aline. Como eu admiro a força e o caráter que elas possuem. Aprendi muito com a garra e determinação dessas garotas lindas. Tenho um grande carinho e admiração por elas.

Jamais poderia esquecer de citar meus outros irmãos: Artur, Valdemir, Pedro e Lucas. Como eu amo essas carinhas. Artur foi um raio que caiu do céu em dia ensolarado; sem aviso prévio, me conquistou com seu jeito sempre alto astral e bem-humorado. Valdemir foi um grande amigo, sempre ouvinte e presente, e levantava a dose de humor com suas frases clássicas. Pedro foi meu irmão mais novo, aprendi muito com ele, um grande amigo que o universo me deu; não importava como as coisas estavam ruins, nunca desistíamos. Lucas demorou um pouquinho, mas me conquistou depois que deixou cair a armadura e permitiu ser aceito nessa família; seja muito bem-vindo.

Quero agradecer as outras pessoas incríveis que o universo me apresentou durante esse mestrado: Chris, Lucas Machado, Fernando, Lívia, Rocio, Liliane, Matheus, Raquel, Letícia e Lia.

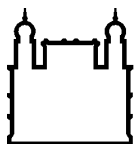
Talvez eles não saibam, mas cada momento que eu estive ao lado dessa família, cada risada, cada conversa, cada olhar, cada abraço, cada segundo, me deu forças e conhecimento para chegar até onde cheguei. Não conheço palavras que descrevam a importância que eles estiveram na minha vida. Eu só posso agradecer por tudo, muito obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que esse trabalho se tornasse possível, meus mais sinceros agradecimentos. “Nenhum empreendimento é realizado de forma fácil e sem esforço”.

"– Gostei da capa – disse ele. – Não entre em pânico. Foi a primeira coisa sensata e inteligível que me disseram hoje."

Douglas Adams (1952 - 2001)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação *in silico* da interação entre o receptor GABA_A e metalocompostos derivados de benzodiazepínicos

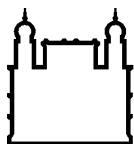
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA COMPUTACIONAL E SISTEMAS

Ronald Sodre Martins

O receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo A (GABA_A) é o receptor de ação rápida mais amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos. Os receptores GABA_A são canais iônicos pentaméricos transmembranares e apresentam alta heterogeneidade entre suas subunidades. Quando estes receptores são ativados pelo neurotransmissor GABA, permitem a passagem de íons cloreto para dentro dos neurônios, resultando em uma hiperpolarização destas células, as tornando menos reativas a neurotransmissores excitatórios. Os receptores GABA_A são alvos de vários grupos farmacológicos com propriedades anestésicas e sedativas. A ativação destes receptores pode ser modulada por diferentes grupos de compostos, incluindo os benzodiazepínicos (BZDs), que se tornaram o grupo farmacológico prescrito mais consumido no mundo, sendo indicados no tratamento de ansiedade, insônia, relaxamento muscular e epilepsia. Apesar de serem indicados no tratamento em diversas manifestações clínicas, podem apresentar efeitos adversos, como comprometimento da memória, síndrome de descontinuação, além da sua ineficiência no tratamento em alguns casos de epilepsia. Nesse contexto, é importante identificar e desenvolver novos compostos que apresentem as mesmas características e eficiência dos BZDs clássicos, porém minimizando seus efeitos adversos. Uma abordagem interessante é a síntese de compostos de coordenação, a partir da associação entre compostos orgânicos com elementos metálicos a partir dos BZDs clássicos, como o diazepam. Neste trabalho, foi analisada a interação do receptor GABA_A com cinco compostos de coordenação derivados do diazepam com íon paládio ($[(DZP)PdOAcPPh_3]$, $[(DZP)PdClPPh_3]$, $[(DZP)PdClPy]$, $[(DZP)PdCl]_2$ e $[(DZP)PdOAc]_2$) em um modelo heteropentamérico da principal combinação de isoformas do receptor GABA_A ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$) construído pela técnica de

modelagem comparativa. Com o intuito de prever a pose dos ligantes, foram realizadas simulações de *docking* molecular entre os compostos de coordenação e o diazepam com o receptor GABA_A, utilizando o *software* AutoDock. Nossos resultados indicam que os compostos de coordenação apresentaram energia livre de ligação estimada mais baixa que o ligante diazepam, com destaque para o composto o [(DZP)PdOAc]₂. Foram identificados quatro resíduos que aparentemente contribuem para a interação proteína-ligante: His101(α₁), Ser204(α₁), Tyr58(γ₂) e Phe77(γ₂). O metal paládio incluso nos compostos de coordenação apresentou um papel de estabilidade estrutural, conferindo um maior número de interações com o receptor GABA_A no sítio dos benzodiazepínicos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of the interaction between GABA_A receptor and organometallics derived from benzodiazepines in silico

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN COMPUTATIONAL BIOLOGY AND SYSTEMS

Ronald Sodre Martins

The γ -Aminobutyric acid type A receptor (GABA_A) is the most distributed rapid-action receptor in the central nervous system (CNS). GABA_A receptors are transmembrane pentameric ion channels and show high heterogeneity of their subunits. When the neurotransmitter GABA activates these receptors, they allow the chloride ions passage into neurons, resulting in hyperpolarization of these cells, resulting in a cell hyperpolarization, making them less reactive to excitatory neurotransmitters. GABA_A receptors are the target of various pharmacological groups with anaesthetic and sedative properties. The activation of these receptors can be modulated by different groups of compounds, including benzodiazepines (BZD), which have become the most widely used and prescribed pharmacological group worldwide and are prescribed for the anxiety, insomnia, muscle relaxation and epilepsy treatment. Although they are indicated for the treatment of several clinical manifestations, they may have adverse effects, such as memory impairment, discontinuation syndrome, and inefficiency in some cases of epilepsy treatment as well. In this context, it is imperative to identify and develop new compounds presenting the same classic BZD characteristics and efficiency but reducing their adverse effects. An interesting approach is the synthesis of metallocompound from the association between metallic elements and an organic compound, such as diazepam. In this work, the GABA_A receptor interaction between five metallocompounds derived from diazepam including palladium ion ($[(DZP)PdOAcPPh_3]$, $[(DZP)PdClPPh_3]$, $[(DZP)PdClPy]$, $[(DZP)PdCl]_2$ and $[(DZP)PdOAc]_2$) and a heteropentameric model of GABA_A receptor main combination isoforms ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$) built using the comparative modeling technique was studied. In order to predict the ligands conformation, molecular docking simulations were performed between the diazepam-derived organometallics and the GABA_A receptor model, using AutoDock software. Our results indicate that the organometallics showed lower

free binding energy than diazepam ligand, with emphasis on the [(DZP)PdOAc]₂ compound. Four residues were identified that appear to contribute to the protein-ligand interaction: His101(α₁), Ser204(α₁), Tyr58(γ₂) and Phe77(γ₂). The palladium metal included in the organometallics presented a role of structural stability, providing a greater number of interactions with the GABA_A receptor at the benzodiazepine site.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Epilepsia.....	19
1.2. Ácido gama-aminobutírico (GABA).....	20
1.3. Receptores GABA.....	21
1.3.1. Receptores GABA _A	23
1.3.1.1 Sítios de ligação do GABA _A	25
1.4. Benzodiazepínicos.....	29
1.4.1 Diazepam.....	31
1.4.2 Efeitos colaterais e limitações.....	32
1.5. Compostos de coordenação.....	33
1.5.1. Complexos metálicos derivados de paládio.....	34
1.6. Predição de estruturas tridimensionais proteicas.....	35
1.7. <i>Docking</i> molecular.....	42
1.8. Justificativa.....	44
2. Objetivos.....	45
2.1 Objetivo Geral.....	45
2.2 Objetivos Específicos.....	45
3. Metodologia.....	46
3.1. Modelagem comparativa do receptor GABA _A ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$).....	46
3.1.1. Matrizes de alinhamento.....	46
3.1.2. Identificação das sequências.....	47
3.1.3. Construção do modelo.....	48
3.1.4. Avaliação do modelo.....	49
3.1.5. Identificação de resíduos do sítio dos BZDs.....	50
3.2. Construção e parametrização dos ligantes.....	50
3.2.1. Preparação dos compostos de coordenação.....	51
3.3. Simulação de <i>docking</i> molecular.....	51
4. Resultados e discussão.....	54
4.1. Construção dos modelos do receptor GABA _A	54
4.1.1. Modelo GABA _A dimérico.....	62
4.1.2. Modelo GABA _A pentamérico.....	66
4.2. Comparação dos modelos com a literatura.....	74
4.2.1. Dímero.....	74
4.2.2. Pentâmero.....	75
4.3. Sítio ativo dos benzodiazepínicos.....	75
4.4. Construção dos ligantes.....	84
4.5. Ensaio de <i>docking</i> molecular.....	85
4.5.1. <i>Re-docking</i> e <i>cross-docking</i>	86
4.5.2. Diazepam.....	90
4.5.3. Compostos de coordenação com um átomo de paládio.....	93
4.5.4. Compostos de coordenação com dois átomos de paládio.....	100
5. Conclusões.....	106
6. Perspectivas.....	107
7. Referências bibliográficas.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do GABA	20
Figura 2: Síntese e transporte de GABA	22
Figura 3: Esquema do receptor GABA _A e suas subunidades	24
Figura 4: As principais combinações de isoformas das subunidades do receptor GABA _A	25
Figura 5: Esquema da combinação heteropentamérica mais comum do receptor GABA _A	26
Figura 6: Representação da estrutura cristalográfica do receptor GABA _A β ₃ homopentâmero (PDB ID: 4COF)	28
Figura 7: Estruturas bidimensionais de alguns BZDs conhecidos	30
Figura 8: Estrutura bidimensional dos compostos de coordenação derivados de paládio	35
Figura 9: Fluxograma com os passos para modelagem comparativa de estruturas proteicas	37
Figura 10: Comparação entre a identidade do alinhamento e o tamanho das sequências alinhadas	39
Figura 11: Acurácia e aplicação da modelagem estrutural de proteínas	41
Figura 12: Matrizes de identidade das sequências de diferentes organismos de cada isoforma do receptor GABA _A	56
Figura 13: Alinhamento das sequências de cada subunidade do receptor GABA _A agrupando diferentes organismos com o molde do receptor GABA _A β ₃ homopentâmero (PDB ID: 4COF)	61
Figura 14: Representação modelo heterodimérico do receptor GABA _A (γ ₂ α ₁)	63
Figura 15: Perfil de DOPE score da subunidade β ₃ do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) e subunidades do modelo heterodimérico construído	66
Figura 16: Representações do modelo heteropentamérico do receptor GABA _A (γ ₂ α ₁ β ₂ α ₁ β ₂)	68
Figura 17: Perfil de DOPE score da subunidade β ₃ do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) e subunidades do modelo heteropentâmero construído	72
Figura 18: Perfil de DOPE score das subunidades do receptor humano α ₁ β ₂ γ ₂ (PDB ID: 6D6U) e do modelo heteropentâmero construído	73
Figura 19: Representação do sítio de ligação dos benzodiazepínicos do modelo heteropentamérico do receptor GABA _A (γ ₂ α ₁ β ₂ α ₁ β ₂)	76
Figura 20: Mapa de interação do diazepam no receptor dímero GABA _A construído por Richter e colaboradores (Richter <i>et al.</i> , 2012)	77
Figura 21: Estrutura bidimensional dos ligantes	78
Figura 23: Alinhamento das sequências das subunidades α ₁ (A) e γ ₂ (B) do modelo GABA _A com o cristal heteropentamérico humano (PDB ID: 6D6U)	81
Figura 24: Representação do sítio de ligação dos BZDs do GABA _A	83
Figura 25: Mapas de interação do <i>re-docking</i> do flumazenil com o receptor GABA _A α ₁ β ₂ γ ₂ (PDB ID: 6D6U)	87
Figura 27: Pose do flumazenil complexado ao cristal heteropentamérico humano (PDB ID: 6D6U) e seu <i>re-docking</i>	89

Figura 28: Pose do flumazenil complexado ao cristal heteropentamérico humano (PDB ID: 6D6U) e seu <i>cross-docking</i> com o modelo heteropentamérico construído.	90
Figura 29: Mapa de interação do diazepam	92
Figura 30: Análise das interações da pose escolhido do diazepam	92
Figura 31: Mapa de interação do [(DZP)PdOAcPPh3].	95
Figura 32: Mapa de interação do [(DZP)PdClPPh3]	95
Figura 33: Mapa de interação do [(DZP)PdClPy]	96
Figura 34: Análise das interações da pose escolhida do [(DZP)PdOAcPPh3].	97
Figura 35: Análise das interações da pose escolhida do [(DZP)PdClPPh3]	97
Figura 36: Análise das interações da pose escolhida do [(DZP)PdClPy]	98
Figura 37: Mapa de interação do [(DZP)PdCl] ₂	102
Figura 38: Mapa de interação do [(DZP)PdOAc] ₂	103
Figura 39: Análise das interações da pose escolhido do [(DZP)PdCl] ₂	104
Figura 40: Análise das interações da pose escolhido do [(DZP)PdOAc] ₂	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de α_1 , β_2 e γ_2 de GABA _A de mamífero reportadas do banco de dados UniProt utilizadas no alinhamento de múltiplas sequências. .	46
Tabela 2: Avaliação da qualidade estereoquímica do modelo utilizando Ramachandran e ERRAT.....	64
Tabela 3: Avaliação da qualidade estereoquímica do modelo utilizando Ramachandran e ERRAT.....	69
Tabela 4: Valor de RMSD dos resíduos do sítio dos BZDs entre o modelo e o PDB ID: 6D6U, antes e depois do processo de otimização das cadeias laterais.	82
Tabela 5: Interações específicas do <i>re-docking</i>	86
Tabela 6: Interações específicas do <i>cross-docking</i>	88
Tabela 7: Estimativa de energia de ligação do diazepam.....	91
Tabela 8: Interações específicas do diazepam.....	93
Tabela 9: Estimativa de energia de ligação dos compostos de coordenação com um átomo de paládio	94
Tabela 10: Interações específicas dos compostos de coordenação com um átomo de paládio	99
Tabela 11: Estimativa de energia de ligação dos compostos de coordenação com dois átomos de paládio.....	100
Tabela 12: Interações específicas dos compostos de coordenação com dois átomos de paládio	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AChBP - proteínas ligadas à acetilcolina

BZD - benzodiazepínicos

cg - *conjugate gradient*

Cryo-EM - *Cryo-Electron Microscopy*

DOPE - *Discrete Optimized Protein Energy*

DZP - diazepam

ELIC - canais de íons controlados por ligantes de *Erwinia chrysanthemi*

GABA - ácido γ -aminobutírico

GABA_A - receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo A

GABA_B - receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo B

GABA_C - receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo C

GAD - enzima glutamato descarboxilase

GLIC - canais de íons controlados por ligantes de *Gloeobacter violaceus*

GluCl α - canal de cloreto controlado por glutamato

nAChRs - receptores acetilcolina nicotínicos

NMR - *Nuclear magnetic resonance*

pH - potencial de hidrogênio

PLGICs - canais de íons cloreto controlados por ligantes pentaméricos

PME - *Particle mesh Ewald*

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

SNC - sistema nervoso central

st - *steepest descent*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epilepsia

A epilepsia é uma das principais desordens neurológicas, com ampla distribuição, chegando a afetar cerca de 65 milhões de pessoas em todo mundo ^{1,2}. Essa desordem acarreta uma grande carga de discriminação, por motivos de má compreensão e estigma por parte da sociedade; além de estar fortemente associada com uma doença crônica de difícil previsão, o que pode causar perda de autonomia dos pacientes ^{2,3}.

Segundo a classificação mais atual, a epilepsia é caracterizada por alterações crônicas e recorrentes na função das áreas corticais e subcorticais envolvidas. Portanto, grande número de episódios epiléticos são manifestados por alterações sensitivas, emocionais ou cognitivas ⁴.

A epilepsia é recorrentemente relacionada com quadros crônicos e imprevisíveis de convulsões. As convulsões são mudanças breves de mudança no comportamento, acreditando-se que são consequências de uma ação anormal da população de neurônios do córtex cerebral ^{5,6}. O evento mais dramático de alguns quadros de epilepsia é a crise epilética ⁷. Uma crise epilética é resultado de uma passageira sincronização anormal de neurônios, o que causa uma perturbação na comunicação neuronal. Esta perturbação pode produzir vários sintomas e sinais, dependendo da sua origem e nas suas próprias conexões neuronais. É presumido que a origem das convulsões epiléticas é originada em sua maioria pelo aumento da excitação ou redução da inibição da comunicação entre dois neurônios, geralmente associados com o desbalanço de neurotransmissores ².

Os distúrbios convulsivos e síndromes epiléticas foram classificados em mais de quarenta tipos distintos, levando em consideração os sintomas e sinais característicos ⁸. Apesar do avanço no entendimento das crises epiléticas, ainda é necessário uma maior compreensão das suas bases celulares e dos fatores que afetam seu prognóstico ^{8,9}. Atualmente, existem diversas hipóteses propostas para explicar a causa da epilepsia idiopática, incluindo alterações em

sistemas de neurotransmissores, como glutamato, glicina e o ácido gama-aminobutírico (GABA) ¹⁰.

Diversos trabalhos apresentaram fortes relações da atividade do neurotransmissor GABA com episódios de epilepsia ¹¹. A partir de experimentos genéticos em modelos animais, foram observadas evidências que dão suporte ao papel do GABA em quadros de epilepsia, como a redução do número de receptores específicos de GABA com alta afinidade por seu neurotransmissor ¹². Também foram publicados trabalhos que observaram reduções da concentração de GABA e da densidade do receptor específico de GABA em tecidos de pacientes que sofriam crises de epilepsia ¹³⁻¹⁶. Os trabalhos citados reforçam a importância de compreender o mecanismo de ação do sistema do neurotransmissor GABA e sua relação com crises epiléticas.

1.2. Ácido gama-aminobutírico (GABA)

O GABA é considerado o principal neurotransmissor do cérebro de mamíferos e o mais comum no sistema nervoso central (SNC) ¹⁷, possuindo associações na regulação da ansiedade e do estresse ¹⁸⁻²⁰. A atividade em excesso do neurotransmissor GABA pode resultar em sedação, amnésia e ataxia; enquanto o decréscimo desta sinalização pode desencadear excitação, ansiedade, inquietação, insônia e reatividade exagerada ²¹.

A estrutura química do GABA é um ácido aminobutírico, composta por um grupamento amina na extremidade e um ácido carboxílico, cuja fórmula molecular é $C_4H_9NO_2$ (Figura 1).

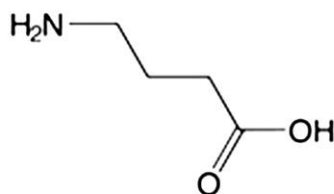


Figura 1: Estrutura química do GABA (Retirado de ²²).

Em meados da década de 1950, o GABA foi proposto como um neurotransmissor inibitório no SNC ²³. Ainda nesta época, alguns trabalhos apresentaram o GABA como uma substância ativa neurofisiológica que inibe a transmissão na junção neuromuscular de invertebrados, mais especificamente em espécies de crustáceos ^{23,24}.

Posteriormente, os estudos foram voltados para a investigação do GABA como transmissor do sistema nervoso em vertebrados. Altas concentrações de GABA foram identificadas na substância cinzenta na medula espinal, mais especificamente na lâmina superficial dos cornos dorsais ²⁵. A enzima glutamato descarboxilase (GAD), que é responsável pela síntese de GABA a partir de L-glutamato, foi localizada na medula espinhal de gatos, sapos e camundongos ^{26,27}. Essas informações estabeleceram o papel do GABA na transmissão sináptica e determinando sua ação como neurotransmissor ²⁸.

1.3. Receptores GABA

O neurotransmissor GABA é sintetizado nos neurônios pré-sinápticos e armazenado nas vesículas sinápticas ²⁹ (Figura 2). Durante ativação neuronal, o GABA é liberado das vesículas (exocitose), onde pode atuar nos seus receptores nos próprios neurônios pré-sinápticos, ou se difundir no meio extracelular (fenda sináptica) e ativar os receptores extra-sinápticos nos neurônios pós sinápticos ³⁰⁻³² (Figura 2). O GABA é capaz de interagir com duas principais classes de receptores: (i) receptores ionotrópicos, o qual a abertura de canais iônicos é causada por ação direta dos neurotransmissores; (ii) os receptores metabotrópicos são ativados também por ação de segundos mensageiros; estas características conferem aos receptores ionotrópicos maior velocidade de neurotransmissão, enquanto os receptores metabotrópicos possuem uma comunicação mais demorada ³³.

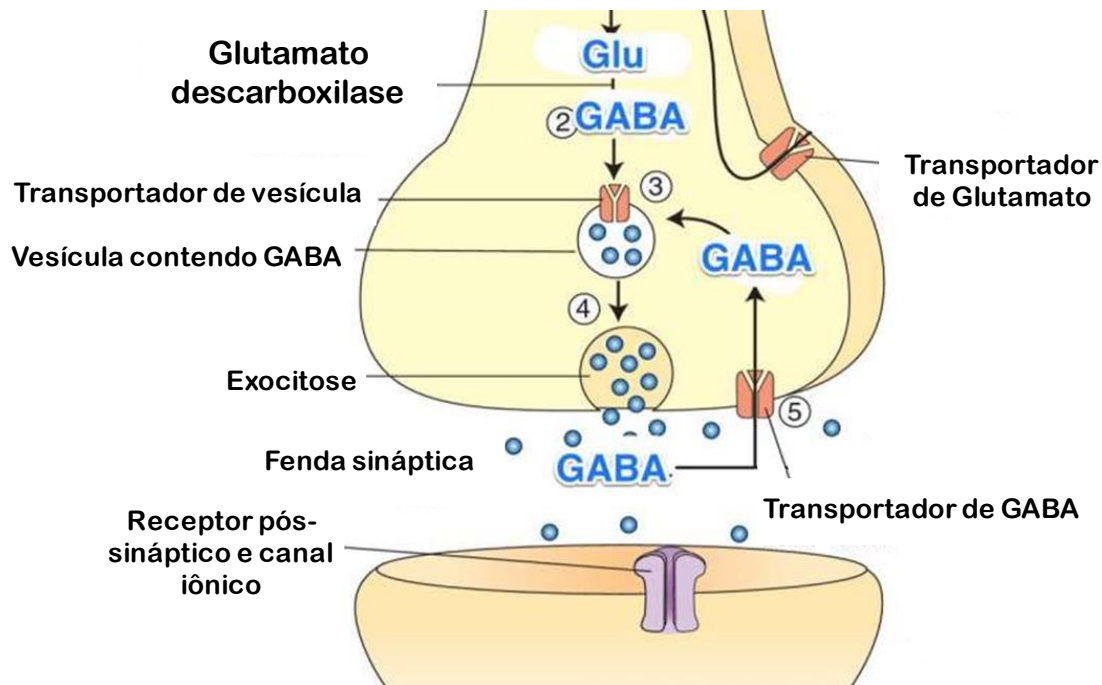


Figura 2: Síntese e transporte de GABA. GABA é sintetizado nos neurônios pré-sinápticos a partir do aminoácido glutamato (Glu) e armazenado em vesículas sinápticas. Quando ocorre ativação neuronal, GABA são liberados das vesículas (exocitose) para a fenda sináptica e atuar em receptores nos neurônios pós-sinápticos. (Adaptado de ³⁴).

Dentro destas classes de receptores, encontram-se três receptores específicos os quais o GABA possui a capacidade de interagir: tipo A ($GABA_A$), tipo B ($GABA_B$) e tipo C ($GABA_C$). Os receptores $GABA_A$ e $GABA_C$ pertencem ao grupo de receptores ionotrópicos de ação rápida; enquanto o receptor $GABA_B$ é um metabotrópico de ação lenta ³³.

Os ionotrópicos pertencem à superfamília *Cys-loop* de canais de íons cloreto controlados por ligantes pentaméricos (PLGICs) e são mediados pela rápida atividade inibitória do neurotransmissor GABA ^{28,35}. O grupo metabotrópico pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G e regulam os canais de K^+ e Ca^{2+} que medeiam as ações inibitórias do GABA a longo prazo³⁶. O receptor $GABA_A$ possui maior destaque em pesquisas clínicas, devido a sua íntima relação com quadros de epilepsia ³⁷ e seu predomínio no SNC de mamíferos ³⁸.

Os receptores $GABA_A$ possuem sítios de ligação para diversos moduladores positivos, incluindo esteroides, etanol, barbitúricos e

benzodiazepínicos ³⁹⁻⁴². Portanto, esses receptores estão envolvidos diretamente com a mediação desses componentes que apresentam propriedades anestésicas e sedativas ⁴³. A interação desses agentes aumenta a atividade inibitória do receptor GABA_A no SNC ⁴⁴. Os efeitos desses agentes em modular a sinalização do neurotransmissor GABA estão associados a diferentes subtipos de receptores GABA_A em diversas regiões cerebrais ⁴³; como exemplo, os efeitos ansiolíticos são mediados por receptores GABA_A contendo a subunidade α_2 no sistema límbico ⁴⁵; enquanto os efeitos sedativos, em especial por compostos da classe dos benzodiazepínicos, são associados com os receptores GABA_A com a subunidade α_1 ⁴⁶.

1.3.1. Receptores GABA_A

Os receptores GABA_A são predominantes no SNC em mamíferos ³⁸. Estima-se que entre 20% a 50% de todas as sinapses centrais contêm receptores ionotrópicos do tipo GABA_A ¹⁸, sendo os principais mediadores da transmissão sináptica inibitória rápida e mais largamente distribuída no SNC humano ⁴⁷.

Estruturalmente, os receptores GABA_A são formados pela combinação de cinco subunidades, que arranjadas em conjunto formam o canal de íon cloreto ⁴⁸ (Figura 3). Cada subunidade é composta por um largo domínio N-terminal extracelular, e quatro α -hélices hidrofóbicas transmembranares (M1-M4), seguidos por um domínio C-terminal extracelular ^{49,50}. Quando o canal é aberto, todas as cinco subunidades se organizam de tal maneira que os seus segundos domínios transmembranares (M2) formam a luz do canal ^{48,49} (Figura 3).

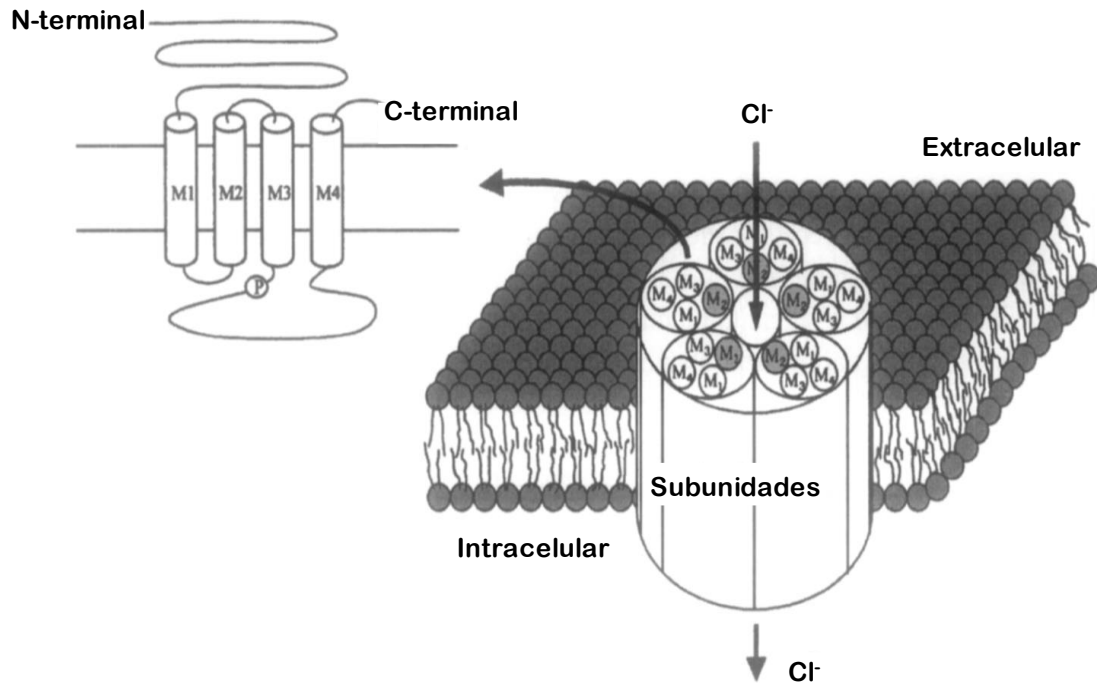


Figura 3: Esquema do receptor GABA_A e suas subunidades. No lado direito, está representada a disposição do receptor GABA_A imerso em bicamada lipídica de eucarioto. Também estão representadas as quatro α-hélices transmembranares em cada subunidade. A seta em preto indica a luz do canal de íons cloreto formado pelas α-hélices M2. No lado esquerdo, está destacada a disposição do domínio N-terminal, as quatro α-hélices transmembranares e o domínio C-terminal. (Adaptado de ⁵⁰).

Até o presente, foram identificadas 19 isoformas que podem constituir os receptores GABA_A, sendo divididas em oito classes: α (α₁-α₆), β (β₁-β₃), γ (γ₁-γ₃); δ, ε, π, Θ e ρ (ρ₁-ρ₃) ^{33,51}. A identidade entre as sequências de aminoácidos dentro de cada classe varia entre 60-80%, entretanto entre diferentes classes é de aproximadamente 30% ⁴⁸. Os genes responsáveis pela codificação destas proteínas são encontrados em diferentes cromossomos ⁵⁰, sendo que cada isoforma possui um padrão único de expressão no SNC de mamíferos ²⁸; portanto, é evidente que existam combinações de isoformas mais comuns. A combinação é de extrema importância, pois irá determinar a afinidade, condutância e outras propriedades dos receptores ⁵².

Estudos em sistema de expressão heteróloga mostraram que a maioria das combinações dos receptores GABA_A é heteropentamérica e são agrupamentos constituídos de duas cópias da subunidade α, duas cópias da subunidade β, e uma cópia da subunidade γ ou alguma outra, como δ ou ε ^{53,54}. Informações de experimentos utilizando técnicas de imunofluorescência

sugerem que há uma alta expressão das subunidades α_1 , β_1 , β_2 , β_3 e γ_2 ao longo do cérebro ⁵⁵. Além disso, é reconhecido que exista especificidade na expressão dos receptores de GABA_A entre diferentes localizações de neurônios ³². A combinação das subunidades $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ do receptor GABA_A é a mais abundante em quase toda a região do cérebro ⁵⁶, porém, vale ressaltar que as combinações $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ e $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ também são altamente prevalentes ⁴⁴ (Figura 4). Combinações contendo a subunidade π são comumente encontradas em órgãos fora do SNC, como útero, próstata, timo e pulmão ⁵⁷. As subunidades β_3 também podem se agrupar de forma eficiente em canais homopentaméricos funcionais e, embora ainda não tenham sido identificadas como populações discretas no cérebro, servem como modelos importantes para os receptores heteropentaméricos ^{47,58}.

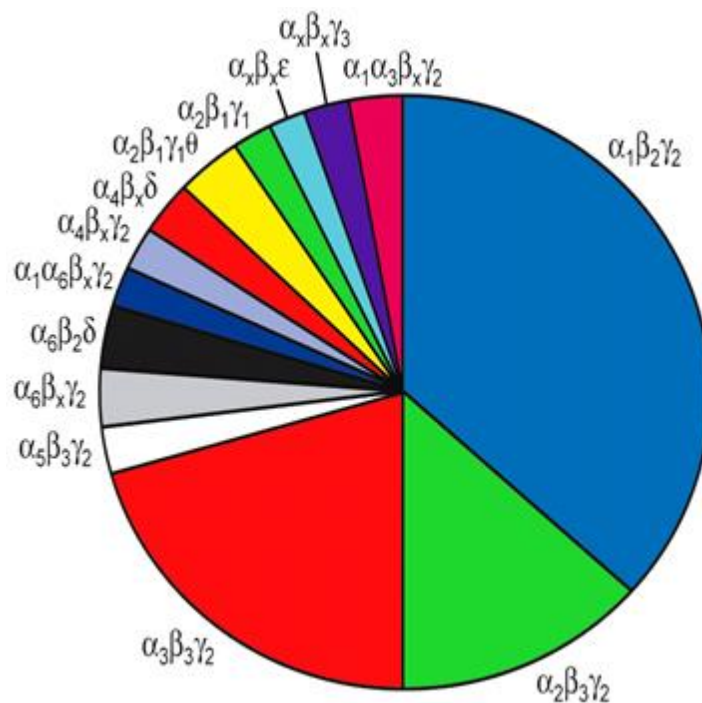


Figura 4: As principais combinações de isoformas das subunidades do receptor GABA_A (Adaptado de ^{44,59}).

1.3.1.1 Sítios de ligação do GABA_A

A ativação do receptor GABA_A pelo neurotransmissor GABA permite a passagem de íons cloreto para o interior da célula, o que resulta em uma

hiperpolarização dos neurônios, tornando as células menos reativas a neurotransmissores excitatórios ^{18,60}.

Os primeiros relatos sobre a afinidade do GABA com o receptor GABA_A, indicaram uma grande discrepância entre diferentes receptores, sendo detectados sítios de ligação com alta e baixa afinidades ^{61,62}. Um receptor GABA_A pode possuir até cinco sítios de ligação de GABA, porém sua afinidade reduz conforme os sítios vão sendo ocupados, por questões de alosteria ⁵⁰. Na combinação mais comum de subunidades no SNC de mamíferos ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$), os sítios de ligação que apresentam maior afinidade com o neurotransmissor GABA estão localizados entre as isoformas α e β , na porção extracelular ⁶³ (Figura 5).

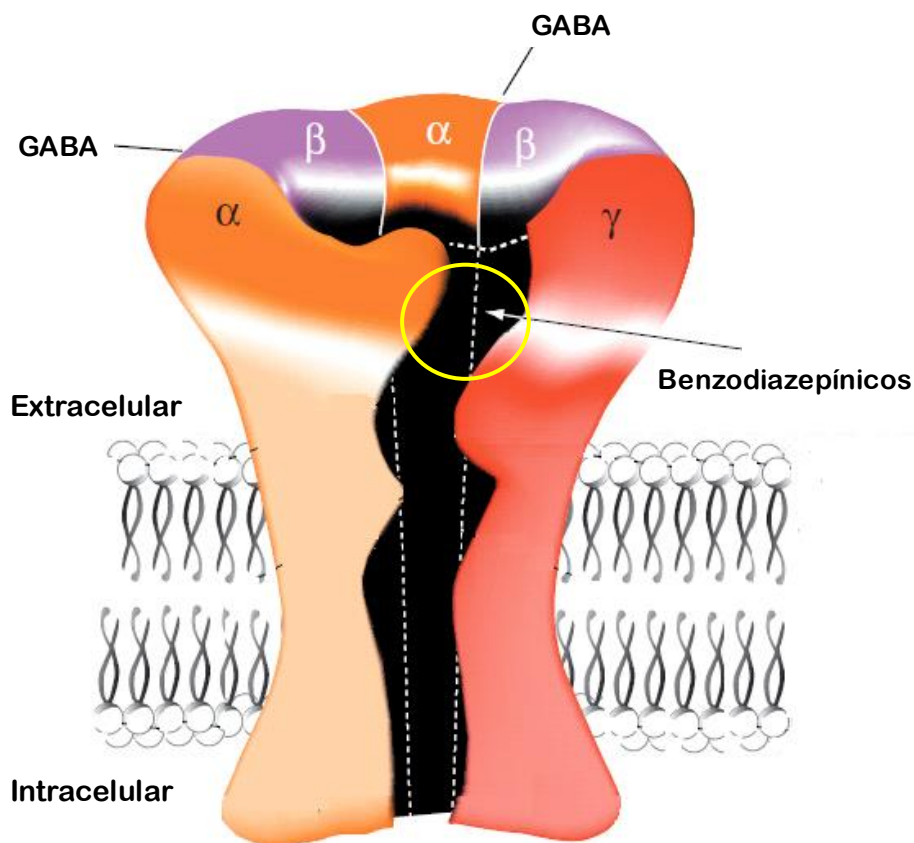


Figura 5: Esquema da combinação heteropentamérica mais comum do receptor GABA_A. Os sítios dos GABA estão localizados entre as subunidades α e β . Em destaque, o sítio de ligação dos benzodiazepínicos entre as subunidades α e γ (adaptado de ³²).

Diversos estudos analisaram a contribuição da diferença das subunidades dos receptores GABA_A no efeito da afinidade dos benzodiazepínicos ^{32,64–66}. Dentre os diversos sítios de ligação, os sítios que contêm uma Histidina na

posição 101 (His101), ou posição equivalente, apresentaram alta afinidade por essa classe de fármacos. Este fenômeno foi observado nos sítios nas subunidades α_1 , α_2 , α_3 e α_5 . Estes sítios são conhecidos como sítio de ligação dos benzodiazepínicos. Em posições equivalentes à His101 da subunidade α_1 , resíduos de Arginina conferem baixa afinidade de ligação aos benzodiazepínicos; isso foi observado nos sítios das subunidades α_4 e α_6 ^{32,63,67,68}. Na combinação de subunidades mais comum do receptor GABA_A ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$), a localização do sítio de ligação dos benzodiazepínicos é distinta da localização do sítio de ligação do neurotransmissor GABA; ambos estão na porção extracelular, porém enquanto o sítio do GABA está localizado entre as subunidades α_1 e β_2 , o sítio de ligação específico dos benzodiazepínicos encontra-se entre as subunidades α_1 e γ_2 ²¹.

Apesar dos avanços para compreender a interação entre os benzodiazepínicos e o receptor GABA_A, a primeira estrutura tridimensional deste receptor só foi determinada experimentalmente em 2015 ⁴⁷. Anterior a este evento, a fim de obter informações estruturais, diversos autores utilizaram proteínas relacionadas nas suas análises ⁶⁹⁻⁷³. A proteína ligada à acetilcolina (AChBP) foi o primeiro molde utilizado para modelar a região extracelular ⁷⁴. A disponibilidade da estrutura heteromultímero de receptores acetilcolina nicotínicos (nAChRs) obtida utilizando microscopia eletrônica, ajudou a compreender os PLGICs pois assim como o receptor GABA_A, essas proteínas também fazem parte desta família ^{75,76}. Posteriormente, as estruturas cristalográficas de dois homólogos bacterianos, um canal iônico controlado por ligantes de *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) ⁷⁷ e um canal iônico controlado por ligantes de *Gloeobacter violaceus* (GLIC) ⁷⁸, assim como a primeira estrutura de um receptor *Cys-loop* aniônico seletivo, o α homopentâmero de canal de cloreto controlado por glutamato (GluCl α) obtido de *Caenorhabditis elegans* ⁷⁹, forneceram informações sobre potenciais mecanismos de interação com ortostéricos e moduladores alostéricos ^{79,80}. Entretanto, a baixa identidade de sequência, sendo inferior a 20%, dos diferentes membros da superfamília PLGICs apresentam considerada variabilidade na interface e na estrutura dos seus sítios de ligação ⁴⁷. Portanto, esses modelos isoladamente não são capazes de explicar adequadamente fenômenos como a ligação e modulação

da interação com os ligantes, mecanismos de abertura do canal, ou até mesmo numerosas mutações humanas relacionadas com quadros de epilepsia ⁴⁷.

Como dito anteriormente, a primeira estrutura cristalográfica do receptor GABA_A (PDB ID: 4COF) foi publicada em 2015 (Figura 6) ⁴⁷. Essa estrutura é um β_3 homopentâmero em um estado fechado dessensibilizado. A obtenção desse modelo foi feita usando a técnica de difração de raio-x com resolução de 2,97Å. Essa estrutura é de grande importância, pois fornece informações a respeito da sua estrutura e funcionalidade, assim como providencia um molde para a construção de modelos heteropentaméricos do receptor GABA_A, conseqüentemente auxiliando em estudos para análises de ligação de compostos biologicamente ativos ^{47,81}.

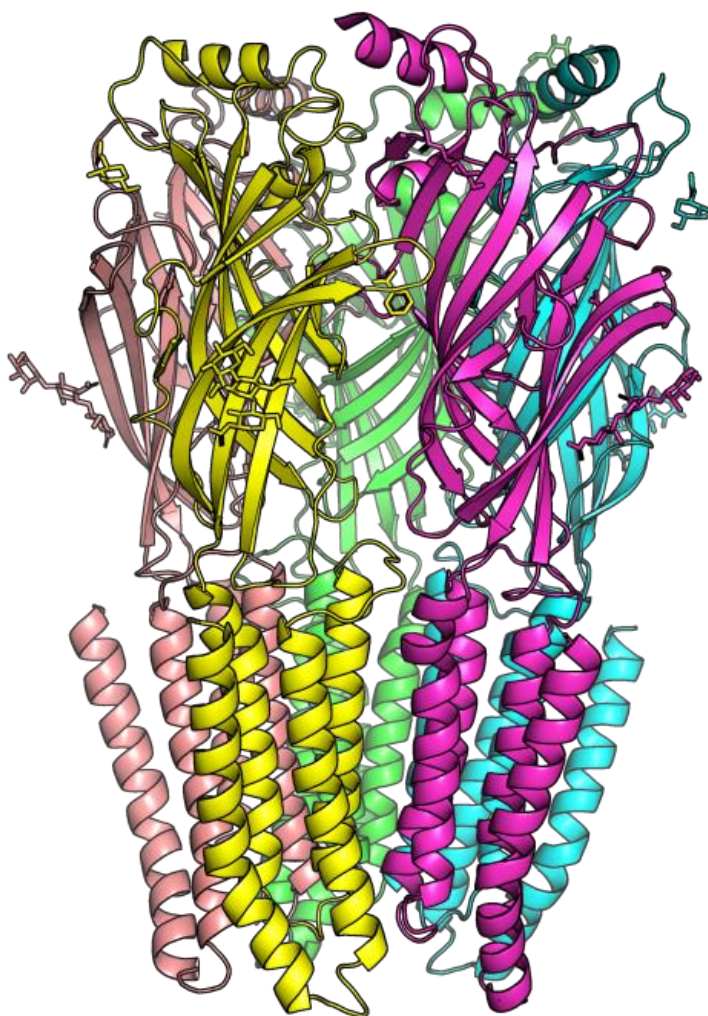


Figura 6: Representação da estrutura cristalográfica do receptor GABA_A β_3 homopentâmero (PDB ID: 4COF). Foi utilizado o programa PyMol ⁸². Cada cor representa uma das subunidades.

Como já comentado, em termos fisiológicos, o neurotransmissor GABA se liga com alta afinidade entre as subunidades β e α , e os benzodiazepínicos se ligam com alta afinidade entre as subunidades α e γ ^{35,83}. Portanto, as estruturas dos membros da superfamília PLGICs e o modelo β_3 homopentamérico não reportam informações estruturais sobre os receptores GABA_A heteropentaméricos e suas características quanto à interação com esses ligantes e seus mecanismos.

Em 2018, foram publicados os primeiros modelos heteropentaméricos humano do receptor GABA_A, por microscopia crio-eletrônica, com resoluções aproximadas de 3,9 Å⁸⁴. Foram reportadas duas estruturas da principal combinação ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$) de GABA_A em conformações aberta ou fechada (PDB ID: 6D6U e 6D6T). Recentemente, foram publicados outros modelos heteropentaméricos do receptor GABA_A, por microscopia crio-eletrônica^{85–88}. A estrutura com a combinação $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ (PDB ID: 6DW0) possui resolução de 3,8 Å sendo oriunda de *Rattus norvegicus*. A estrutura heteropentamérica $\alpha_5\beta_3$ humana (PDB ID: 6A96) possui uma subunidade α_5 e quatro subunidades β_3 , com resolução de 3,5 Å⁸⁷. A estrutura $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ humana (PDB ID: 6I53) foi depositada no banco de dados PDB com resolução 3,2 Å⁸⁶. Foram depositados no PDB cinco complexos com a estrutura heteropentamérica $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ humana (PDB ID: 6HUG, 6HUJ, 6HUK, 6HUO e 6HUP) com resoluções 3,1Å; 3,04Å; 3,69Å; 3,26Å e 3,58Å, respectivamente⁸⁵.

Estas estruturas auxiliam e fornecem informações sobre os posicionamentos atômicos dos resíduos que participam no reconhecimento e modulação do GABA e de outros ligantes, como os BZDs, pelo receptor GABA_A; além de esclarecer algumas características quanto suas estruturas e auxiliam nas abordagens racionais para direcionamento terapêutico deste receptor para distúrbios neurológicos e doenças mentais⁸⁴.

1.4. Benzodiazepínicos

Em meados da década de 1960, foi lançado comercialmente o composto pioneiro dos benzodiazepínicos (BZDs), o clordiazepóxido⁸⁹. Devido à sua baixa aderência comercial, ocorreu a síntese de diversos derivados a partir de

modificações estruturais (Figura 7). Desde então, houve novas descobertas de compostos desta classe, incluindo os de ação rápida (ex: midazolam), ação prolongada (ex: lorazepam) e ação intermediária (ex: diazepam) ⁴³. Estima-se que os BZDs são a classe de fármacos mais utilizados e prescritos em todo mundo ⁸⁹⁻⁹². Vale destacar que todos os BZDs possuem um anel 1-4 benzodiazepina, formado pela fusão de um anel benzeno com um diazepínico, o que confere a característica química principal desta classe.

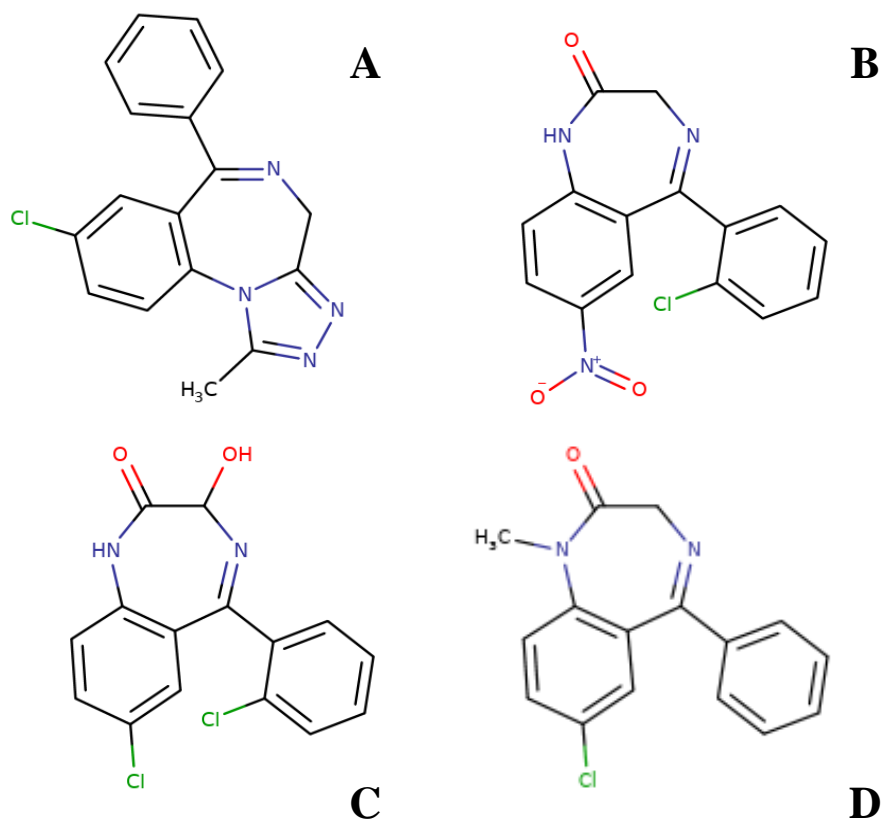


Figura 7: Estruturas bidimensionais de alguns BZDs conhecidos: A) Alprazolam (Xanax), B) Clonazepam (Klonopin), C) Lorazepam (Ativan), D) Diazepam (Valium®). Construídos no programa MarvinSketch v 17.15 ⁹³.

A popularidade dos BZDs é atribuída à sua eficácia e às suas múltiplas indicações clínicas, tais como tratamento de pacientes com quadros de ansiedade, insônia, com o objetivo de relaxamento muscular e alívio de espasticidades ⁹⁴. A prescrição de BZDs no tratamento de pacientes que apresentam casos de epilepsia é comum e de extrema relevância ⁹⁵. Além disso,

devido às suas propriedades de amnésia e ansiolítica, os BZDs também são largamente prescritos em situações intraoperatórias ⁹⁶.

A interação dos BZDs com o sítio de ligação específico dos receptores GABA_A não afeta diretamente a abertura do canal de íon cloreto ⁹⁷. Essa classe de fármacos modula alostericamente a capacidade do receptor GABA_A de realizar esta função, amplificando os efeitos deste e aumenta a afinidade de ligação do neurotransmissor GABA com o seu sítio de ligação, facilitando a neurotransmissão, e conseqüentemente, permanecendo o canal de cloro aberto por mais tempo ^{18,47}. O aumento do fluxo de cloro direciona a uma hiperpolarização dos neurônios pós-sinápticos, e reduzindo a taxa de sinapse neuronal ⁹⁷.

Em estudos envolvendo técnicas de *knockout* em modelos animais, foram observados diferentes efeitos dos BZDs sob influência da combinação de receptores GABA_A ⁶⁷. A interação de alguns BZDs com os receptores GABA_A contendo a subunidade α_2 apresentam propriedades ansiolíticas; com a subunidade α_3 apresentam características miorelaxantes; com a subunidade α_5 apresentam propriedade amnésia. Já alguns BZDs ao interagirem com GABA_A que possuem a subunidade α_1 produzem efeitos de amnésia, sedação e anticonvulsivantes, como no caso particular do diazepam ^{62,67,98}.

1.4.1 Diazepam

O diazepam (Valium®) (Figura 7D) é um BZD não seletivo largamente prescrito e utilizado como agente ansiolítico desde sua introdução ao mercado na década de 1960 ^{62,96}. Sua estrutura química possui um átomo de cloro associado ao seu anel benzeno (Figura 7D). O Diazepam possui a capacidade de interagir com as combinações de receptores GABA_A que possuem as subunidades α_1 , α_2 , α_3 e α_5 . O diazepam é comumente prescrito e eficaz para tratamento da ansiedade e em situações de sedação, como ansiolíticos e miorelaxantes, e principalmente no tratamento de pacientes com quadro de convulsão ^{99,100}.

O diazepam possui características que o diferenciam de outros BZDs; sua metabolização no fígado pelos citocromos CYP3A e CYP2C19, produzem metabólitos ativos, como o oxazepam, temazepam e desmetildiazepam, dos quais cada um exerce sua própria ação ⁹⁶. Estes metabólitos e suas ações são responsáveis pelo longo tempo de eliminação do diazepam, variando de 20 a 80 horas; entretanto pode ocorrer um aumento aproximado de uma hora para cada ano de idade acima dos quarenta anos; por exemplo, a administração de diazepam para um indivíduo de 75 anos, a meia-vida de eliminação será aproximadamente de 75 horas. Portanto, é necessário cautela na administração desse fármaco, dado que a formação destes metabólitos ativos pode causar efeitos colaterais, tais como desidratação e amnésia, podendo ser graves e duradouros, especialmente em idosos e pacientes com disfunção hepática ou renal ⁹⁶.

1.4.2 Efeitos colaterais e limitações

Quanto a aspectos farmacocinéticos dos BZDs, a lipossolubilidade é uma importante característica, principalmente quando administrados em dose única, uma vez que há uma maior velocidade e extensão da distribuição do fármaco pelos tecidos periféricos ¹⁰¹. Durante a administração em doses múltiplas, por um tempo prolongado, a meia-vida de eliminação é de extrema importância, pois irá determinar os níveis acumulados do BZD no organismo após repetidas doses e o tempo de eliminação total após o término da administração. Esses dados são fundamentais para avaliar a duração e intensidade dos sintomas de abstinência, após o desmame do fármaco, bem como compreender a diferença de tolerância que se estabelece para seus diferentes efeitos ¹⁰¹.

Embora, a classe dos BZDs sejam largamente utilizados e bem tolerados, sua administração apresenta problemas clínicos, como dependência fisiológica, ansiedade de *rebote*, prejuízos na memória e síndrome de descontinuação ¹⁰². Além disso, alguns efeitos colaterais comuns entre todos os BZDs incluem sonolência, letargia e fadiga. Em dosagens mais altas, pode ocorrer coordenação motora prejudicada, tontura, vertigem, problemas na visão e fala, alteração de humor, além de comportamento hostil em alguns casos.

De maneira geral, os BZDs são eliminados lentamente no corpo, por isso doses repetidas durante um longo período podem resultar em acumulação significativa nos tecidos adiposos. Portanto, alguns sintomas comuns em consumos abusivos, como pensamento prejudicado, desorientação, confusão, podem aparecer ao longo do tempo ¹⁰³. A tolerância, dependência e abstinência são efeitos adversos comuns associados ao uso de BZDs a longo prazo ¹⁰⁴.

Devido às características descritas anteriormente, o diazepam e outros BZDs são frequentemente prescritos para pacientes com diferentes distúrbios psiquiátricos ¹⁰⁴. Entretanto, o uso desse grupo de compostos pode apresentar complicações clínicas. O uso crônico de BZDs está associado com efeitos colaterais como dependência fisiológica, comprometimento cognitivo e psicomotor a curto prazo, assim como a ansiedade após a descontinuação do tratamento ^{102,105}. Além disso, tratamentos com BZDs de ação prolongada ou intermediária são considerados nocivos para pessoas idosas e pessoas com deficiências hepáticas ou renais, devido à sua lenta eliminação ^{106,107} e também podem apresentar ineficiência em tratamentos em certos tipos de epilepsia ¹⁰⁸.

Nesse contexto, existe a necessidade de identificação e desenvolvimento de novos compostos que apresentem a mesma eficiência dos BZDs clássicos, com redução da magnitude dos efeitos adversos ¹⁰⁸. Uma importante abordagem no desenvolvimento de novos fármacos envolve a síntese de espécies bioativas a partir da associação entre compostos orgânicos bem elucidados com metais de transição, atribuindo o nome de compostos de coordenação ^{109,110}.

1.5. Compostos de coordenação

Provavelmente, os compostos de coordenação mais conhecidos são representados pela cisplatina e seus análogos. A cisplatina não foi racionalmente projetada, mas descoberta de forma inesperada em 1965 ¹¹¹. Em 1978, esse medicamento foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de câncer testicular e ovariano ^{110,111}. Diversos compostos metálicos, como platina (Pt), paládio (Pd), níquel (Ni), rutênio (Ru), titânio (Ti), e outros já foram utilizados para a síntese de compostos de coordenação ¹¹²⁻¹¹⁵. A presença

de um metal nesses compostos é capaz de aumentar sua seletividade ao sítio de um receptor específico, conseqüentemente, reduzindo efeitos adversos. Em contra partida, uma incorreta orientação da ligação do metal com o alvo, pode inibir a ativação ¹¹⁶.

1.5.1. Complexos metálicos derivados de paládio

Os complexos metálicos derivados de paládio têm recebido significativa atenção devido à sua atividade biológica ¹¹⁷. Na última década, alguns estudos mostraram que compostos de coordenação derivados deste metal apresentaram atividade contra linhagem celular tumoral humana ¹¹⁸, exibindo efeitos antiproliferativos e antitumorais ¹¹⁹⁻¹²³. Também foi observada a interação destes complexos com proteínas carreadoras ¹²⁴⁻¹²⁶. Os complexos metálicos derivados de paládio foram propostos no tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente na região gastrointestinal ¹²⁷.

O primeiro trabalho utilizando paládio como agente antiepiléptico foi um estudo de casos publicado por Turner em 1918 ¹²⁸, onde foi analisado a administração de um coloide complexado com paládio em quatro pacientes. Neste estudo, foi observado uma melhora no comportamento dos pacientes e redução dos quadros de epilepsia após a administração do composto ¹²⁸.

Recentemente, Barros e colaboradores (2016) ¹²⁹ apresentaram um conjunto de compostos derivados do diazepam associados ao metal paládio, como agentes antiepilépticos. Foram sintetizados cinco compostos de coordenação, sendo dois deles constituídos por dois átomos de paládio ($[(DZP)PdCl]_2$ e $[(DZP)PdOAc]_2$); e três compostos com apenas um átomo de paládio ($[(DZP)PdOAcPPh_3]$, $[(DZP)PdClPPh_3]$ e $[(DZP)PdClPy]$) (Figura 8). Os resultados experimentais utilizando modelos *in vivo* indicaram que estes compostos possuem ação anticonvulsivante; além disso, evidenciaram efeitos análogos ao próprio diazepam, sugerindo que a ação destes compostos de coordenação também é mediada pelo sítio de ligação clássico dos BZDs no receptor GABA_A.

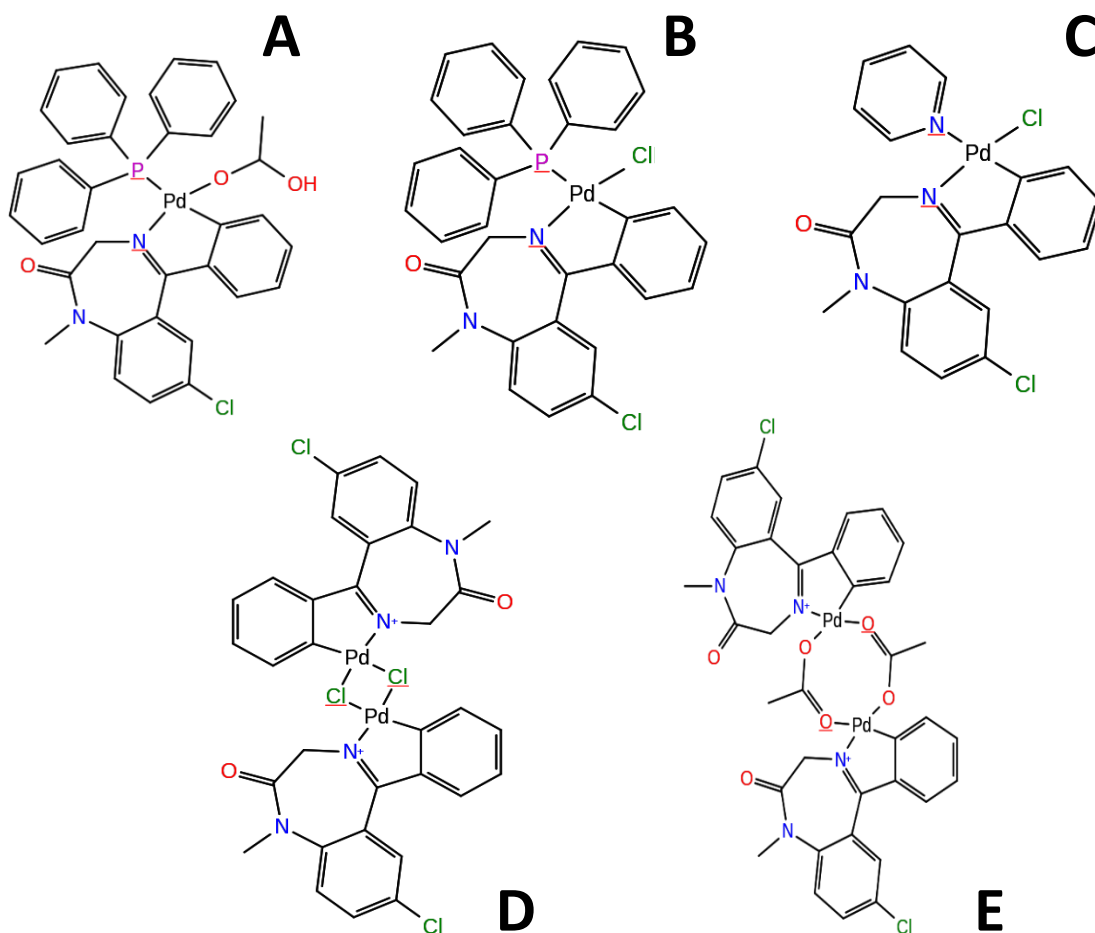


Figura 8: Estrutura bidimensional dos compostos de coordenação derivados de paládio. A) $[(DZP)PdOAcPPh_3]$. B) $[(DZP)PdClPPh_3]$. C) $[(DZP)PdClPy]$. D) $[(DZP)PdCl]_2$. E) $[(DZP)PdOAc]_2$.

Nesse contexto, é importante uma maior compreensão acerca do potencial destes complexos metálicos, analisando sua capacidade de uso no tratamento de pacientes com os diferentes distúrbios psiquiátricos, principalmente de aqueles que apresentam epilepsia, visando à redução dos efeitos adversos e ao aumento da sua eficiência. Para tal, é primordial elucidar o modo de ação destes complexos de coordenação e suas possíveis interações com o receptor $GABA_A$.

1.6. Predição de estruturas tridimensionais proteicas

Uma das premissas mais fundamentais das ciências biológicas é a íntima relação entre a função de uma proteína e sua estrutura tridimensional ¹³⁰. A determinação por meios experimentais ainda é a abordagem mais confiável para elucidar as características estruturais de uma proteína, porém se trata de métodos custosos e prolongados, como é o caso da técnica de cristalografia por difração de raio-x; na técnica de ressonância magnética nuclear (RNM) ocorre a limitação do tamanho da proteína (30-50 kDa). Outra abordagem que vêm ganhando destaque é a crio-microscopia eletrônica (Cryo-EM), que utiliza feixes de elétrons em amostras congeladas em materiais a baixas temperaturas. Em alguns casos, essas técnicas são operacionalmente difíceis o que as tornam muitas vezes inviáveis. Além disso, existem outras limitações como tamanho da molécula estudada e a qualidade dos cristais. Portanto, a utilização de técnicas computacionais pode auxiliar na investigação e análise de sistemas biológicos ¹³¹, principalmente em casos onde não é possível a obtenção experimental da estrutura tridimensional da proteína.

Na determinação da estrutura tridimensional de proteínas usando métodos computacionais, uma abordagem recorrente é a modelagem molecular comparativa, que se vale principalmente da existência de uma estrutura proteica resolvida experimentalmente que pode ser utilizada como molde. Tendo em vista que a estrutura proteica é mais conservada do que sua sequência de aminoácidos, e está relacionada com sua função, é possível prever a conformação espacial de uma proteína a partir de informações tridimensionais de uma proteína semelhante.

A modelagem comparativa consiste em quatro etapas principais ¹³² (Figura 9) (i) identificação do molde, a partir da similaridade das sequências do alvo e de pelo menos uma estrutura resolvida experimentalmente; (ii) alinhamento entre as sequências alvo e o(s) molde(s); (iii) construção do modelo baseado no alinhamento com o(s) molde(s) escolhido(s) por métodos corpo rígido ou restrição de distância; (iv) avaliação da qualidade e identificação de erros do modelo construído.

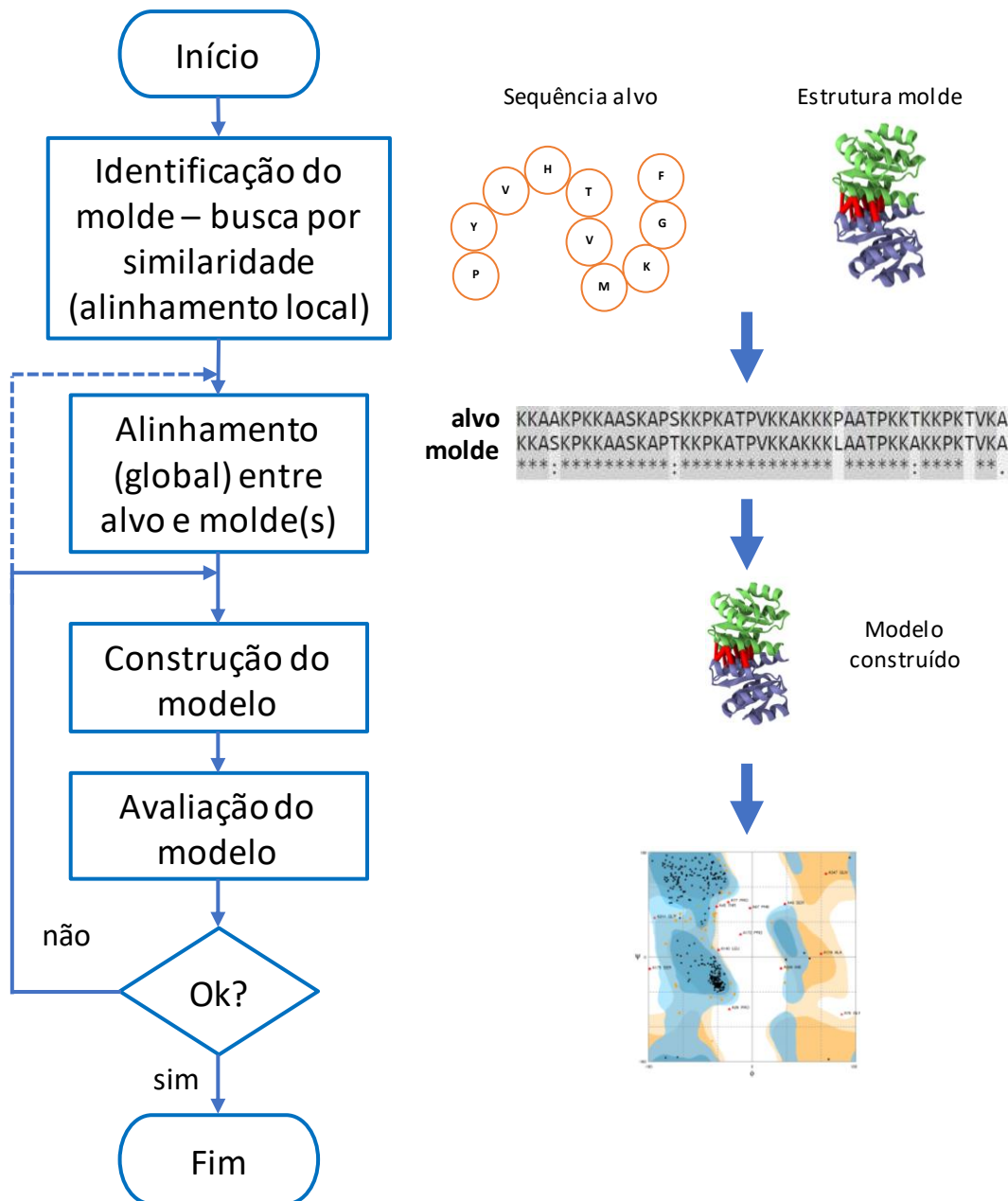


Figura 9: Fluxograma com os passos para modelagem comparativa de estruturas proteicas (adaptado de ¹³³).

Na identificação do(s) molde(s) (primeira etapa da modelagem comparativa), é realizada uma busca por estruturas similares já resolvidas experimentalmente. Primeiramente são utilizadas ferramentas de busca por similaridade de sequências dos moldes, selecionando a(s) estrutura(s) mais apropriadas, visando ao maior grau de identidade entre a sequência alvo e a(s) estrutura(s) resolvida(s). Existem diversas ferramentas disponíveis, como o

BLAST¹³⁴. Após a identificação dos moldes, suas estruturas tridimensionais são extraídas de bancos de dados, como o PDB¹³⁵.

Após a identificação do(s) molde(s), é realizado um alinhamento entre a sequência-alvo a ser modelada e a sequência da estrutura molde¹³⁶ (segunda etapa da modelagem comparativa). Durante essa etapa, é importante observar a presença e quantidade de *gaps* presentes no alinhamento (sequência final). A alta presença de *gaps* pode indicar problemas durante a construção do modelo. Algumas características do alinhamento entre sequências são relevantes, como a identidade, similaridade e cobertura. A identidade é o grau em que duas sequências são idênticas propriamente ditas, em cada posição do alinhamento; a similaridade refere-se ao grau de aminoácidos quimicamente similares, ou seja, pertencem ao mesmo grupo; e a cobertura é a extensão do alinhamento que cobre toda as sequências. A acurácia de um alinhamento é diretamente proporcional ao percentual de identidade/similaridade entre sequências das proteínas molde e alvo¹³⁷. Algumas ferramentas recorrentes são CLUSTAL Omega¹³⁸, MUSCLE¹³⁹ e TCOFFEE¹⁴⁰.

A limitação da técnica de modelagem molecular comparativa está no grau de similaridade entre a sequência da proteína alvo e a estrutura molde. Em termos gerais, é considerado que o limite mínimo da aplicação da técnica seja de 30% de identidade (Figura 10)^{141,142}.

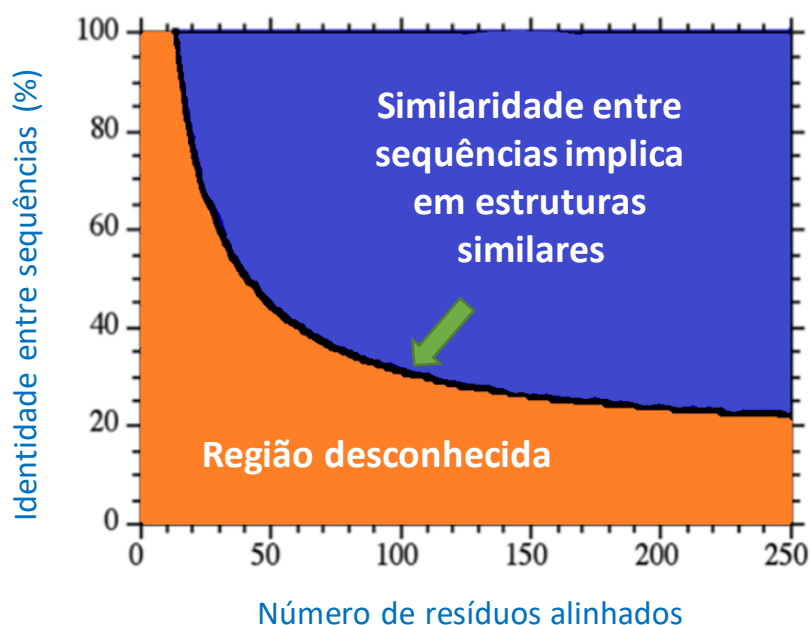


Figura 10: Comparação entre a identidade do alinhamento e o tamanho das sequências alinhadas. A região azul representa correta detecção de estruturas similares. A região laranja representa falsos positivos. A seta em verde marca o limite inferior: por volta de 30% de identidade (adaptado de ¹⁴²).

A construção do modelo utiliza a sequências alinhadas entre o molde a proteína a ser modelada, e a própria estrutura resolvida do molde. Durante esta etapa, pode ser construído um número de modelos pré-determinado pelo usuário. Existem diversas ferramentas, servidores e programas locais, cada uma delas possui seu próprio algoritmo de construção do modelo. Ferramentas como MODELLER ¹³⁶ e SWISS-MODEL ¹⁴³ são amplamente utilizadas.

O programa MODELLER é utilizado em modelagem comparativa de estruturas tridimensionais de proteínas, por restrições espaciais. Neste caso, são utilizadas características geométricas do molde, como ângulos e distâncias das ligações ¹³⁶. O SWISS-MODEL é um servidor de modelagem comparativa de estruturas proteicas, utilizando a metodologia por corpos rígidos. Neste sentido, a construção do modelo é baseada na conservação de estruturas secundárias, como α -hélices e folhas- β ¹⁴³.

Após a seleção do modelo, são realizadas etapas de avaliação da qualidade do modelo, por meio de predição de erros do modelo. Uma das abordagens adotadas é a seleção do melhor modelo construído usando a função objetiva oferecida pelo programa MODELLER, observando o menor valor de

Discrete Optimized Protein Energy (DOPE) score dos modelos construídos. O *DOPE score* é um potencial estatístico utilizado para avaliar modelos preditos a partir de moldes, utilizando proteínas semelhantes. Esta função matemática potencial calcula uma estimativa da energia interna do modelo das proteínas, sendo aquelas com valores mais baixos aquelas com maior probabilidade de terem sido corretamente preditas ¹³³.

Existem diferentes outras abordagens de avaliação, como analisar as características físico-químicas. Também estão disponíveis diversas ferramentas; como ERRAT ¹⁴⁴, PROCHECK ¹⁴⁵ e WHATCHECK ¹⁴⁶.

O servidor ERRAT analisa estatisticamente as interações não ligadas entre diferentes átomos e informa o valor da função de erro, calculado pela comparação de análises estatísticas a partir de estruturas de alta resolução ¹⁴⁴. O servidor PROCHECK avalia a qualidade estereoquímica de estruturas proteicas por análise geométrica de resíduos por resíduo e da própria estrutura proteica ¹⁴⁵. O servidor WHATCHECK realiza uma verificação de diversos parâmetros estereoquímicos dos resíduos do modelo, a partir de um subconjunto de ferramentas de verificação de proteínas, conhecido como WHATIF ¹⁴⁷.

A predição de estruturas tridimensionais é de grande importância em estudos de análise e planejamento de fármacos, permitindo a utilização de outras metodologias computacionais, como *docking* molecular, a fim de avaliar a interação entre um ligante com uma dada proteína (Figura 11) ¹⁴¹.

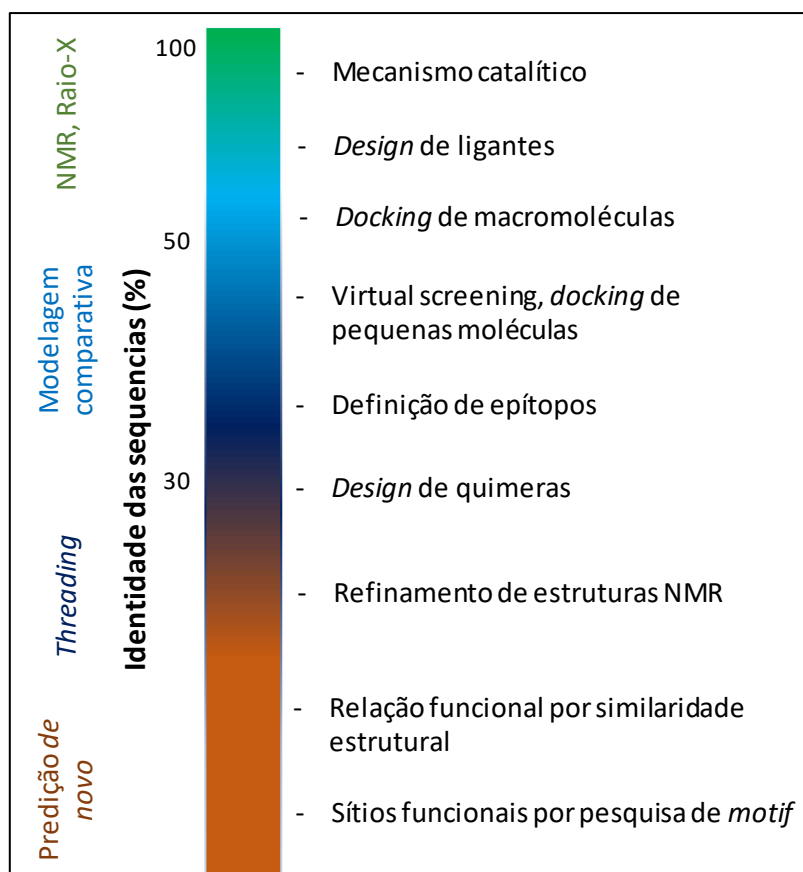


Figura 11: Acurácia e aplicação da modelagem estrutural de proteínas. Apresentando as diferentes aplicações para modelos construídos por modelagem comparativa, *threading* e de novo, baseado na identidade da sequência alvo (adaptado de ¹⁴¹).

Como descrito anteriormente, até recentemente, não havia depositada nos bancos de dados uma estrutura heteropentamérica resolvida desse receptor. Um dos primeiros modelos desta proteína construído usando modelagem comparativa foi um heterodímero $\alpha_1\gamma_2$ ¹⁴⁸. Nesta publicação, foram utilizadas diferentes estruturas como moldes: seis proteínas ligada à acetilcolina (AChBP) e dois receptores acetilcolina nicotínicos (nAChRs). Além disso, neste trabalho foi analisada a interação do diazepam com este modelo.

A publicação da estrutura cristalográfica β_3 homopentamérica do receptor GABA_A (PDB ID: 4COF) ⁴⁷ permitiu a construção de modelos heteropentaméricos desse receptor, por modelagem comparativa. Recentemente, foi publicado um modelo heteropentamérico $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, utilizando estrutura β_3 homopentamérica, por esta metodologia ¹⁴⁹. Nesta publicação, a construção do modelo permitiu analisar e descrever os modos de ligação e

detectar importantes interações dos ligantes selecionados, incluindo agonistas, antagonistas e moduladores alostéricos, como o diazepam.

1.7. *Docking* molecular

As metodologias computacionais tornaram-se componentes cruciais de muitas linhas de investigações na descoberta de fármacos, desde a identificação de substâncias com atividade biológica (*hits*) até sua otimização e seleção como compostos líderes (*leads*)^{150,151}.

Uma metodologia chave é o *docking* molecular de pequenas espécies no sítio de ligação de proteínas. Essa metodologia teve início na década de 1980¹⁵² e continua sendo uma ferramenta essencial na pesquisa¹⁵³.

A técnica de *docking* molecular envolve a predição da pose entre duas moléculas (proteína-ligante ou proteína-proteína), dentro de um sítio de ligação direcionado de uma estrutura proteica, e a estimação do cálculo da sua afinidade de ligação¹⁵⁴; com isso é possível observar as interações entre o ligante e os resíduos pertencentes ao sítio de ligação do receptor, como por exemplo, ligações de Hidrogênio e interações eletrostáticas e de *van der Waals*. Em geral, existem dois objetivos principais em estudos de *docking*: energia de afinidade do ligante pela proteína e correta predição da pose do ligante¹⁵⁵. Entretanto, a identificação de características moleculares responsáveis pelo reconhecimento biológico é altamente complexa, e muitas vezes difíceis de compreender e simular computacionalmente¹⁵⁶.

O método de *docking* precisa de dois componentes principais: o algoritmo de busca e uma função de pontuação (*scoring*). A primeira etapa é a aplicação do algoritmo que representa pequenas espécies químicas (ligantes) no sítio ativo de dada proteína, com o intuito de detectar a melhor pose do ligante. O primeiro desafio encontrado é a diversidade de poses que podem ser encontradas, devido aos graus de liberdade conformacionais que o ligante pode apresentar. Além disso, a flexibilidade da própria proteína sustenta essa limitação. Nesse sentido, os algoritmos podem adotar diferentes estratégias, quanto à flexibilidade da proteína (receptor) e do ligante. Entretanto, dependendo das características de

flexibilidade adotadas pode demandar um alto custo computacional, inviabilizando o método. Por esse motivo, a abordagem mais comum quanto à flexibilidade molecular é considerar apenas o espaço amostral do ligante, assumindo a rigidez do receptor durante todo o protocolo de *docking* molecular¹⁵⁷.

O algoritmo de busca pode ser classificado em três principais grupos de acordo com o método empregado para explorar a flexibilidade do ligante: sistemático, estocástico e determinístico¹⁵⁶. O algoritmo sistemático explora todos os graus de liberdade de um ligante durante sua busca. O método estocástico muda o grau de liberdade de forma aleatória. No método determinístico, o estado atual do sistema determina as mudanças a serem feitas no ligante, levando a sua próxima pose¹⁵⁶.

Em segundo momento, são utilizadas funções de *scoring* que são designadas para prever a atividade biológica por meio da interação do ligante com a proteína. Em suma, as funções de *scoring* são usadas para avaliar os modos de interação entre o ligante e a proteína, direcionando a busca para conformações de ligante com maior afinidade pelo receptor.

Podem ser adotadas diferentes funções de *scoring*, incluindo diferentes níveis de complexidade quanto à interação eletrostática, de *van der Waals*, alguns efeitos de solvatação e efeitos entrópicos¹⁵³. Portanto, não é viável realizar comparações entre os valores de *scoring* entre diferentes funções. Além das limitações e desafios proporcionados pela própria metodologia de *docking* molecular, as próprias limitações da estrutura alvo, como pobre resolução e erros de predição, podem prejudicar e comprometer os resultados de *docking* molecular.

As funções de *scoring* podem ser divididas em três classes principais: baseada em campo de força, empírica e baseada em estruturas conhecidas^{158,159}. O método baseado em campo de força utiliza os campos de força clássicos e consiste no somatório de termos de energia. Os métodos empíricos são baseados na correlação da energia livre de ligação com uma soma ponderada de variáveis não relacionados. O método baseado em estruturas

conhecidas se baseia na análise estatística da interação de pares de átomos a partir do complexo proteína-ligante com estruturas tridimensionais disponíveis.

Atualmente, existem diversos programas de *docking* molecular, tais como AutoDock ¹⁶⁰, DOCK ¹⁶¹, GOLD ¹⁶², entre muitos outros; além de servidores como é o caso do DockThor ¹⁶³. Cada um destes programas adota diferentes funções de *scoring* e algoritmos de busca, tornando cada programa único e com suas peculiaridades.

1.8. Justificativa

O desenvolvimento de novos compostos que apresentem a mesma eficiência dos clássicos BZDs, porém com redução dos efeitos adversos, é de grande importância no tratamento de pacientes com distúrbios psiquiátricos, principalmente para pacientes com quadros de epilepsia.

Novas abordagens de desenvolvimento de fármacos estão sendo adotadas, incluindo a síntese de compostos de coordenação, a partir da associação de compostos orgânicos já bem estabelecidos com íons metálicos. Os compostos de coordenação desenvolvidos por Barros e colaboradores (2016) ¹²⁹, derivados do diazepam com íons paládio, apresentaram atividade anticonvulsivante em camundongos. Portanto, é de grande importância a compreensão acerca do potencial destes compostos de coordenação, elucidando o seu modo de ação e suas possíveis interações com o receptor GABA_A.

Diante desse contexto, este projeto teve como objetivo elucidar o modo de interação dos compostos de coordenação com o receptor GABA_A. O uso de técnicas computacionais apresenta-se como uma poderosa ferramenta para elucidar os aspectos envolvidos nos mecanismos dessas interações, permitindo a modelagem de uma estrutura heteropentamérica $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ do receptor GABA_A, por Modelagem Comparativa, e analisar os modos de ligação dos compostos de coordenação com este receptor, por *Docking* Molecular.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Predição do modo de interação de um conjunto de compostos de coordenação derivados do DZP associados ao paládio com o receptor GABA_A, por meio de ferramentas computacionais.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a estrutura da principal combinação de isoformas dos receptores GABA_A ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$) de camundongo construída por modelagem comparativa;
- Elucidar os possíveis modos de interação dos compostos de coordenação sintetizados no sítio específico dos BZDs do receptor GABA_A mediante *docking* molecular;
- Comparar os modos de ligação dos compostos de coordenação com os modos de interação do diazepam e do flumazenil, disponíveis na literatura.

3. Metodologia

3.1. Modelagem comparativa do receptor GABA_A ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$)

Para a construção dos modelos estruturais foi utilizada a técnica de modelagem comparativa ^{164,165}. Para este fim, foi utilizado o programa Modeller (v 9.18), que utiliza o método de restrições espaciais ¹³⁶.

3.1.1. Matrizes de alinhamento

Com o intuito de avaliar o grau de conservação das sequências entre as três isoformas do receptor GABA_A (α_1 , β_2 e γ_2), para cada subunidade, foram retiradas sequências de diferentes organismos do banco de dados UniProt ¹⁶⁶ (Tabela 1). Essas sequências foram alinhadas, aplicando o método de alinhamento múltiplo, utilizando o servidor CLUSTAL Omega ¹³⁸ e matrizes de alinhamento utilizando o servidor Kalign ¹⁶⁷, por meio da matriz BLOSUM62 ¹⁶⁸.

Os alinhamentos múltiplos se realizaram com as sequências dos seguintes organismos: *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (camundongo), *Rattus norvegicus* (rato), *Gallus gallus* (galinha), *Bos taurus* (boi), *Pongo abelii* (orangutango sumatra), *Macaca mulatta* (macaco rhesus) e *Macaca fascicularis* (macaco cynomolgus). Dentre estes organismos, há aqueles que possuem mais de uma sequência, como é o caso da subunidade β_2 com quatro sequências de *Homo sapiens* (Tabela 1); nestes casos, estes organismos possuem mais de uma isoforma para estas subunidades. Nos alinhamentos múltiplos foram utilizadas todas as isoformas encontradas.

Tabela 1: Sequências de α_1 , β_2 e γ_2 de GABA_A de mamífero reportadas do banco de dados UniProt utilizadas no alinhamento de múltiplas sequências.

Subunidade do receptor GABA _A	UniProt ID	Organismo
α_1	P14867	<i>Homo sapiens</i> (humano)
	P62812	<i>Mus musculus</i> (camundongo)
	P62813	<i>Rattus norvegicus</i> (rato)
	P19150	<i>Gallus gallus</i> (galinha)

	P08219	<i>Bos taurus</i> (boi)
	Q5R6B2	<i>Pongo abelii</i> (orangutango sumatra)
	Q4R534	<i>Macaca fascicularis</i> (macaco cynomolgus)
	<hr/>	
	P47870	<i>Homo sapiens</i> (humano)
	P47870-1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
	P47870-3	<i>Homo sapiens</i> (humano)
	P47870-4	<i>Homo sapiens</i> (humano)
β_2	P63137	<i>Mus musculus</i> (camundongo)
	P63137-2	<i>Mus musculus</i> (camundongo)
	P63138	<i>Rattus norvegicus</i> (rato)
	P0C2W5	<i>Bos taurus</i> (boi)
	D1LYT2	<i>Macaca mulatta</i> (macaco rhesus)
	<hr/>	
	P18507	<i>Homo sapiens</i> (humano)
	P18507-2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
	P18507-3	<i>Homo sapiens</i> (humano)
	P22723	<i>Mus musculus</i> (camundongo)
	P22723-2	<i>Mus musculus</i> (camundongo)
γ_2	P18508	<i>Rattus norvegicus</i> (rato)
	P21548	<i>Gallus gallus</i> (galinha)
	P22300	<i>Bos taurus</i> (boi)
	P22300-2	<i>Bos taurus</i> (boi)
	Q5REA1	<i>Pongo abelii</i> (orangutango sumatra)
	<hr/>	

3.1.2. Identificação das sequências

Durante a etapa de construção do receptor GABA_A com a combinação de subunidades mais predominante no SNC dos mamíferos ($\alpha_1\beta_2\alpha_1\beta_2\gamma_2$), foram obtidas sequências de *Mus musculus* (camundongo) das três isoformas (α_1 , β_2 e γ_2) no banco de dados UniProt ¹⁶⁶. As sequências destas isoformas (α_1 , β_2 e γ_2) estão identificadas como P62812, P63137 e P22823, respectivamente. Este trabalho teve como base a avaliação da atividade anticonvulsivante dos compostos de coordenação derivados do diazepam associados ao paládio em

camundongos ¹²⁹, por esta razão, foram selecionadas sequências de *Mus musculus*.

3.1.3. Construção do modelo

Foi realizada uma busca no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) ¹³⁵ por estruturas resolvidas desta proteína. No primeiro momento, foi encontrada apenas uma estrutura cristalográfica β_3 homopentamérica humana, resolvida por difração de raio-x, cuja resolução é 2,97Å (PDB ID: 4COF) ⁴⁷.

No decorrer desse trabalho, foi publicada a estrutura do receptor GABA_A humano heteropentâmérico $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ obtido por criomicroscopia eletrônica (PDB ID: 6D6U) ⁸⁴. Foi resolvida a estrutura do canal iônico em seu estado aberto e com resolução de 3,92Å. Além disso, esta estrutura está complexada ao antagonista flumazenil no sítio dos benzodiazepínicos.

A estrutura cristalográfica β_3 homopentamérica humana (PDB ID: 4COF) foi utilizada como molde para a construção dos modelos é desprovida de *loops* intracelulares, os quais foram removidos da sequência e, conseqüentemente, os modelos construídos não possuem estes domínios. Como já comentado em sessões anteriores, o sítio dos benzodiazepínicos está localizado entre as subunidades $\alpha_1\gamma_2$, logo, houve o interesse de analisar a estabilidade do modelo heterodimérico e utilizar *docking* molecular para avaliar a interação dos ligantes com esta estrutura. Portanto, em suma, foram construídos dois modelos por modelagem comparativa: um heteropentâmero ($\alpha_1\beta_2\alpha_1\beta_2\gamma_2$) e um heterodímero ($\alpha_1\gamma_2$).

Durante o processo de modelagem molecular, para cada estrutura (pentâmero e dímero), foram gerados com programa Modeller (v 9.18) ¹³⁶ ao todo 250 modelos e classificados de acordo com seus respectivos valores de DOPE. O programa PyMol (v. 1.8) ⁸² foi utilizado na visualização das estruturas.

Os dois modelos finais selecionados foram submetidos a um processo de otimização estrutural. Primeiramente, foi utilizado o receptor GABA_A humano heteropentâmérico $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U) na orientação das cadeias laterais dos resíduos pertencentes ao sítio de ligação dos benzodiazepínicos do modelo

heteropentâmérico selecionado. Posteriormente, foi realizada uma otimização estrutural por minimização de energia, utilizando o programa GROMACS 5.1.4¹⁶⁹ com campo de força Amber99SB-ILDN¹⁷⁰. Nesta otimização, foram adotados dois algoritmos, *steepest descent* (st) e *conjugate gradient* (cg); e duas abordagens, com a proteína rígida e com ela flexível. Foi utilizado o algoritmo de Verlet no cálculo de interações não ligadas e do potencial eletrostático PME (*Particle Mesh Ewald*)¹⁷¹. Foi adotado o número máximo de 1000 passos para a minimização. A minimização é convergida ao passo que a força máxima (*emtol*) é menor do que o valor de 0,024 kcal mol⁻¹ nm⁻¹.

Para cada estrutura, foram adotados diferentes protocolos de otimização estrutural por minimização de energia, alternando entre os dois algoritmos (st e cg) e os dois estados da proteína (rígida e flexível). Vale ressaltar que o arquivo de saída do processo anterior foi utilizado como arquivo de entrada da etapa posterior. Os protocolos testados: (i) st com proteína rígida, cg proteína flexível; (ii) cg com proteína rígida, st com proteína flexível; (iii) cg com proteína rígida, cg com proteína flexível, st com proteína rígida, st com proteína flexível; (iv) st com proteína rígida, st com proteína flexível, cg com proteína rígida, cg com proteína flexível. Foi adotado o protocolo (iv) que apresentou os modelos com as menores energias potenciais durante a etapa de otimização para as duas estruturas.

3.1.4. Avaliação do modelo

Após o processo de otimização estrutural por otimização de energia, as duas estruturas selecionadas foram submetidas ao processo de refinamento de *loops*. Com o auxílio do servidor ERRAT¹⁴⁴, foi possível observar as regiões de resíduos onde existe maior probabilidade de ocorrer incorreta disposição estrutural, através da taxa de erro (acima de 95%). As regiões foram refinadas isoladamente pelo servidor ModLoop¹⁷² e analisadas novamente pelo servidor ERRAT. O visualizador PyMol (v. 1.8)⁸² foi utilizado para observar a ocorrência de perdas de estruturas secundárias.

Em cada etapa de otimização, as estruturas foram analisadas utilizando os servidores ERRAT e PROCHECK¹⁴⁵; este último oferece o gráfico de Ramachandran. Também foram analisados os perfis de (DOPE) *score*,

construídos a partir da pontuação de DOPE *per*-resíduo, fornecidos pelo próprio programa Modeller. Os perfis de DOPE *score* dos modelos foram comparados por subunidades (α_1 , β_2 e γ_2) com o seu molde (PDB ID: 4COF) e com o cristal heteropentamérico recém-publicado (PDB ID: 6D6U).

3.1.5. Identificação de resíduos do sítio dos BZDs

Após as etapas de otimização, foi estimado o volume interno da cavidade central do heteropentâmero, utilizando o servidor *web POcket-CAvity Search Application* (POCASA), disponível no endereço: <http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/>¹⁷³, com todos os parâmetros pré-estabelecidos pelo servidor. Com auxílio do programa PyMol (v. 1.8)⁸², foi medida o diâmetro em três regiões: abertura extracelular, abertura transmembranar e abertura intracelular. Além disso, foi calculada a superfície de potencial eletrostático, utilizando o *plugin* PyMol APBS e o servidor PDB2PQR¹⁷⁴, que utiliza cálculos de Poisson-Boltzmann, com campo de força AMBER,¹⁷⁵ ao pH 7,4. Os átomos são coloridos de acordo com suas cargas, variando entre 2,0 (azul) e -2,0 (vermelho) de potencial eletrostático de superfície em kT/e.

O receptor GABA_A apresenta diferentes sítios de ligação alostéricos capazes de modular indiretamente a atividade do receptor. Então, foi utilizado o algoritmo Fpocket¹⁷⁶ para caracterizar o sítio de ligação dos benzodiazepínicos e identificar os resíduos de aminoácidos que abrangem o sítio de ligação. Além disso, através dos resultados de predição fornecidos pelo servidor Fpocket, foi possível determinar o centro do sítio dos benzodiazepínicos. Essa informação foi crucial nas simulações de *docking* molecular. Além disso, foi utilizado o servidor PDB2PQR¹⁷⁴, para calcular o pKa do resíduo His101, pertencente a subunidade α_1 do sítio dos benzodiazepínicos, pois segundo a literatura, este resíduo apresenta grande impacto nas interações dos BZDs com este sítio.

3.2. Construção e parametrização dos ligantes

A estrutura tridimensional do composto diazepam foi obtida do banco de dados DrugBank¹⁷⁷. Os compostos de coordenação derivados do diazepam associados aos átomos de paládio foram construídos a partir da estrutura do

próprio diazepam, utilizando o programa Avogadro (v 1.1.1) ¹⁷⁸ e os estados de protonação de cada um dos ligantes foram definidos a pH 7,4 utilizando o programa MarvinSketch (v.17.15) ⁹³. Os compostos de coordenação construídos computacionalmente e utilizados neste projeto podem ser divididos em dois grupos: um conjunto composto de três ligantes contendo um átomo de paládio ([[(DZP)PdOAcPPh₃], [(DZP)PdClPPh₃] e [(DZP)PdClPy]); e outro conjunto com dois compostos contendo dois átomos de paládio ([[(DZP)PdCl]₂ e [(DZP)PdOAc]₂).

3.2.1. Preparação dos compostos de coordenação

A ausência de informações cruciais dos compostos de coordenação desenhados e otimizados, como número de coordenação, cargas e outros dados essenciais para que suas estruturas sejam reconhecidas pelos campos de força e pelos programas de *docking* molecular, levou à necessidade de realizar uma etapa de parametrização desses ligantes. As cargas parciais dos paládios foram calculadas utilizando o programa Gaussian09 ¹⁷⁹ e adaptadas às cargas Gasteiger; onde é baseado no equilíbrio de eletronegatividade, assumindo o estado neutro do ligante. A utilização do programa Gaussian for realizada no GridUnesp, sob supervisão do Dr. Alexandre Suman de Araujo.

Durante esta etapa de otimização dos ligantes, para calcular a carga do paládio, foram utilizadas as configurações básicas 'B3LYP' e 'DGDZVP', pois se trata de um metal de transição ¹⁸⁰. Também foram utilizadas algumas opções para gerar cargas derivadas de potencial eletrostático ^{181,182}: 'MK' para produzir cargas adequadas ao potencial eletrostático, 'dipole' para restringir as cargas para reproduzir o momento dipolar ao ajustar as cargas ao potencial, e 'ReadRadii' para alternar o raio atômico do elemento indicado. O raio atômico do paládio calculado e informado pelo Gaussian09 foi de 1,63Å.

3.3. Simulação de *docking* molecular

As simulações de *docking* molecular sítio dirigido foram realizadas no sítio de ligação dos benzodiazepínicos do receptor GABA_A, localizado entre as

subunidades α_1 e γ_2 . Para tal fim, foi utilizado o programa AutoDock (v 4.0) ¹⁸³. O programa AutoDock foi adotado por ser um programa de livre acesso, fácil utilização e que permite alterar e adicionar informações químicas dos átomos presentes nos ligantes.

Os campos de forças usuais empregados em programas de *docking* molecular não possuem informações físico-químicas sobre o átomo de paládio presente nos compostos de coordenação estudados. Portanto, para realizar as simulações com estes ligantes, foi necessário importar um arquivo contendo algumas informações químicas, como raio de *van de Waals* e volume atômico de solvatação. Esse arquivo foi obtido no próprio nicho do AutoDock (disponível em: <http://autodock.scripps.edu/resources/parameters>).

As grades foram definidas em 80.0 pontos em cada direção cartesiana. O espaçamento entre pontos da *grid* foi de 0,375Å (configuração padrão do programa). O centro da *grid* estava localizado no centro geométrico do sítio de ligação determinado pelo programa Fpocket.

Durante as simulações de *docking*, por questões de custo computacional, as cadeias laterais dos aminoácidos permaneceram rígidas e os ligantes flexíveis. Ao todo, para cada ligante (compostos de coordenação e diazepam), foram calculadas 250 poses. Foi adotada a abordagem de Algoritmo Genético, com limite máximo de gerações de $2,5 \times 10^6$. Todos os parâmetros do AutoDock foram definidos como padrão. O programa AutoDock utiliza seu próprio campo de força baseado em cálculos de energia livre semi empíricos ¹⁶⁰.

Para cada simulação, as poses geradas foram agrupadas em *clusters* por similaridade de configuração. Foi empregado um raio de corte de 2,0Å de RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

Após as simulações de *docking* molecular e agrupamento das poses, foram selecionadas as melhores poses de cada simulação. Para isso, para cada simulação, foram escolhidos os cinco *clusters* com as menores energias médias. E dentro de cada *cluster*, foi selecionada a pose com a menor energia de ligação. Essas poses foram analisadas quanto a sua orientação espacial comparada com o flumazenil complexado ao receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U), utilizando

o programa de visualização PyMol (v. 1.8). As poses com orientação semelhante ao flumazenil foram selecionadas.

As poses selecionadas foram avaliadas quanto ao seu modo de interação com o modelo construído durante as simulações de *docking* molecular, utilizando o servidor PLIP¹⁸⁴ e o programa local LigPlot+¹⁸⁵. Esses servidores têm como objetivo caracterizar as interações ligante-receptor, tais como, π -*stacking* e ligações de Hidrogênio. Vale ressaltar que antes de analisar as interações do LigPlot+, foram retirados os hidrogênios dos ligantes e dos receptores.

Antes de iniciar as simulações de *docking* com os compostos de coordenação e diazepam com os modelos construídos, foram realizadas simulações de *re-docking* do flumazenil com o receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U).

Resumidamente, o *re-docking* consiste em retirar o ligante complexado na estrutura cristalográfica e recolocá-lo, por meio de simulações de *docking* molecular. Essa metodologia é importante, pois verifica se o ligante se ligará na mesma pose no sítio de ligação da estrutura cristalográfica. Essas simulações verificam também a eficiência do algoritmo de *docking* adotado, avaliando a precisão da abordagem escolhida.

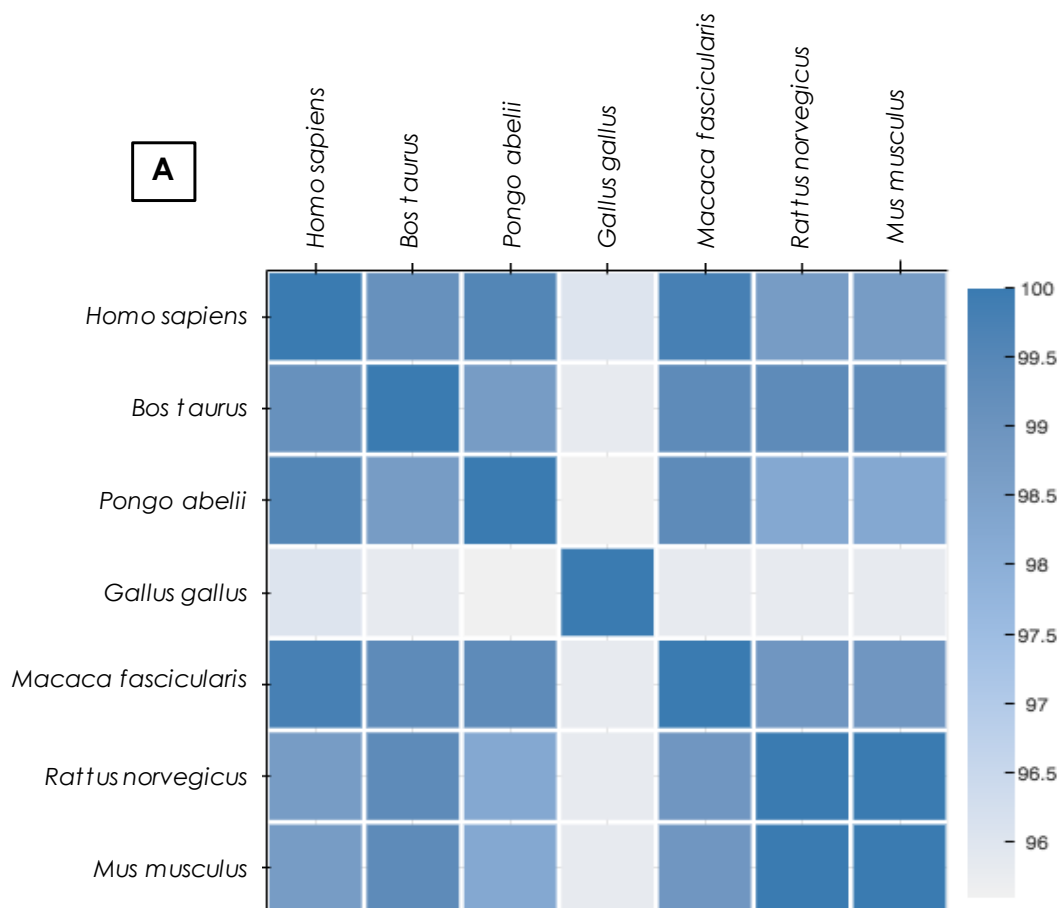
Além das simulações de *re-docking*, foram realizadas simulações de *cross-docking* do flumazenil com o modelo heteropentamérico construído do receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$.

Em linhas gerais, o *cross-docking* se baseia na retirada do ligante complexado em uma estrutura cristalográfica para testá-lo em outra estrutura proteica equivalente, sendo uma estrutura semelhante ou modela a partir deste cristal, por simulações de *docking* molecular.

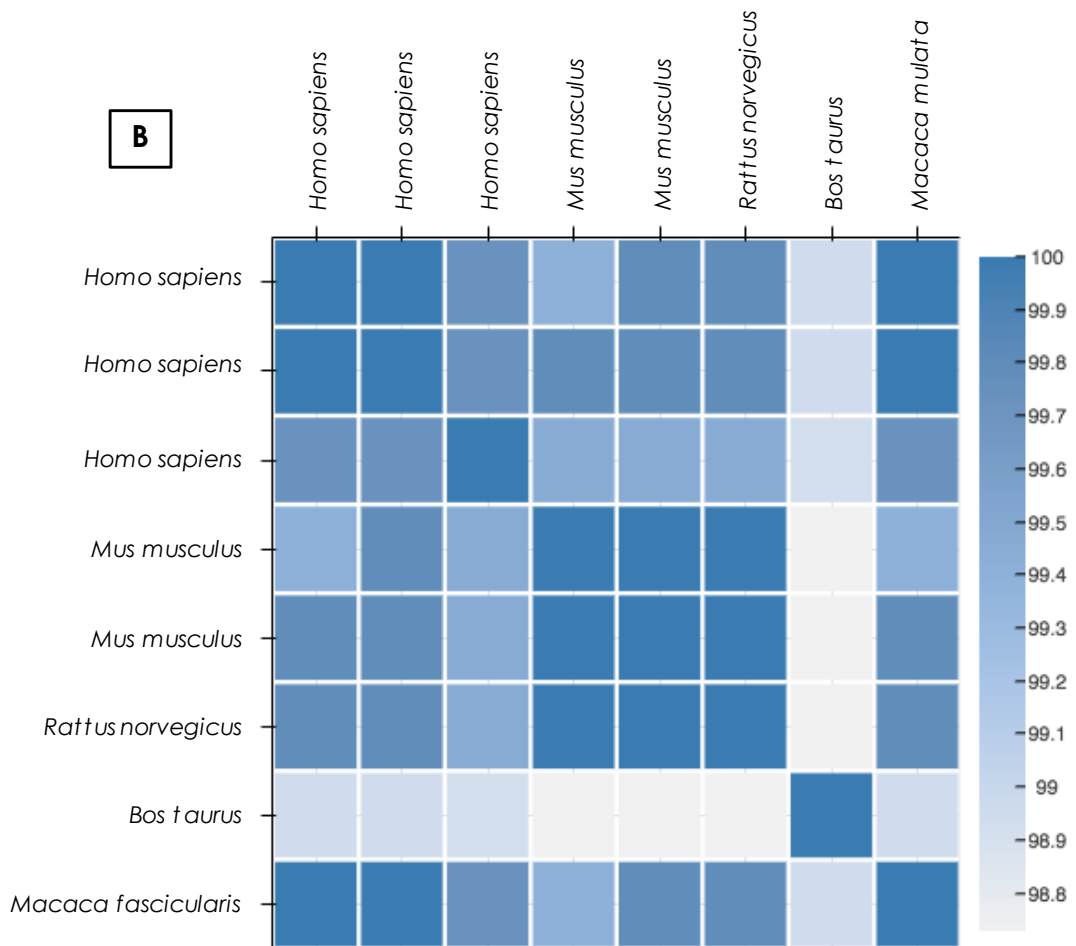
4. Resultados e discussão

4.1. Construção dos modelos do receptor GABA_A

A variação de identidade do alinhamento das sequências par a par em cada subunidade foi calculada: α_1 (95,6% - 99,78% identidade), β_2 (98,73% - 99,79% identidade) e γ_2 (91,85% - 100% identidade), incluindo as sequências de camundongos e humanos (Figura 12). Esta alta identidade no alinhamento das sequências indicam uma alta conservação entre as espécies para cada subunidade, incluindo animais não mamíferos.



B



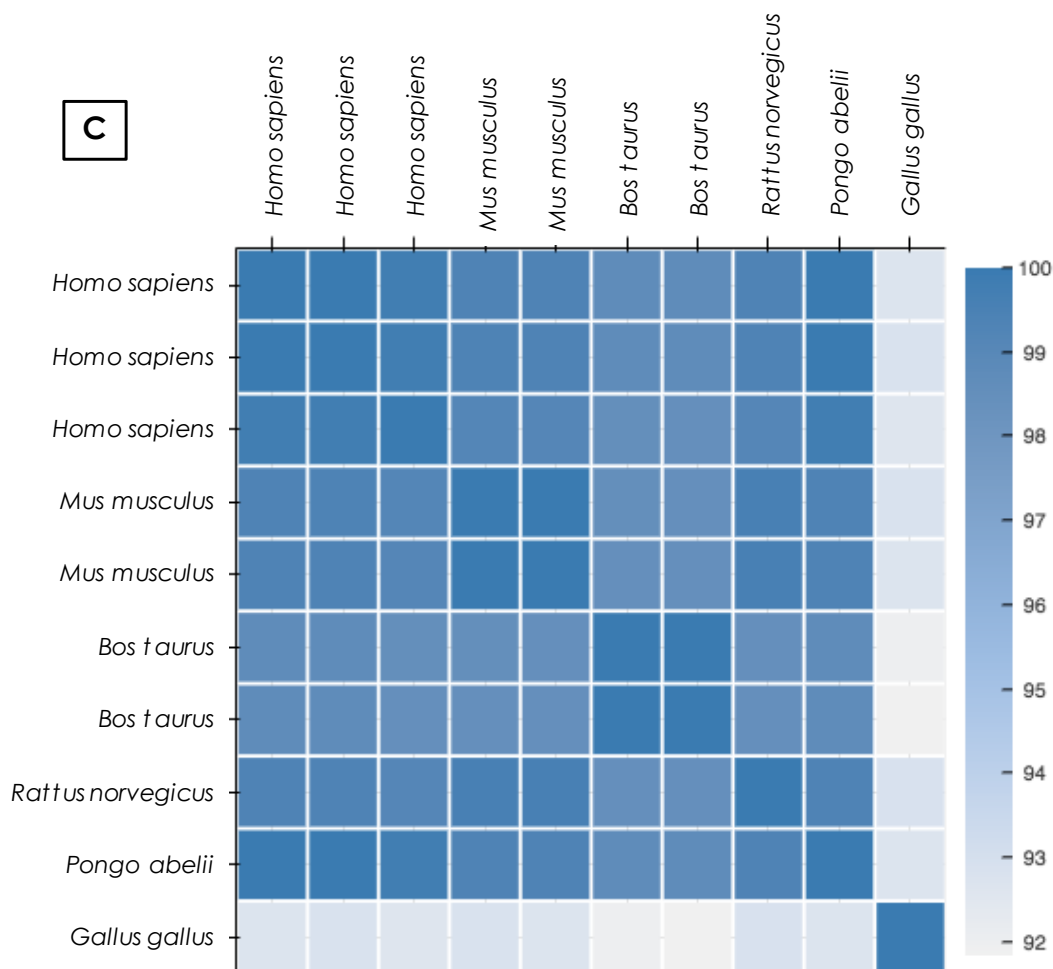


Figura 12: Matrizes de identidade das seqüências de diferentes organismos de cada isoforma do receptor GABA_A. Foi utilizado o servidor Kalign. A) Seqüências da subunidade α_1 . B) Seqüências da subunidade β_2 . C) Seqüências da subunidade γ_2 . A escala de cores indica a identidade entre as seqüências em porcentagem.

A seqüência do camundongo da subunidade α_1 (P62812), utilizada na construção dos modelos, é iniciada no resíduo de posição 40 (Thr40 - Treonina). No alinhamento, entre as posições 342 e 414, a seqüência do molde receptor GABA_A β_3 (PDB ID: 4COF) é inexistente; como essa região faz parte do domínio intracelular, não haveria prejuízos na construção dos modelos, portanto esse fragmento não foi utilizado (Figura 13A). A seqüência consenso da subunidade β_2 toma como ponto de partida o resíduo na posição 34 (Ser34 - Serina, enquanto a seqüência consenso da subunidade γ_2 na posição 64 (Gly64 - Glicina).

Nos alinhamentos das subunidades β_2 e γ_2 foram observados longos *gaps* em algumas sequências (Figura 13B e Figura 13C). Na subunidade β_2 , foi notificado um *gap* com trinta e oito resíduos, entre as posições 360 e 397, onde apenas três sequências possuíam estes aminoácidos: uma isoforma de humano (P47870), uma isoforma de camundongo (P63137) e uma sequência de *macaco rhesus* (D1LYT2). Na subunidade γ_2 , um *gap* com quarenta resíduos foi observado, sendo que apenas uma isoforma de humano (P18507-3) apresentou esta sequência de resíduos. Em ambos casos, não foram utilizados estes fragmentos de sequências durante o processo de modelagem molecular do modelo do receptor GABA_A, pois se tratava de uma região intracelular.

As identidades entre a sequência do molde β_3 e as sequências-alvo (camundongo) α_1 , β_2 e γ_2 foram de 40,56%, 89,24% e 43,86%, respectivamente. Como já comentado nas sessões anteriores, estes valores de identidade entre as sequências são considerados aceitáveis para a construção do modelo por técnica de modelagem comparativa.

Figura 13: Alinhamento das sequências de cada subunidade do receptor GABA_A agrupando diferentes organismos com o molde do receptor GABA_A β₃ homopentâmero (PDB ID: 4COF). Foi utilizado o servidor CLUSTAL Ômega. A) Alinhamento das sequências da subunidade α₁ com o molde 4COF. B) Alinhamento das sequências da subunidade β₂ com o molde 4COF. C) Alinhamento das sequências da subunidade γ₂ com o molde 4COF. Em destaque estão evidenciados os resíduos idênticos.

4.1.1. Modelo GABA_A dimérico

Como o sítio de ligação dos BZDs se encontra na porção extracelular entre as subunidades α_1 e γ_2 , primeiramente foi construído um modelo do receptor GABA_A apenas com estas duas subunidades (Figura 14). Este modelo não possui *loops* intracelulares, uma vez que o próprio molde também não os detém. As subunidades α_1 e γ_2 possuem 209 e 208 resíduos, respectivamente. O sítio de ligação dos BZDs é coberto por uma β -*hairpin*. Foram removidas as α -hélices transmembranares na região C-terminal durante a construção do modelo, uma vez que foram realizadas comparações com um modelo do receptor GABA_A $\alpha_1\gamma_2$ desprovido de α -hélices transmembranares, construído por modelagem comparativa, disponível na literatura ¹⁴⁸. A construção deste modelo depositado na literatura será explicada nas sessões posteriores.

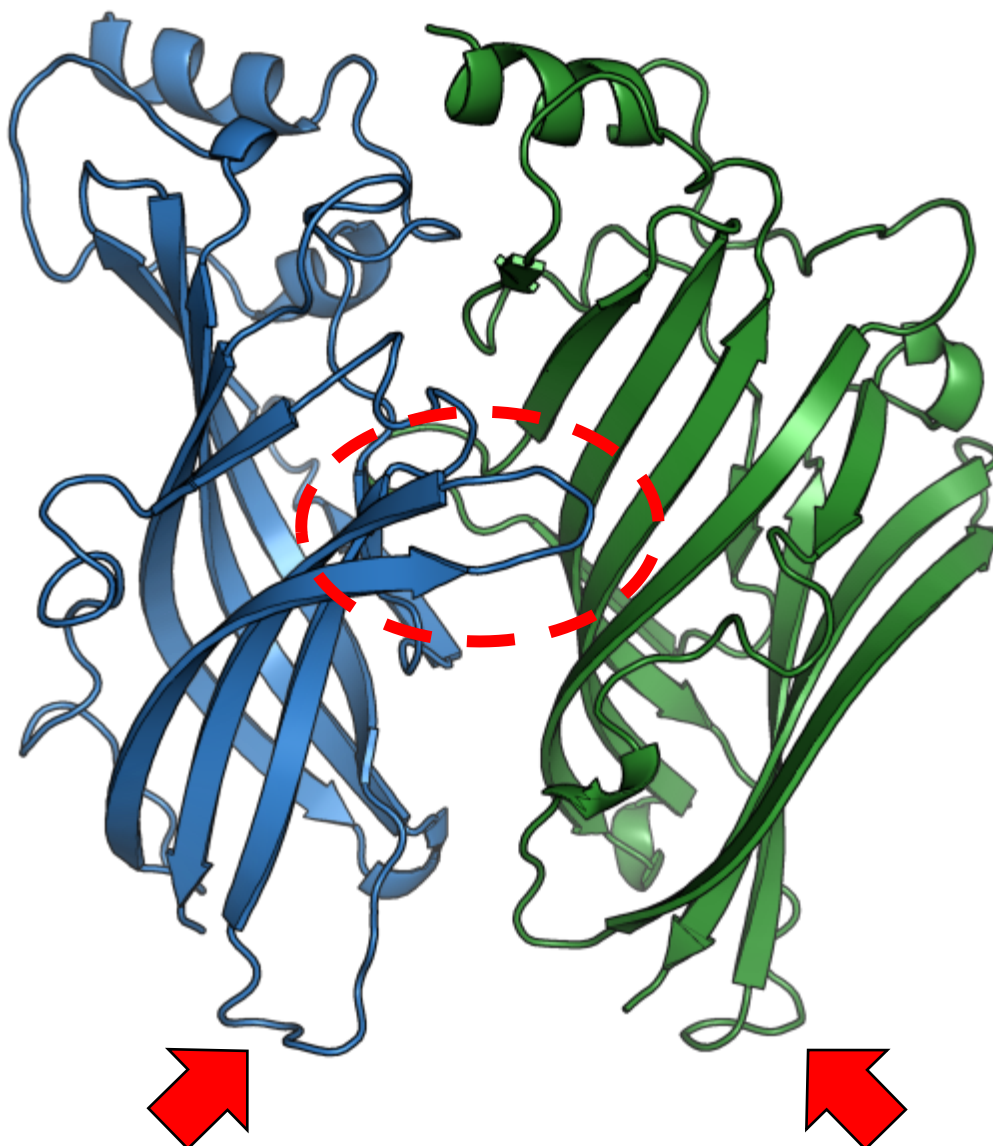


Figura 14: Representação modelo heterodimérico do receptor GABA_A ($\gamma_2\alpha_1$). Foi utilizado o programa PyMol⁸². A cadeia azul corresponde à subunidade γ_2 e a cadeia verde corresponde à subunidade α_1 . A região do sítio dos benzodiazepínicos está destacada no círculo tracejado. As setas indicam a região das α -hélices transmembranares que foram removidas.

Primeiramente, foi selecionado o modelo com a menor energia de DOPE score. Posteriormente, foi adotada uma etapa de otimização do modelo selecionado, e foi detectada uma redução da energia potencial: $-3,5e+04$ para $-4,1e+05$ kcal/mol. Após todas as etapas de otimização, ocorreu uma melhoria significativa do modelo quanto à análise estereoquímica, podendo ser observada nos gráficos de Ramachandran, obtidos pelo servidor PROCHECK, sendo notada uma redução de 0,9% para 0,3% na região desfavorável (Tabela 2). O

servidor ERRAT também apresentou uma melhora de 15,8% do fator de qualidade comparado ao modelo inicial (Tabela 2). A qualidade estereoquímica do modelo construído, otimizado e com *loops* refinados se aproxima do valor obtido para o cristal 4COF.

Na comparação entre o modelo otimizado e o *molde*, observamos que o molde apresentou resultados melhores no gráfico de Ramachandran e no servidor ERRAT. O cristal apresentou nenhum resíduo na região desfavorável e 1,0% mais resíduos na região favorável; e um fator de qualidade superior em 6,33%.

Tabela 2: Avaliação da qualidade estereoquímica do modelo utilizando Ramachandran e ERRAT

Modelos	Ramachandran			ERRAT
	R1 ¹	R2 ²	R3 ³	(Fator de Qualidade)
$\gamma_2\alpha_1$	96.5%	2.6%	0.9%	74.58%
$\gamma_2\alpha_1$ – Otimizado	95.6%	3.9%	0.5%	89.57%
$\gamma_2\alpha_1$ – Otimizado e <i>Loops</i> refinados	95.6%	4.2%	0.3%	90.45%
Modelo da literatura ¹⁴⁸	90.7%	7.4%	2.0%	76.55%
Cristal da literatura ⁴⁷ (PDB ID: 4COF) - Molde	96.6%	3.4%	0.0%	96.78%

Resultados obtidos a partir da avaliação da qualidade estereoquímica do modelo pentamérico, realizado em três etapas: (1) modelo inicial gerado pelo Modeller; (2): modelo otimizado pelo GROMACS; (3): modelo com os *loops* refinados pelo servidor ModLoop. R1: referente as regiões favoráveis. R2: referente as regiões permitidas. R3: referente a regiões desfavoráveis.

De forma geral, os perfis de DOPE *score per* resíduo do molde (PDB ID: 4COF) e o modelo gerado se apresentaram similares (Figura 15) apesar de apresentarem alternância quanto à qualidade. Essas diferenças são esperadas, uma vez que a identidade no alinhamento da sequência molde β_3 com as sequências-alvos α_1 e γ_2 foram apenas 40,56% e 43,86%, respectivamente.

Na comparação entre a subunidade α_1 do modelo e a subunidade β_3 do molde, é observado que até o resíduo na posição 70 (Thr81 – Treonina do modelo e Leu79 – Leucina do molde 4COF), os valores de DOPE *score per* resíduo são similares; entretanto, entre as posições 60 (Asp71 do modelo e Asp69 do molde - Ácido aspártico) e 120 (Arg131 do modelo e Arg129 do molde

- Arginina), e entre 170 (Ala181 – Alanina do modelo e Glu179 – Ácido glutâmico) até o final da sequência, o molde apresentou melhor qualidade; enquanto entre as posições 120 e 170, o modelo apresentou melhor qualidade. Além disso, é possível destacar que há *gaps* no perfil do modelo no resíduo de posição 69 (Met80 - Metionina); e no molde, nas posições 73 (Arg84), 166 (Ser177 - Serina) e 175 (Arg186) (Figura 15A).

Nos perfis de DOPE *score per* resíduo entre as subunidades γ_2 do modelo e β_3 do molde, o molde apresentou melhor qualidade (Figura 15B), com exceção de alguns picos, onde o modelo apresentou melhor qualidade entre os resíduos nas posições 20 (Pro24 do modelo e Pro29 do molde - Prolina) e 30 (His54 – Histidina do modelo e Gly39 - Glicina), 40 (Pro64 do modelo e Met49 do molde - Metionina) e 50 (Ile74 – Isoleucina do modelo e Leu59 do molde - Leucina), 150 (Tyr174 do modelo e Tyr159 do molde - Tirosina) e 160 (Lys184 – Lisina do modelo e Arg169 do molde); e uma região entre as posições 120 (Arg144 do modelo e Arg129 do molde) e 140 (Ser164 do modelo e Asn149 do molde - Asparagina). Foram observados *gaps* na posição 67 do molde (Gly76) e na posição 73 do modelo (Arg97) (Figura 15B).

O valor médio de DOPE *score* para a subunidade β_3 do molde foi de -0,040; enquanto as subunidades α_1 e γ_2 do modelo foram aproximadamente -0,037. Quanto menor (e conseqüentemente, mais negativo) for o valor de DOPE *score* mais o modelo é correlacionado com modelos nativos.

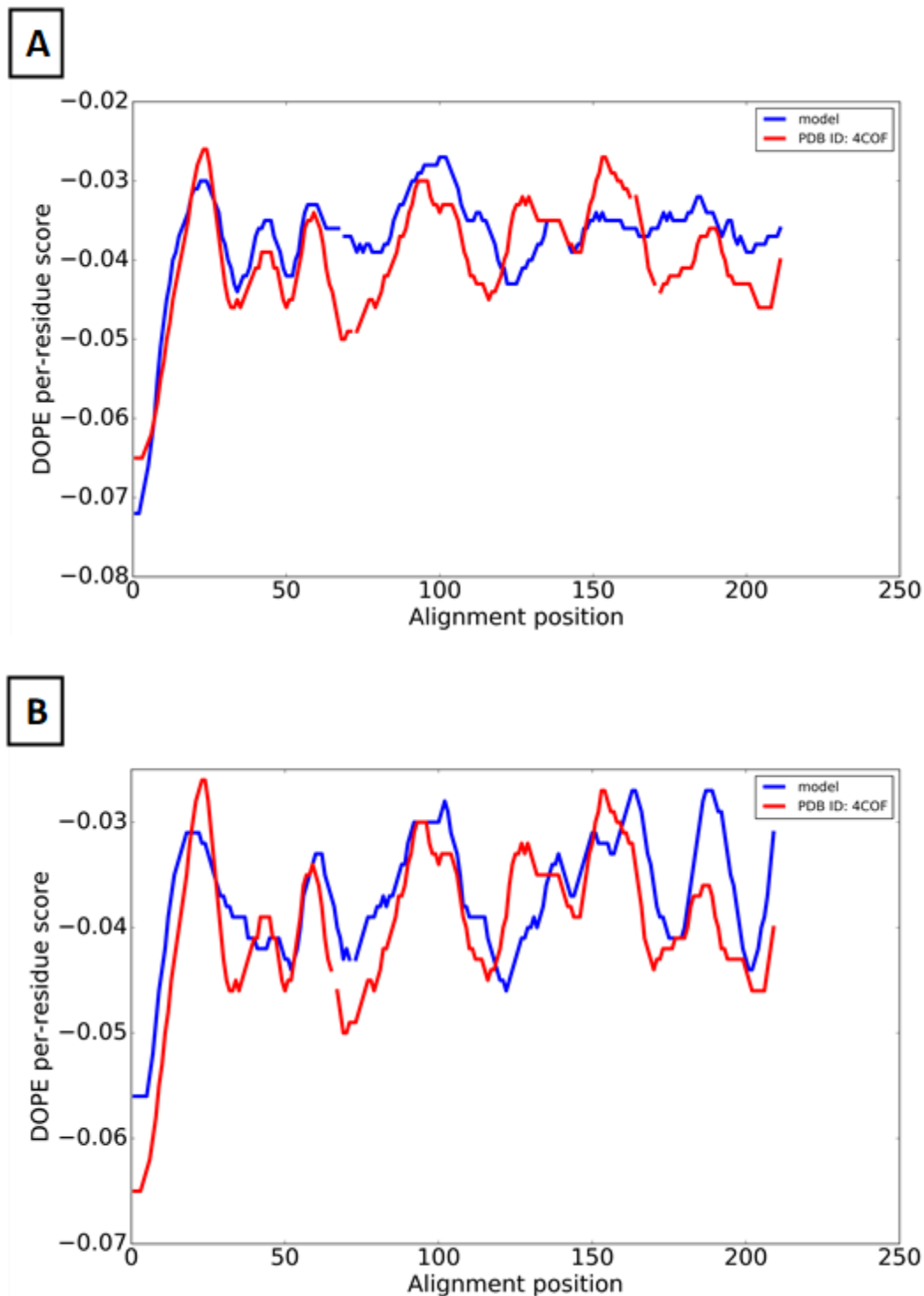


Figura 15: Perfil de DOPE score da subunidade β_3 do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) e subunidades do modelo heterodimérico construído. A) Perfil de DOPE score de uma subunidade β_3 do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) (vermelho) e a subunidade α_1 do modelo heterodimérico construído (azul). B) Perfil de DOPE score de uma subunidade β_3 do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) (vermelho) e a subunidade γ_2 do modelo heterodimérico construído (azul). Para a construção destes gráficos, foi utilizado o programa Modeller ¹⁸⁶

4.1.2. Modelo GABA_A pentamérico

Após a construção do modelo do receptor GABA_A com apenas as subunidades α_1 e γ_2 , foi realizada a construção do modelo deste receptor com suas cinco subunidades alternando entre: γ_2 - α_1 - β_2 - α_1 - β_2 (Figura 16). Cada isoforma possui entre 331 e 335 resíduos e um domínio transmembranar, formado por quatro α -hélices na região C-terminal. Assim como o modelo dímero, este modelo é desprovido de *loops* intracelulares, e o sítio de ligação dos benzodiazepínicos é recoberto por uma β -*hairpin*.

A cavidade central deste modelo possui um volume de 18.481Å³. A abertura extracelular distal possui um diâmetro máximo de 26,9Å, enquanto a abertura proximal à membrana mede 26Å e a abertura intracelular é de 12Å. O valor de RMSD do C-alfa entre o modelo construído e o receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ humano (PDB ID: 6D6U) foi de 1,841Å; e entre o modelo produzido e o molde (PDB ID: 4COF) foi de 1,371Å. Tanto o molde, quanto os modelos gerados estão na conformação aberta.

Primeiramente, dentre os modelos construídos, foi selecionado o modelo com o menor valor de DOPE *score*. Durante a etapa de otimização estrutural do modelo gerado, foi observada uma redução de energia potencial, variando de -5,5e+04, a -6,0e+05 Kcal/mol.

O modelo construído e otimizado apresentou um potencial da superfície eletrostática variado (Figura 16). A porção extracelular, incluindo a região N-terminal, apresentou um perfil predominantemente eletropositivo, com exceção de algumas regiões perto das α -hélices transmembranares. O sítio de ligação dos benzodiazepínicos, localizado na região extracelular, apresentou um potencial eletrostático de superfície mais negativo (Figura 16).

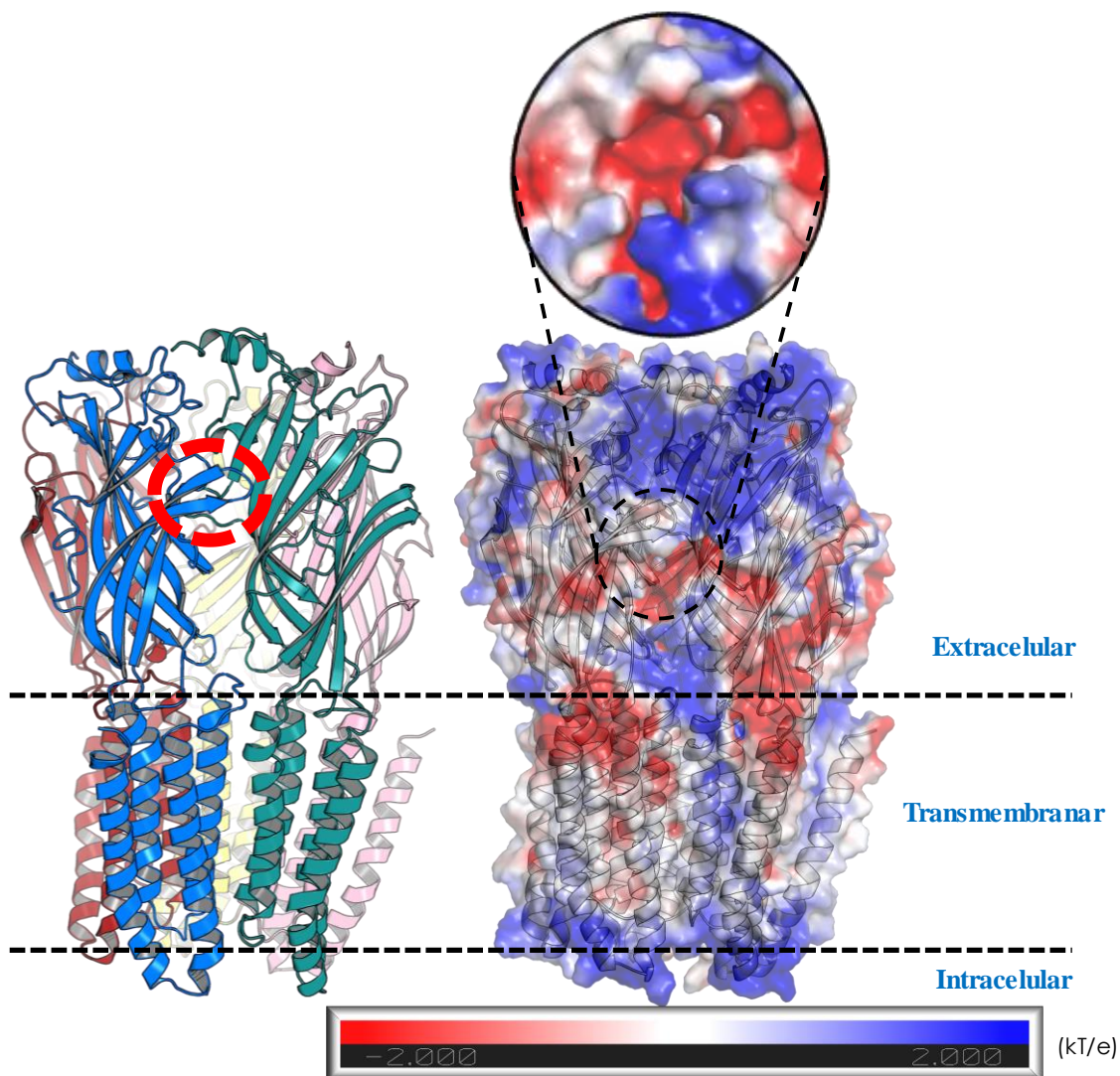


Figura 16: Representações do modelo heteropentamérico do receptor GABA_A ($\gamma_2\alpha_1\beta_2\alpha_1\beta_2$). (Esquerda) A cadeia azul corresponde à subunidade γ_2 ; as cadeias verde e amarela correspondem às subunidades α_1 ; as cadeias rosa e vermelha correspondem às subunidades β_2 . O círculo vermelho demarca o sítio clássico dos benzodiazepínicos. (Direita) O potencial eletrostático de superfície do modelo pentamérico e do sítio de ligação dos benzodiazepínicos em detalhes. Os átomos estão coloridos de acordo com suas cargas, variando entre 2,0 (azul) e -2,0 (vermelho) de potencial eletrostático em kT/e . A linha tracejada demarca a divisão da região intracelular e da extracelular.

A análise estereoquímica do modelo final avaliada utilizando o servidor ERRAT indicou uma melhora de 33% do fator de qualidade comparado com o modelo inicial (Tabela 3). Também foi observada uma melhoria nos gráficos de Ramachandran obtidos pelo servidor PROCHECK (Tabela 3), apresentando um leve aumento do número de resíduos nas regiões favoráveis, com mais de 93% dos resíduos nestas regiões, e redução nas regiões permitidas e desfavoráveis.

Tabela 3: Avaliação da qualidade estereoquímica do modelo utilizando Ramachandran e ERRAT

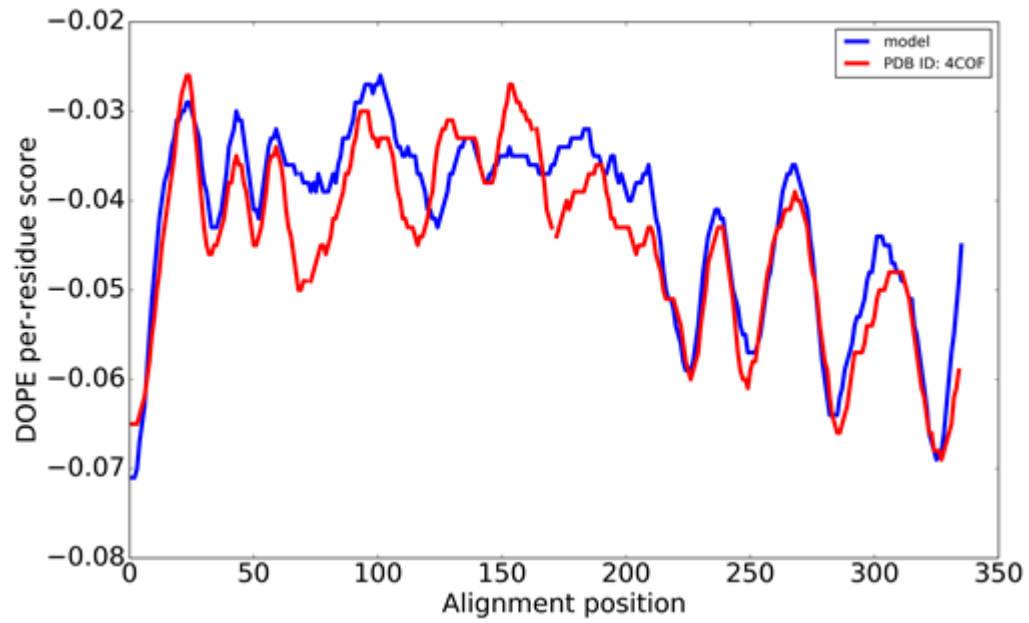
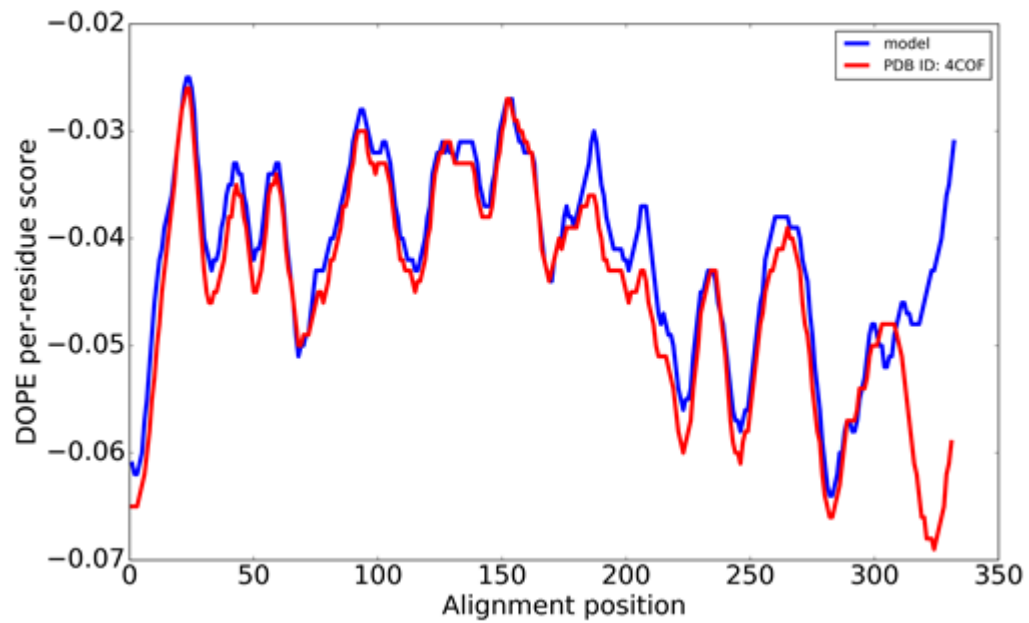
Modelo	Ramachandran			ERRAT (Fator de Qualidade)
	R1 ¹	R2 ²	R3 ³	
$\gamma_2\alpha_1\beta_2$	93,9%	5,0%	1,1%	68,58%
$\gamma_2\alpha_1\beta_2$ – Otimizados	94,0%	4,9%	1,1%	90,44%
$\gamma_2\alpha_1\beta_2$ - Otimizado e <i>Loops</i> refinados	96,8%	2,6%	0,6%	91,40%
Cristal da literatura ⁴⁷ (PDB ID: 4COF) - Molde	96,6%	3,4%	0,0%	95,09%
Cristal da literatura ⁸⁴ (PDB ID: 6D6U)	96,5%	3,5%	0,0%	78,47%

Resultados obtidos a partir da avaliação da qualidade estereoquímica do modelo pentamérico, realizado em três etapas: (1) modelo inicial gerado pelo Modeller; (2): modelo otimizado pelo GROMACS; (3): modelo com os *loops* refinados pelo servidor ModLoop. R1: referente as regiões favoráveis. R2: referente as regiões permitidas. R3: referente a regiões desfavoráveis.

Os cristais (PDB IDs: 4COF e 6D6U) e o modelo construído apresentaram similaridade entre perfis de DOPE *score per-resíduos* (Figura 17 e Figura 18), sugerindo uma boa qualidade do modelo. O perfil da subunidade α_1 do modelo e β_3 do molde 4COF apresentaram semelhanças, no formato dos picos e na qualidade, principalmente na região N-terminal, aproximadamente até o resíduo na posição 60 (Asp71 do modelo e Asp69 do molde 4COF), e na região C-terminal, aproximadamente a partir do resíduo na posição 210 (Lys221 do modelo e Gly219 do molde 4COF). Na região entre estas posições houve alternância quanto à estrutura com melhor qualidade (Figura 17A). Assim como na subunidade α_1 do modelo, os perfis de DOPE *score per-resíduo* das subunidades γ_2 do modelo e β_3 do molde 4COF também foram similares nas regiões N-terminal e C-terminal (Figura 17C). A subunidade γ_2 do modelo e a subunidade β_3 do molde apresentaram perfis de DOPE *score per-resíduo* altamente semelhantes, com formatos dos picos similares, como era esperado por terem uma alta identidade (89,24%). Curiosamente, na região C-terminal, aproximadamente a partir do resíduo 310 (Tyr334 do modelo e Trp426 do molde

4COF- Triptofano), ocorreu um decaimento inesperado da qualidade do modelo construído, porém como se tratava de uma α -hélice transmembranar, não houve qualquer prejuízo para a construção do modelo (Figura 17B).

Quanto à comparação entre os perfis das subunidades β_2 do modelo construído e da estrutura do receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ humano (PDB ID: 6D6U) (Figura 18), podemos observar que foram mais semelhantes do que a comparação anterior (Figura 17); principalmente quanto ao formato dos picos e a qualidade. Na comparação das subunidades α_1 do modelo e do receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ humano, observamos que em algumas sequências de resíduos, a estrutura 6D6U possui melhor qualidade, como nos picos que estão localizados aproximadamente nas posições 40 (Pro51 do modelo e Ser49 do molde 6D6U), 100 (Met111 do modelo e Ala109 do molde 6D6U) e 270 (Tyr281 do modelo e Lys279 do molde 6D6U) (Figura 18A). Já as subunidades β_2 apresentaram menos picos com diferenças mais claras de qualidade, como nas proximidades nas posições Val100 (Valina) e Gly210 (Glicina) (Figura 18B). A maior semelhança entre os perfis das subunidades do modelo com as da estrutura 6D6U (Figura 18B), comparado com as do 4COF (Figura 17), é bastante nítida e procedente; uma vez que a primeira comparação foi feita entre as mesmas subunidades (α_1 , β_2 e γ_2), enquanto a última comparação é realizada com a subunidade β_3 do 4COF.

A**B**

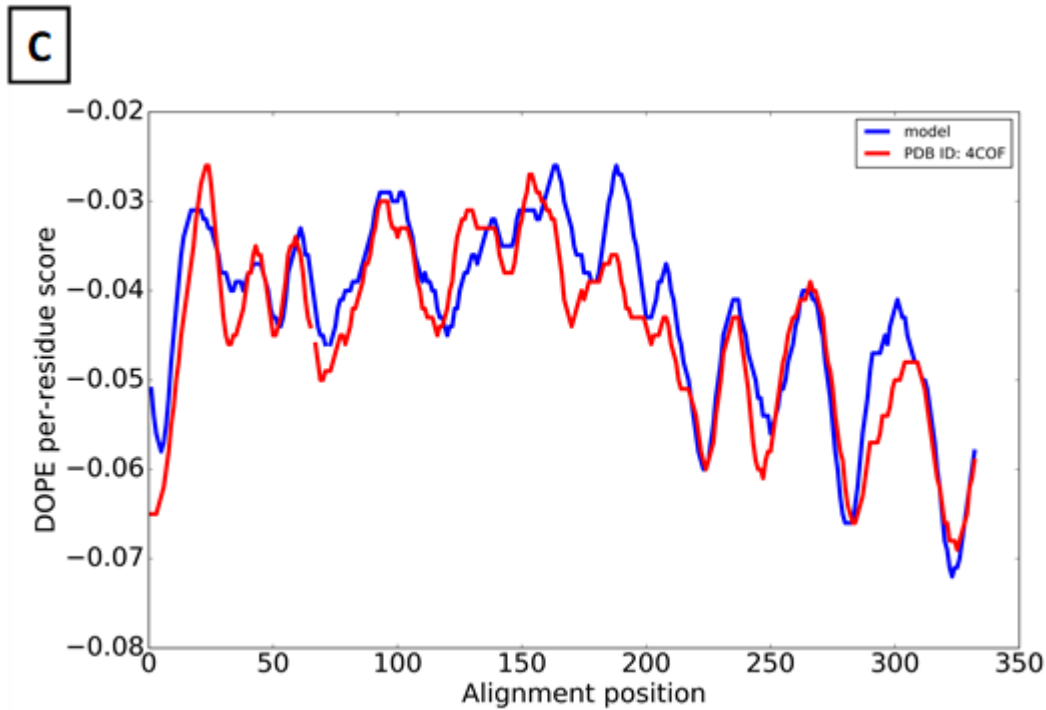
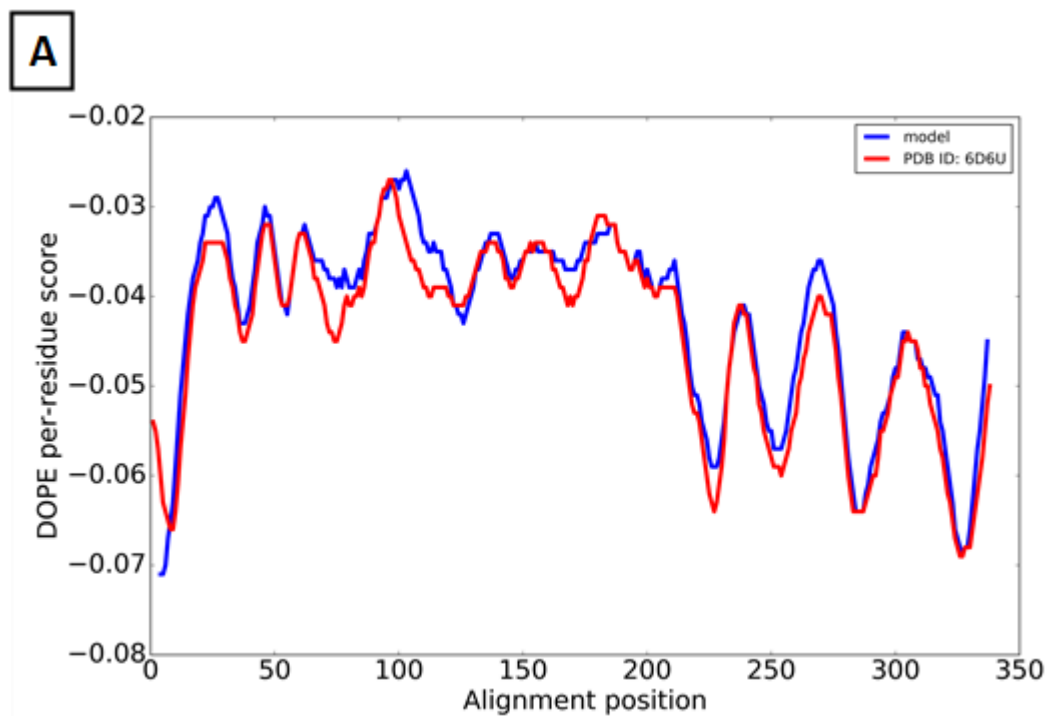


Figura 17: Perfil de DOPE score da subunidade β_3 do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) e subunidades do modelo heteropentâmero construído. A) Perfil de DOPE score de uma subunidade β_3 do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) (vermelho) e a subunidade α_1 do modelo heteropentâmero construído (azul). B) Perfil de DOPE score de uma subunidade β_3 do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) (vermelho) e a subunidade β_2 do modelo heteropentâmero construído (azul). C) Perfil de DOPE score de uma subunidade β_3 do cristal homopentâmero (PDB ID: 4COF) (vermelho) e a subunidade γ_2 do modelo heteropentâmero construído (azul).



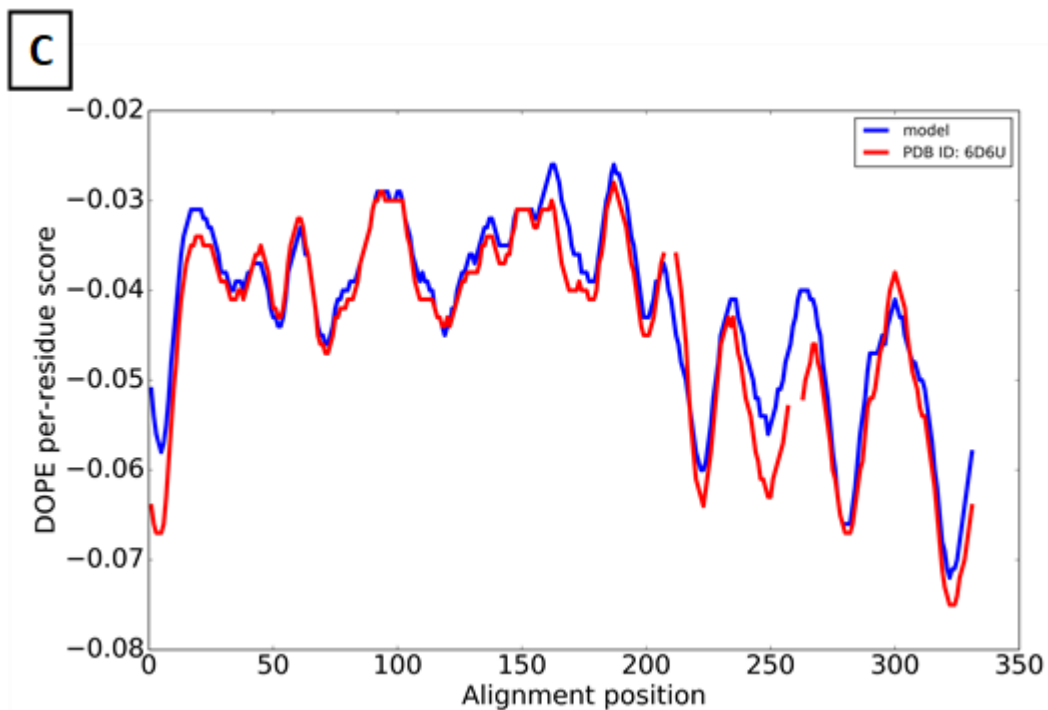
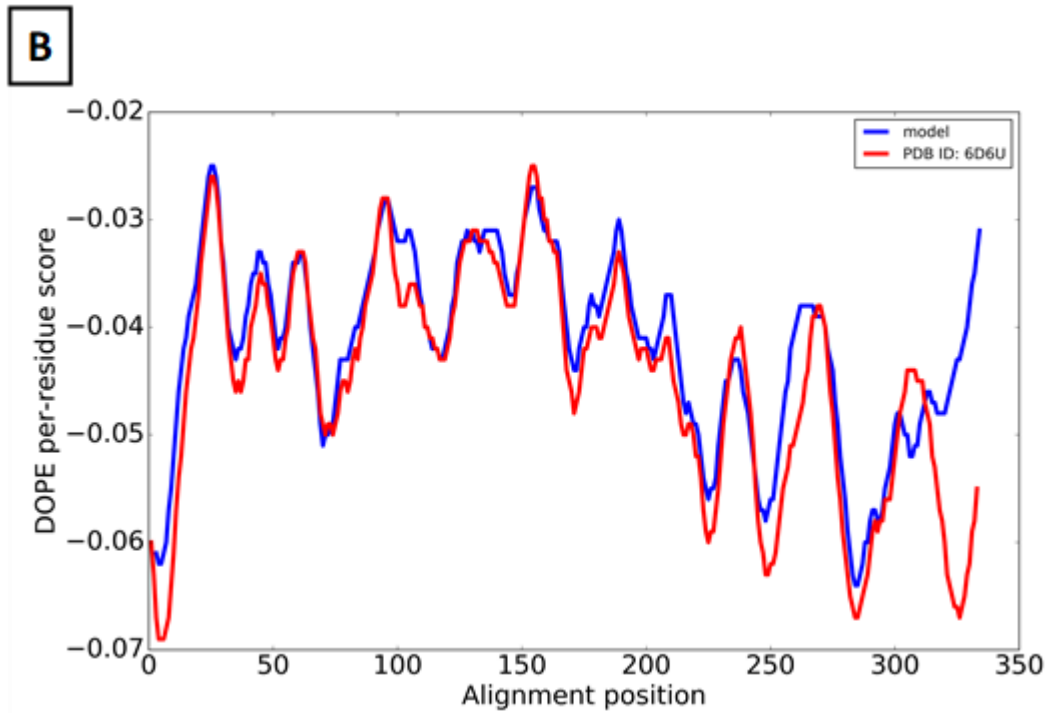


Figura 18: Perfil de DOPE score das subunidades do receptor humano $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U) e do modelo heteropentâmero construído. A) Perfil de DOPE score da subunidade α_1 do receptor humano $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U) (vermelho) e do modelo heteropentâmero construído (azul). B) Perfil de DOPE score da subunidade β_2 do receptor humano $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U) (vermelho) e do modelo heteropentâmero construído (azul). C) Perfil de DOPE score da subunidade γ_2 do receptor humano $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U) (vermelho) e do modelo heteropentâmero construído (azul).

De maneira geral, os resultados descritos acima indicam que o modelo gerado é confiável para ser utilizado em análises em ensaios de *docking* molecular.

4.2. Comparação dos modelos com a literatura

Para fins comparativos, foram feitas diferentes análises entre os modelos construídos neste projeto e os obtidos na literatura disponível.

4.2.1. Dímero

Recentemente, Richter e colaboradores construíram um modelo do receptor GABA_A constituído somente pelas subunidades $\alpha_1\gamma_2$, por modelagem comparativa ¹⁴⁸. Em seu trabalho, utilizaram seis estruturas proteicas ligadas à acetilcolina (PDB ID: 1I9B, 1UW6, 2BYN, 2BYQ, 2BYR e 2BYS) ^{74,187,188} e duas estruturas receptoras nicotínicas de acetilcolina (PDB ID: 2BG9 e 2QC1) ^{76,189} como moldes, uma vez que não havia estrutura disponível do receptor GABA_A. Foram realizadas comparações entre o modelo constituído por duas subunidades com o modelo constituído por Richter e colaboradores; pois ambos os modelos são constituídos pelas subunidades $\alpha_1\gamma_2$. Entretanto, vale ressaltar que o modelo constituído por Richter e colaboradores foi baseado em sequências de proteínas humanas ¹⁴⁸.

O valor de RMSD do C-alfa entre o modelo constituído e o modelo disponível na literatura foi de 1,08Å. Foi realizada uma análise estereoquímica do modelo da literatura utilizando o servidor ERRAT e foi observado que o modelo depositado na literatura apresentou um valor inferior de 13,9% do fator de qualidade comparado com o modelo constituído otimizado. Os gráficos de Ramachandran obtidos pelo servidor PROCHECK também mostraram maior qualidade estereoquímica do modelo constituído comparado com o encontrado na literatura (Tabela 2). Esses resultados mostram que a metodologia utilizada obteve resultados significativos, comparando com o modelo encontrado na literatura. Entretanto, deve ser levado em conta que o modelo constituído neste projeto teve como molde uma estrutura do receptor GABA_A, enquanto o modelo

construído por Richter e colaboradores foi baseado em outras proteínas similares.

4.2.2. Pentâmero

Foram realizadas comparações entre o modelo construído com cinco subunidades e o molde utilizado na sua construção (PDB ID: 4COF) e o cristal recém-publicado receptor GABA_A de humano (PDB ID: 6D6U). O valor de RMSD do C-alfa entre o modelo e o cristal correspondente ao receptor GABA humano (PDB ID: 6D6U) foi 1,841Å; enquanto entre o modelo e o molde (PDB ID: 4COF) foi 1,371Å. As análises do servidor ERRAT apontaram uma diferença significativa entre o cristal do receptor GABA_A humano (PDB ID: 6D6U) com o modelo criado e o molde utilizado (PDB ID: 4COF); porém o valor de fator de qualidade entre o modelo criado e o molde foi similar, com uma diferença de 3,69% (Tabela 3).

Quanto aos valores do gráfico de Ramachandran, foi observada pouca diferença entre as três estruturas (Tabela 3); variando até 0,3% nas regiões favoráveis, 0,9% nas regiões permitidas e 0,6% nas regiões desfavoráveis. Vale ressaltar que a comparação é feita entre espécies diferentes, uma vez que tanto o cristal heteropentamérico (PDB ID: 6D6U), quanto o cristal β_3 homopentamérico (PDB ID: 4COF) são oriundos de humanos; enquanto na construção do modelo foram utilizadas sequências de *Mus musculus*.

4.3. Sítio ativo dos benzodiazepínicos

Anterior às simulações de *docking* molecular do diazepam e compostos de coordenação, foi realizada a predição dos resíduos que delimitam o sítio de ligação dos benzodiazepínicos do modelo construído (Figura 19). Os resíduos preditos da subunidade α_1 foram: Phe99(α_1), His101(α_1), Gly157(α_1), Ser158(α_1), Tyr159(α_1), Val202(α_1), Gln203(α_1), Ser204(α_1), Ser205(α_1), Thr206(α_1), Gly207(α_1), Tyr209(α_1), Val210(α_1), Val211(α_1), Asp56(γ_2), Tyr58(γ_2), Val59(γ_2), Phe77(γ_2), Ala79(γ_2), Met130(γ_2), Leu140(γ_2), Thr142(γ_2), Lys184(γ_2), Arg185(γ_2) e Asp192(γ_2). A cavidade apresenta um potencial de superfície principalmente

negativo (Figura 16), e vários resíduos aromáticos fazem parte dela: Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2), Phe99(α_1), Tyr159(α_1) e Tyr209(α_1).

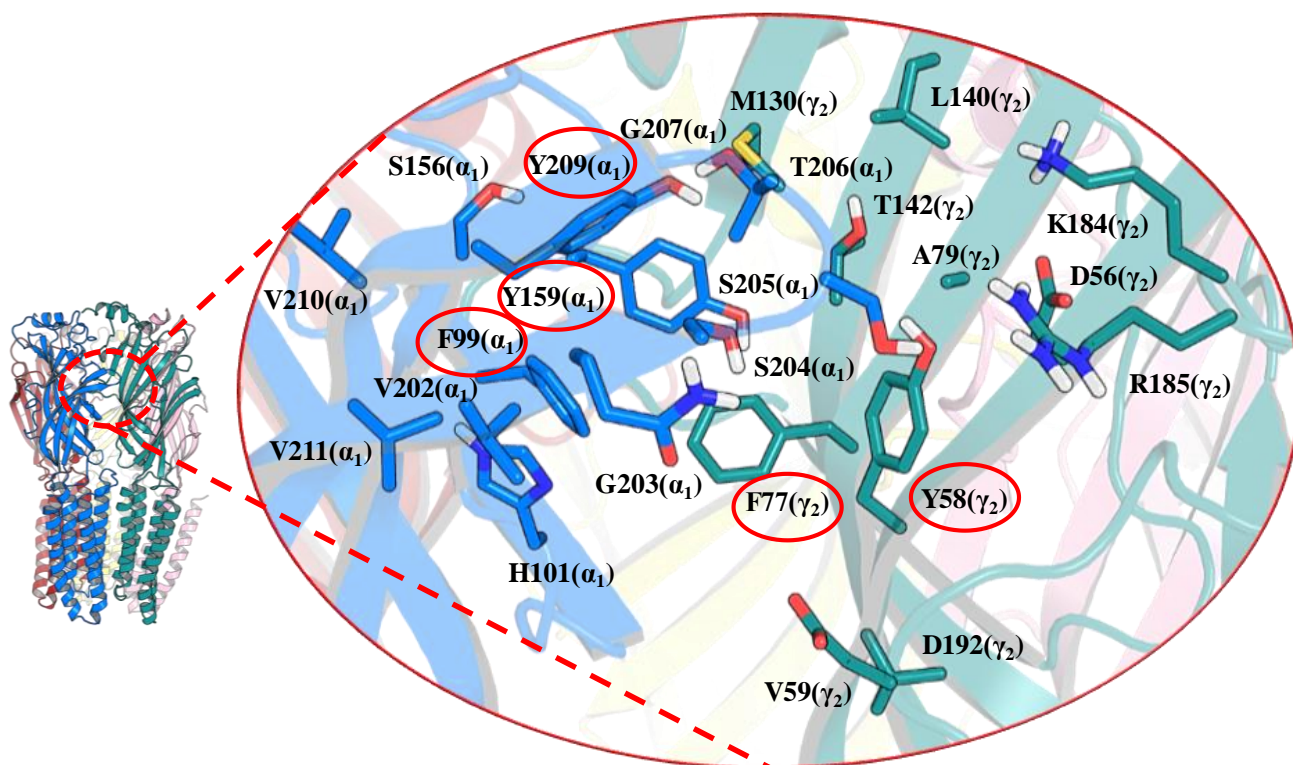


Figura 19: Representação do sítio de ligação dos benzodiazepínicos do modelo heteropentamérico do receptor GABA_A ($\gamma_2\alpha_1\beta_2\alpha_1\beta_2$). A cadeia azul corresponde à subunidade γ_2 e a cadeia verde corresponde à subunidade α_1 .

No trabalho publicado por Richter e colaboradores ¹⁴⁸, com seu modelo foram realizadas simulações de *docking* molecular com o diazepam. Eles observaram que o diazepam interagia com os resíduos: His101(α_1), Tyr131(α_1), Val202(α_1), Ser204(α_1), Thr206(α_1), Tyr209(α_1) e Val211(α_1), Phe77(γ_2), Ala79(γ_2) e Thr142(γ_2) (Figura 20). Com exceção do resíduo Tyr131(α_1), todos estes resíduos foram preditos no sítio de ligação dos benzodiazepínicos do modelo construído neste trabalho.

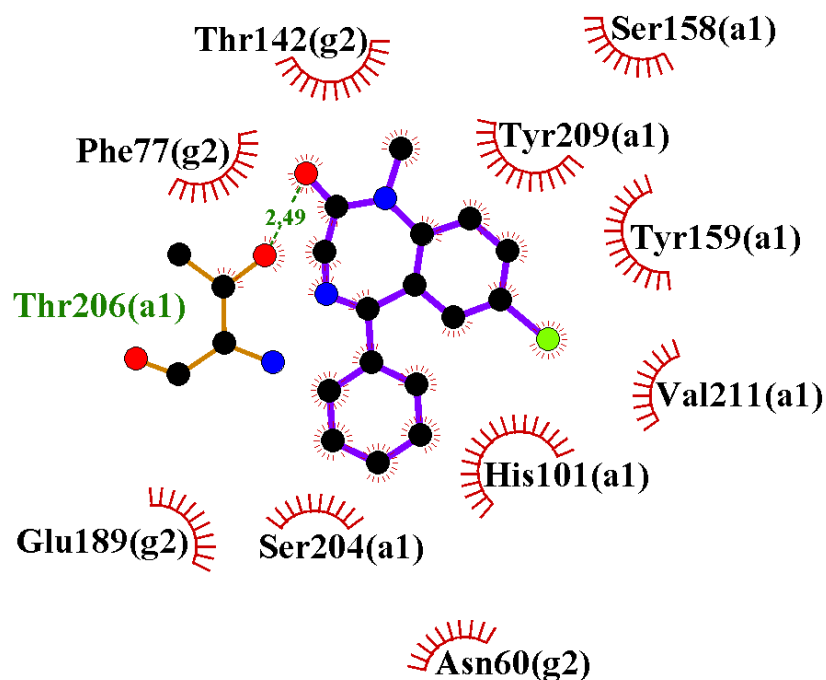


Figura 20: Mapa de interação do diazepam no receptor dímico GABA_A construído por Richter e colaboradores (Richter et al., 2012), gerado pelo LigPlot+. O modelo e o ligante foram obtidos nos arquivos suplementares da publicação por Richter e colaboradores (Richter et al., 2012).

O cristal do receptor GABA_A humano (PDB ID: 6D6U) recentemente publicado ⁸⁴ está complexado com o flumazenil, se tratando de um antagonista do sítio dos benzodiazepínicos. Assim como o diazepam, o flumazenil também possui um anel benzênico e um anel diazepínico de sete membros, formando o anel 1-4 benzodiazepina. No caso do flumazenil, há um átomo de flúor associado ao carbono da posição sete deste anel; enquanto o diazepam possui um átomo de cloro nesta mesma posição (Figura 21). Nesta publicação, foi observado que o flumazenil interage com os resíduos: His101(α₁); Tyr159(α₁); Ser204(α₁); Ser205(α₁), Tyr209(α₁), Tyr58(γ₂); Phe77(γ₂); Ala79(γ₂) e Thr142(γ₂); além disso, realizou interações específicas de ligação de hidrogênio com His102(α₁) (corresponde ao resíduo His101(α₁)) e com Thr142(γ₂), e também uma interação *π-stacking* com o resíduo Tyr210(α₁) (corresponde ao resíduo Tyr209(α₁)) (Figura 22) ⁸⁴.

A ligação de hidrogênio com His102(α₁) (corresponde ao resíduo His101(α₁)) foi realizada com o flúor do flumazenil, destacando a importância desse resíduo na ligação com ligantes da classe dos benzodiazepínicos, e

incluindo seus antagonistas, como o flumazenil, corroborando com os achados da literatura.

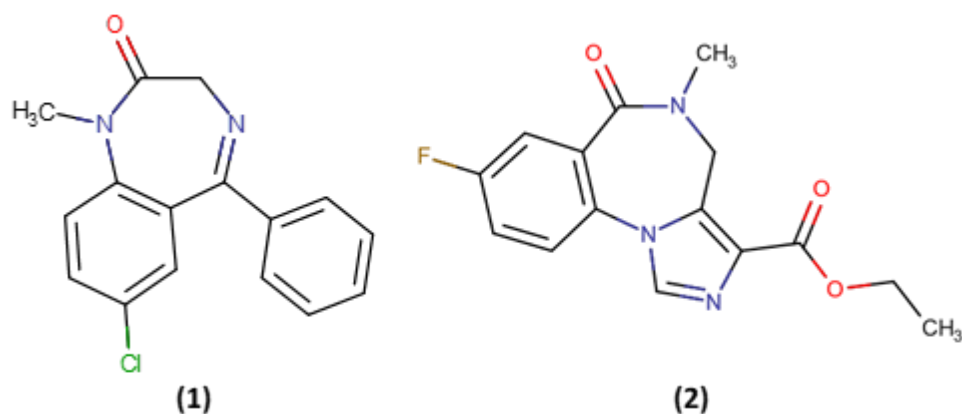


Figura 21: Estrutura bidimensional dos ligantes. 1) Diazepam. 2) Flumazenil.

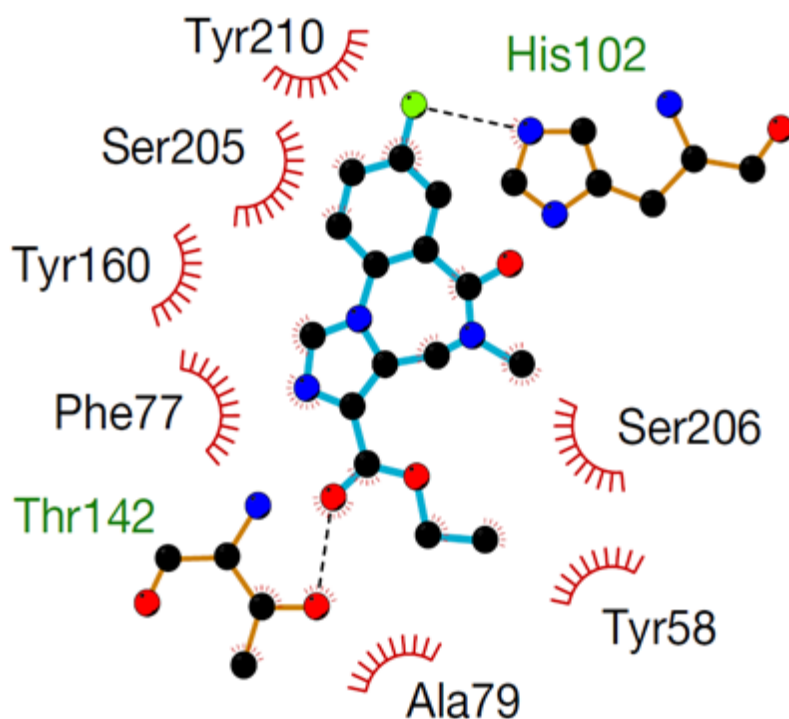


Figura 22: Mapa de interação gerado pelo LigPlot+ do flumazenil no receptor GABA_A humano (PDB ID: 6D6U), retirado diretamente da literatura (Zhu et al., 2018). A ordem dos resíduos pertencentes à subunidade α_1 não estão alinhados ao modelo construído neste trabalho, portanto os resíduos His102(α_1), Tyr160(α_1), Ser205(α_1), Ser206(α_1) e Tyr210(α_1), correspondem aos resíduos His101(α_1), Tyr159(α_1), Ser204(α_1), Ser205(α_1) e Tyr209(α_1). Os resíduos Tyr58, Phe77, Ala79 e Thr142 pertencem à subunidade γ_2 .

Posteriormente, foi realizado um alinhamento entre as sequências das subunidades α_1 e γ_2 do modelo com as sequências correspondentes da estrutura cristalográfica heteropentamérica de humano, mostrando a conservação dos resíduos preditos no sítio dos benzodiazepínicos, entre diferentes espécies, humano e camundongo (Figura 23).

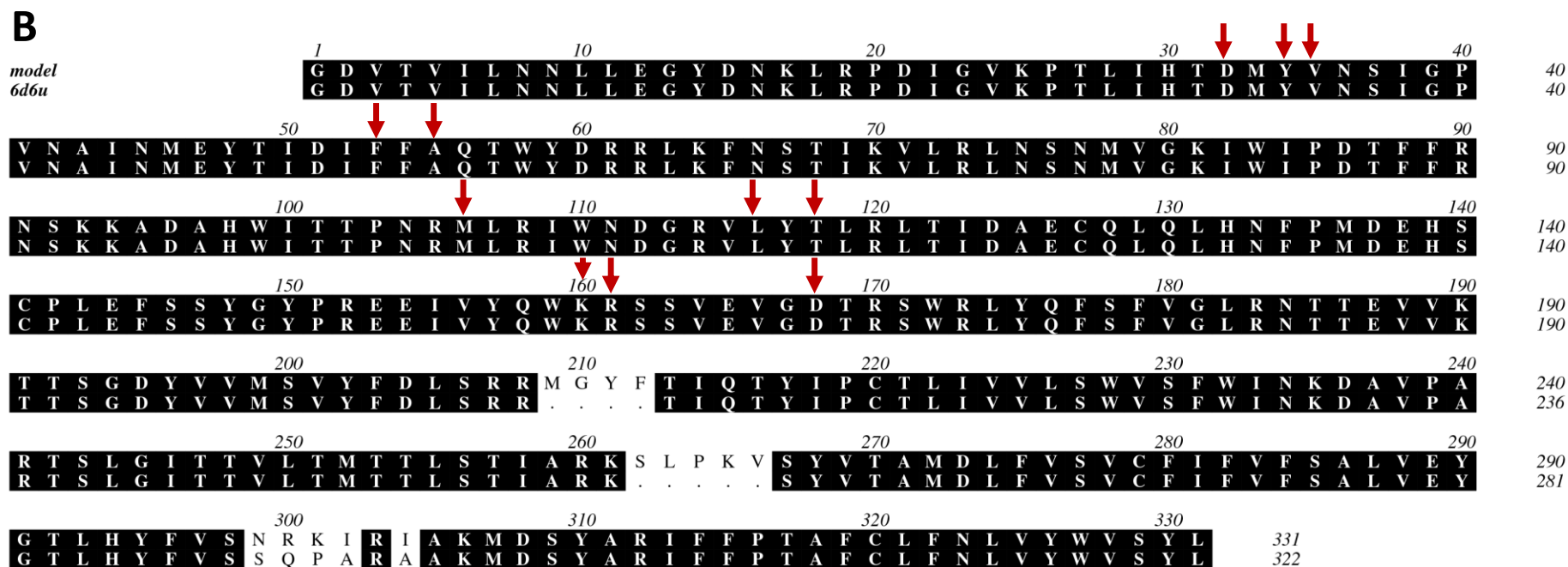


Figura 23: Alinhamento das seqüências das subunidades α_1 (A) e γ_2 (B) do modelo GABA_A com o cristal heteropentamérico humano (PDB ID: 6D6U). Foi utilizado o servidor Clustal Ômega. As setas em vermelho indicam os resíduos preditos do sítio dos benzodiazepínicos do modelo construído, utilizando o programa FPocket.

Como mencionado nas sessões anteriores, o modelo foi construído baseado em sequências proteicas da espécie *Mus musculus*, enquanto o cristal heteropentamérico (PDB ID: 6D6U) é oriundo de humano; portanto alguns resíduos que compõem o sítio dos benzodiazepínicos no modelo construído foram comparados a este cristal do receptor GABA_A humano analisando o RMSD do C-alfa (Tabela 4).

Após as modificações necessárias nas cadeias laterais dos resíduos preditos e o processo de otimização, foi realizada uma análise dos valores de RMSD do C-alfa destes resíduos no modelo gerado comparando com o cristal humano. Foram observados valores de RMSD inferiores a 1,0Å e uma redução destes valores quando comparados aos valores de RMSD das cadeias laterais antes das suas modificações (Tabela 4) (Figura 24). Foi observado que os resíduos Ser204(α_1) e Thr142(γ_2), as cadeias laterais sofreram rotações para o interior do sítio de ligação (Figura 24).

Tabela 4: Valor de RMSD dos resíduos do sítio dos BZDs entre o modelo e o PDB ID: 6D6U, antes e depois do processo de otimização das cadeias laterais.

RMSD (C-α): modelo x PDB ID: 6D6U		
	Antes	Depois
His101(α_1)	1,175 Å	0,273 Å
Tyr159(α_1)	0,184 Å	0,155 Å
Ser204(α_1)	0,593 Å	0,192 Å
Ser205(α_1)	0,744 Å	0,603 Å
Tyr209(α_1)	0,885 Å	0,789 Å
Tyr58(γ_2)	0,144 Å	0,153 Å
Phe77(γ_2)	0,684 Å	0,699 Å
Ala79(γ_2)	0,230 Å	0,240 Å

Thr142(γ_2)	1,012 Å	0,125 Å
----------------------	---------	---------

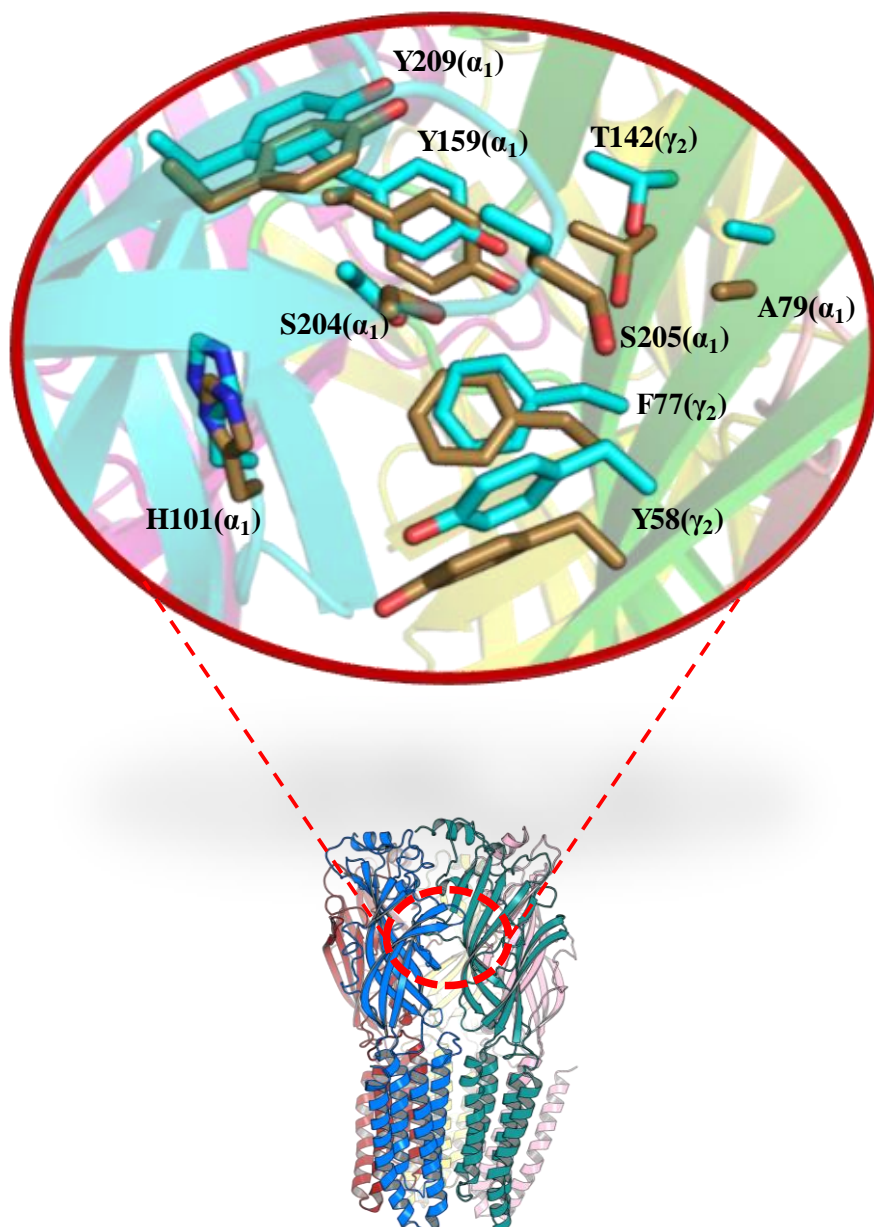


Figura 24: Representação do sítio de ligação dos BZDs do GABA_A. Em cobre, os resíduos do modelo; em azul, os resíduos do cristal heteropentamérico (PDB ID: 6D6U).

A técnica de modelagem comparativa foi de crucial importância na construção de modelos dimérico e heteropentamérico do receptor GABA_A, a

partir de uma estrutura cristalográfica β_3 homopentamérica, permitindo realizar análises estruturais desses modelos.

As avaliações quanto à qualidade do modelo, quando comparadas ao modelo da literatura e as estruturas cristalográficas, mostram uma qualidade satisfatória do modelo construído, sugerindo seu uso em estudos estruturais, incluindo técnicas de *docking* molecular de pequenas moléculas.

4.4. Construção dos ligantes

Neste trabalho foram construídos cinco compostos de coordenação derivados do diazepam associados a átomos de paládio (Figura 8), se baseando no trabalho de Barros e colaboradores (2016) ¹²⁹. Dos ligantes derivados de paládio utilizados neste trabalho, dois possuem dois átomos de paládio; em um deles, nomeado como [(DZP)PdCl]₂, os átomos de paládio estão associados a átomos de cloro; no outro composto de coordenação, nomeado como [(DZP)PdOAc]₂, os átomos de paládio estão associados a grupos acetato. Os outros três compostos de coordenação possuem apenas um átomo de paládio em suas estruturas; no ligante denominado como [(DZP)PdOAcPPh₃], o átomo de paládio está associado a um grupo acetato e possui trifenilfosfina na sua composição; no [(DZP)PdClPPh₃], o paládio está associado a íon cloro e também possui trifenilfosfina na sua estrutura; e por fim, o átomo de paládio do [(DZP)PdClPy] está associado a íon cloro e possui uma piridina na sua composição.

Foram calculadas as cargas parciais dos átomos de paládios para cada composto de coordenação: [(DZP)PdOAcPPh₃]: 0,217e; [(DZP)PdClPPh₃]: 0,152e; [(DZP)PdClPy]: -0,037e; [(DZP)PdCl]₂: 0,211e e 0,218e; [(DZP)PdOAc]₂: 0,202e e 0,202e. Para tal fim, foi utilizado o programa Gaussian09 ¹⁷⁹.

Após o cálculo das cargas parciais de cada ligante pelo Gaussian09, foi notado que a soma dessas cargas, incluindo as do paládio, foi excedente, tornando os ligantes carregados positivamente. Para resolver este problema, os excessos de cargas foram distribuídos homoganeamente entre todos os átomos, resultando em pequenas variações em relação às cargas originais calculadas

pelo método Gaisteiger. Por fim, os valores finais dos átomos de paládio para cada composto de coordenação foram: [(DZP)PdOAcPPh₃]: 0,212; [(DZP)PdClPPh₃]: 0,148; [(DZP)PdClPy]: -0,018; [(DZP)PdCl]₂: 0,216 e 0,223; [(DZP)PdOAc]₂: 0,194 e 0,194.

Após o processo de otimização, todos os cinco compostos de coordenação apresentaram uma geometria de quadrado planar. Nos complexos metálicos com dois átomos de paládio, os átomos de cloro ([[(DZP)PdCl]₂) e dois oxigênios do grupamento acetato ([[(DZP)PdOAc]₂) ligados aos átomos de paládio sofreram hibridização. Nos ligantes [(DZP)PdOAcPPh₃] e [(DZP)PdClPPh₃], o átomo de fósforo do grupamento trifenilfosfina também sofreu hibridização. Em todos os complexos metálicos, o nitrogênio do anel 1-4 benzodiazepina ligando com paládio também passou por um processo de hibridização.

4.5. Ensaio de *docking* molecular

O diazepam e os compostos de coordenação foram submetidos a ensaios de *docking* molecular no sítio de ligação dos benzodiazepínicos.

As poses dos ensaios de *docking* molecular de cada ligante foram agrupadas em *clusters* conformacionais usando um raio de corte de 2,0Å, e as médias das energias de interação foram calculadas. Após as simulações, foram selecionados os cinco *clusters* com as menores energias médias. Dentro destes *clusters*, foram analisados os modos de interação destes ligantes, observando a orientação do átomo de cloro associado ao anel 1-4 benzodiazepina do diazepam e dos compostos de coordenação com a His101(α₁) do sítio de ligação dos BZDs do modelo. Para cada simulação, dentro do *cluster* escolhido, foi analisado o perfil de interação destes ligantes com os resíduos do sítio de ligação dos BZDs, utilizando os programas LigPlot+ e PLIP.

4.5.1. *Re-docking e cross-docking*

Os ensaios de *re-docking* mostraram que o flumazenil interagiu diretamente com treze resíduos: Phe99(α_1), His101(α_1), Ser158(α_1), Tyr159(α_1), Ala160(α_1), Ser204(α_1), Ser205(α_1), Thr206(α_1), Tyr209(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2), Met130(γ_2) e Thr142(γ_2) (Figura 25); englobando todos os nove resíduos preditos no modelo publicado na literatura. Além disso, foram observadas quatro interações específicas: π -stacking com o resíduo Tyr209(α_1); uma ligação de hidrogênio com Ala160(α_1) e duas com Thr206(α_1) (Tabela 5). Foi calculado o valor de RMSD entre o flumazenil do *re-docking* e o flumazenil complexado com o cristal heteropentamérico humano (6D6U), e foi encontrado o valor de 0,57Å.

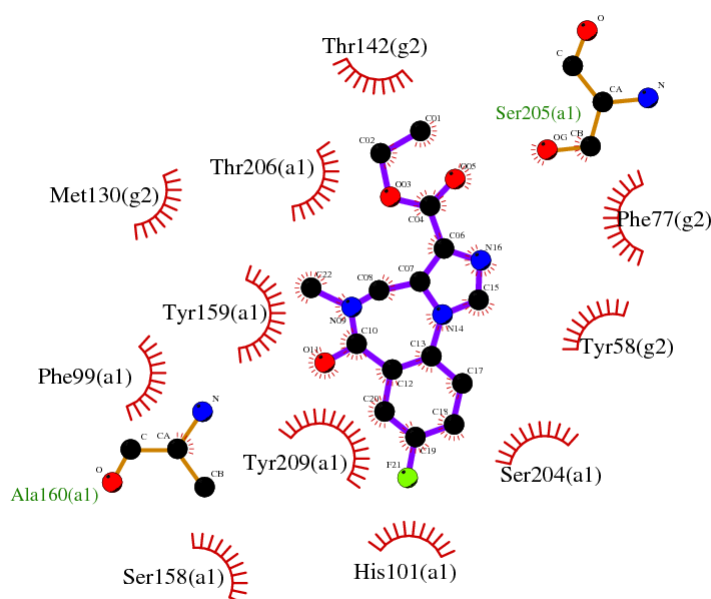


Figura 25: Mapas de interação do *re-docking* do flumazenil com o receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U). Os resíduos marcados com 'a1' pertencem à subunidade α_1 e os resíduos marcados com 'g2' pertencem à subunidade γ_2 .

Tabela 5: Interações específicas do *re-docking*

Interações	π -stacking		Ligações de Hidrogênio		
	Resíduo	Distância (Å)	Doador	Aceptor	Distância (Å)
Re-docking	Tyr209(α_1)	3,6	Ala160(α_1):NA	O2:lig	1,8

Thr206(α_1):NA	N2:lig	2,5
Thr206(α_1):O3	O2:lig	2,0

Interações detectadas pelo servidor PLIP para *re-docking* do flumazenil com o receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U). Lig se refere ao ligante em questão.

Os ensaios de *cross-docking* apresentaram as interações com dez resíduos: His101(α_1), Ser158(α_1), Tyr159(α_1), Ser204(α_1), Tyr209(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2), Ala79(γ_2), Met130(γ_2) e Thr142(γ_2). Assim como nos ensaios de *re-docking*, todos os resíduos preditos na literatura também foram observados nas simulações de *cross-docking* (Figura 26). As interações específicas reportadas pelo servidor PLIP foram: π -stacking com Phe77(γ_2) e ligação de hidrogênio com Thr142(γ_2) (Tabela 6).

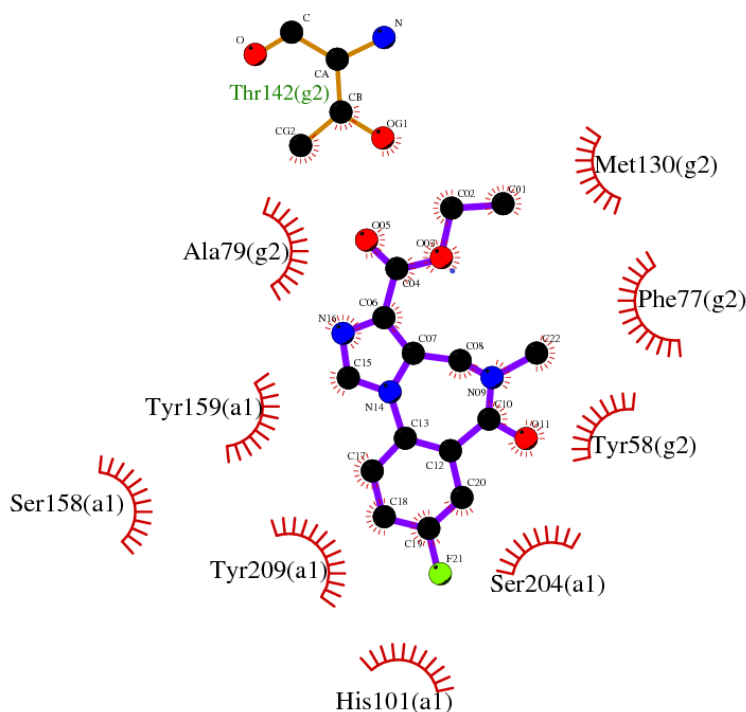


Figura 26: Mapas de interação do *cross-docking* do flumazenil com o modelo construído otimizado. Os resíduos marcados com 'a1' pertencem à subunidade α_1 e os resíduos marcados com 'g2' pertencem à subunidade γ_2 .

Tabela 6: Interações específicas do *cross-docking*

Interações	π -stacking		Ligações de Hidrogênio		
	Resíduo	Distância (Å)	Doador	Aceptor	Distância (Å)
Cross-docking	Phe77(γ_2)	4,1	Thr142(γ_2):O3	O3:lig	2,0

Interações detectadas pelo servidor PLIP para *cross-docking* do flumazenil com o com o modelo construído otimizado. Lig se refere ao ligante em questão.

Foram calculados os valores de RMSD entre as poses do *re-docking* (Figura 27) e *cross-docking* (Figura 28) com o complexo cristalográfico (PDB ID: 6D6U). O cálculo foi realizado com as proteínas superpostas no VMD (Visual molecular dynamics)¹⁹⁰ e calculado o RMSD dos ligantes em função dos cristais.

O valor de RMSD reportado foi de 2,6Å para o ensaio de *re-docking*. Apesar do valor consideravelmente alto de RMSD, é possível observar que os átomos de flúor do complexo e do *re-docking* estão voltados para a mesma direção, entretanto os anéis diazepínico e benzeno estão voltados para direções opostas (Figura 27); além disso, é importante ressaltar que o perfil de interação da pose de *re-docking* com o sítio dos BZDs, apresentado pelo programa LigPlot+ (Figura 25) é similar ao perfil de interação apresentado na literatura (Figura 22).

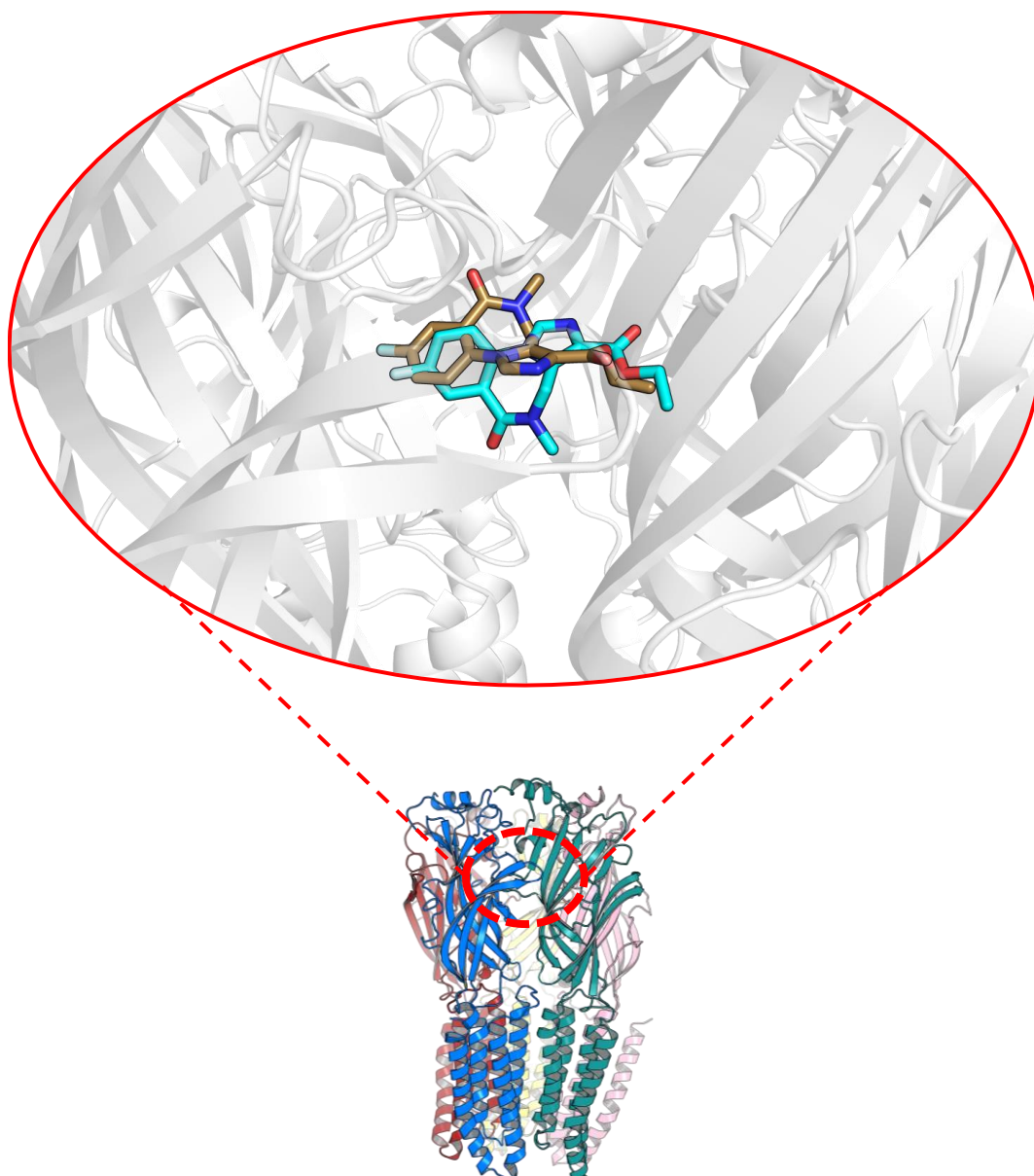


Figura 27: Pose do flumazenil complexado ao cristal heteropentamérico humano (PDB ID: 6D6U), em azul. E o seu *re-docking*, em cobre.

O valor de RMSD obtido entre o *cross-docking* e *docking* e o complexo cristalográfico do flumazenil como receptor heteropentamérico humano (PDB ID: 6D6U) foi de 3,1Å. É possível observar que o átomo de flúor do flumazenil complexado e da simulação de *cross-docking* estão voltados para a mesma direção (Figura 28). Os anéis benzeno e diazepínico também estão em direções similares. O perfil de interação da pose de *cross-docking* com o sítio dos benzodiazepínicos, apresentado pelo programa LigPlot+ (Figura 26) é similar com o perfil de interação apresentado na literatura (Figura 22).

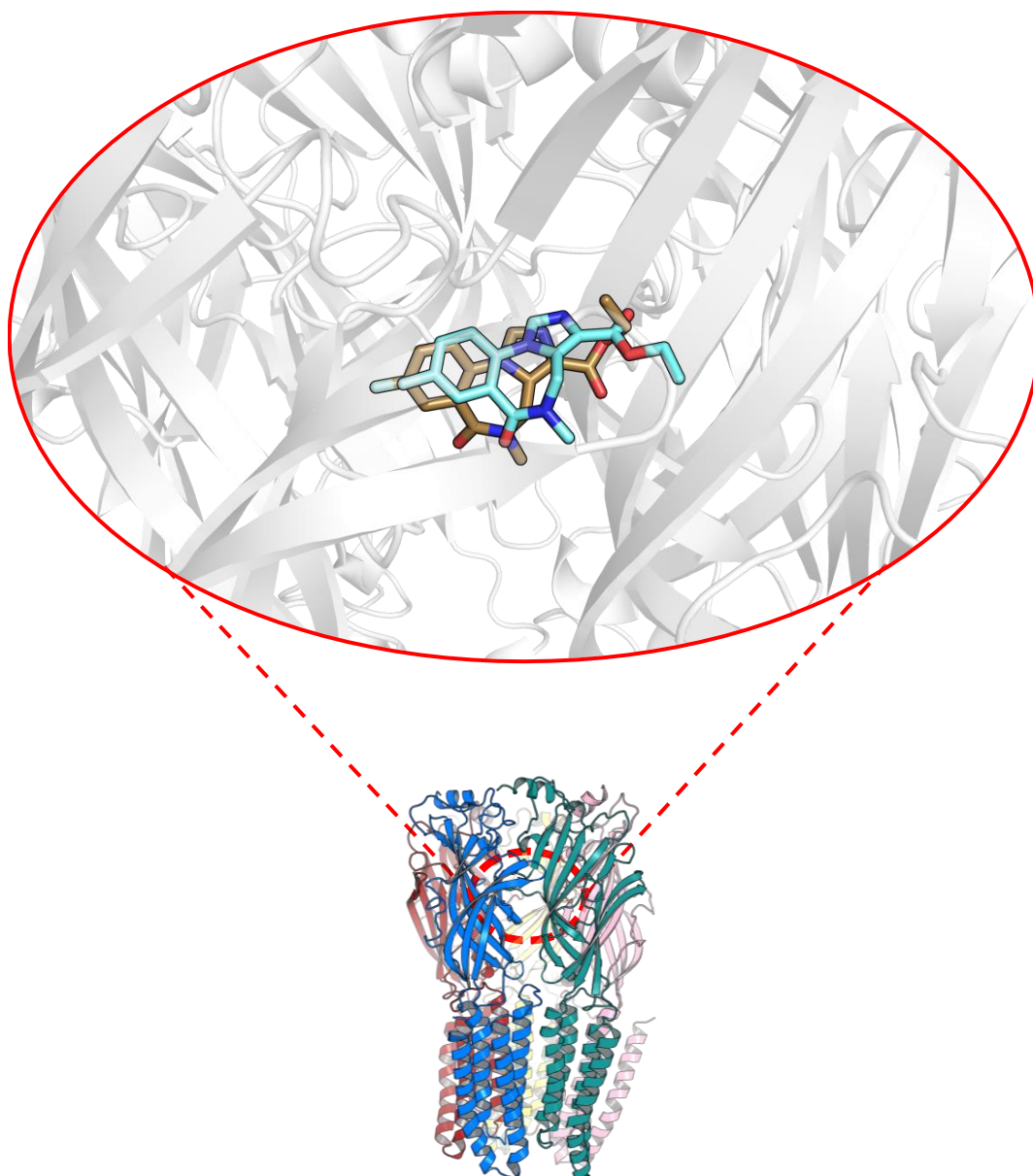


Figura 28: Pose do flumazenil complexado ao cristal heteropentamérico humano (PDB ID: 6D6U), em azul. E o seu *cross-docking* com o modelo heteropentamérico construído, em cobre.

4.5.2. Diazepam

Nas simulações de *docking* molecular com o diazepam, o *cluster* escolhido apresentou a menor energia de ligação média, com valor de $-6,9 \pm 0,3$ kcal/mol (Tabela 7).

Tabela 7: Estimativa de energia de ligação do diazepam.

Diazepam			
<i>Cluster</i>	n° de poses	Melhor (kcal/mol)	Média (kcal/mol)
1	3	-7,0	-6,9±0,3
2	5	-6,7	-6,5±0,3
3	31	-6,6	-6,1±0,2
4	3	-6,4	-6,2±0,1
5	28	-6,2	-5,7±0,3

Informações resumidas dos cinco melhores *clusters* dos ensaios com o diazepam. Melhor: energia de ligação da melhor pose do respectivo *cluster*; Média: média e desvio padrão da energia de ligação do *cluster* correspondente.

O servidor LigPlot+ reportou que o diazepam interagiu com os resíduos: His101(α_1), Ser158(α_1), Tyr159(α_1), Ser204(α_1), Tyr209(α_1), Val211(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2) e Thr142(γ_2) (Figura 29). O servidor PLIP, em conjunto com o programa PyMol, auxiliaram na representação da interação da pose escolhida do ligante com os resíduos (Figura 30).

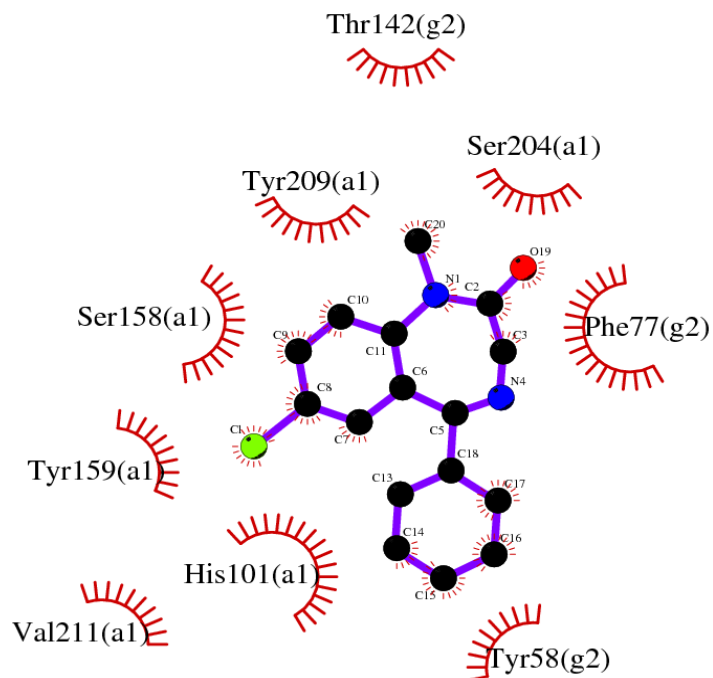


Figura 29: Mapa de interação do diazepam. Os resíduos marcados com 'a1' pertencem à subunidade α_1 e os resíduos marcados com 'g2' pertencem à subunidade γ_2 .

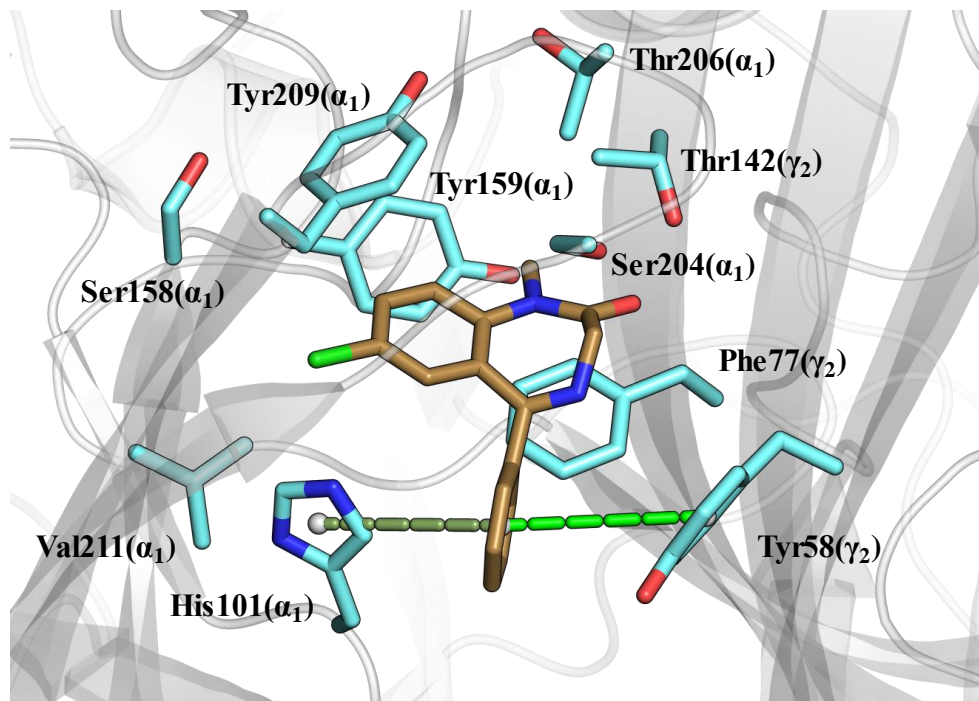


Figura 30: Análise das interações da pose escolhido do diazepam. Linhas tracejadas verdes representam interações π -stacking, prevista pelo servidor PLIP.

Comparando com os resultados observados por Richter e colaboradores¹⁴⁸, observamos a interação de sete resíduos em comum: His101(α_1), Ser204(α_1), Thr206(α_1), Tyr209(α_1), Val211(α_1), Phe77(γ_2) e Thr142(γ_2) (Figura 20). Vale ressaltar que nos dois perfis de interação, o átomo de cloro do ligante interagiu com a His101(α_1).

Já a comparação com o flumazenil complexado ao receptor GABA_A humano observamos sete resíduos em comum: His101(α_1), Tyr159(α_1), Ser204(α_1), Tyr209(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2) e Thr142(γ_2) (Figura 22).

Os resultados obtidos pelo servidor PLIP mostram que o diazepam formou interação π -stacking com os resíduos Tyr58(γ_2) e His101(α_1) (Tabela 8: Tabela 8) (Figura 30), sendo que estes dois resíduos interagiram com o flumazenil complexado, e apenas o His101(α_1) interagiu no complexo com o modelo dimérico. Esse resultado reforça a importância dos resíduos His101(α_1) na interação dos benzodiazepínicos clássicos com o seu sítio de ligação no receptor heteropentamérico GABA_A, como já descrito na literatura^{32,65}.

Tabela 8: Interações específicas do diazepam.

Interações	π -stacking	
	Resíduo	Distância (Å)
Diazepam®	Tyr58(γ_2)	4,8
	His101(α_1)	4,7

Interações detectadas pelo servidor PLIP do ensaio do diazepam com o modelo pentamérico GABA_A. Foi avaliada a pose mais bem ranqueada do cluster escolhido.

4.5.3. Compostos de coordenação com um átomo de paládio

Os *clusters* selecionados dos compostos de coordenação com um átomo de paládio [(DZP)PdOAcPPh₃] e [(DZP)PdClPPh₃] apresentaram energias de ligação média iguais (-8,3 kcal/mol para ambas) (Tabela 9). O *cluster* escolhido do composto de coordenação [(DZP)PdClPy] obteve uma energia de ligação média superior aos outros dois (-7,6 kcal/mol) (Tabela 9).

Tabela 9: Estimativa de energia de ligação dos compostos de coordenação com um átomo de paládio

[(DZP)PdOAcPPh3]				[(DZP)PdCIPPh3]		
<i>Cluster</i>	n° de poses	Melhor (kcal/mol)	Média (kcal/mol)	n° de poses	Melhor (kcal/mol)	Média (kcal/mol)
1	1	-8,3	-8,3±0,0	1	-8,3	-8,3±0,0
2	1	-7,7	-7,7±0,0	1	-8,2	-8,2±0,0
3	10	-7,6	-7,2±0,1	6	-8,0	-7,1±0,3
4	3	-7,6	-7,3±0,2	22	-7,9	-7,3±0,4
5	2	-7,3	-6,9±0,1	16	-7,5	-6,8±0,2

[(DZP)PdCIPy]			
<i>Cluster</i>	n° de poses	Melhor (kcal/mol)	Média (kcal/mol)
1	1	-7,6	-7,6±0,0
2	5	-7,4	-7,0±0,0
3	62	-7,3	-7,0±0,5
4	9	-7,2	-6,5±0,1
5	6	-7,1	-6,7±0,1

Informações resumidas dos cinco melhores *clusters* dos ensaios com compostos de coordenação com um átomo de paládio. Melhor: energia de ligação da melhor pose do respectivo *cluster*; Média: média e desvio padrão da energia de ligação do *cluster* correspondente.

O programa LigPlot+ apontou que o [(DZP)PdOAcPPh3] interagiu com os resíduos: Tyr159(α_1), Val202(α_1), Gln203(α_1), Ser204(α_1), Ser205(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2), Ala79(γ_2), Thr142(γ_2) e Asp192(γ_2) (Figura 31); o composto de coordenação [(DZP)PdCIPPh3] interagiu com os resíduos: Gln203(α_1), Ser204(α_1), Ser205(α_1), Asp56(γ_2), Met57(γ_2), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2), Ala79(γ_2), Thr142(γ_2), Gly191 e Asp192(γ_2) (Figura 32); e por fim, o [(DZP)PdCIPy] interagiu com: Phe99(α_1), Ser158(α_1), Tyr159(α_1), Ser204(α_1), Thr206(α_1), Tyr209(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2) e Thr142(γ_2) (Figura 33).

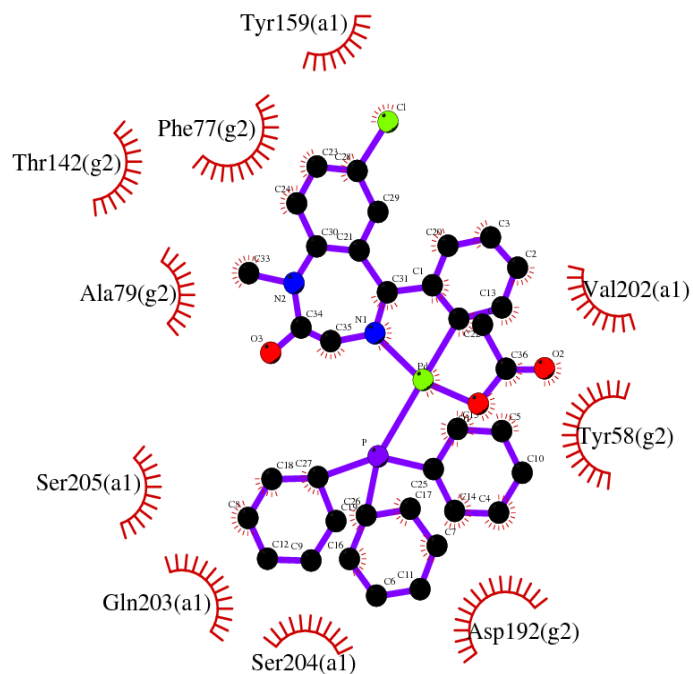


Figura 31: Mapa de interação do [(DZP)PdOAcPPh₃]. Os resíduos marcados com 'a1' pertencem à subunidade α₁ e os resíduos marcados com 'g2' pertencem à subunidade γ₂.

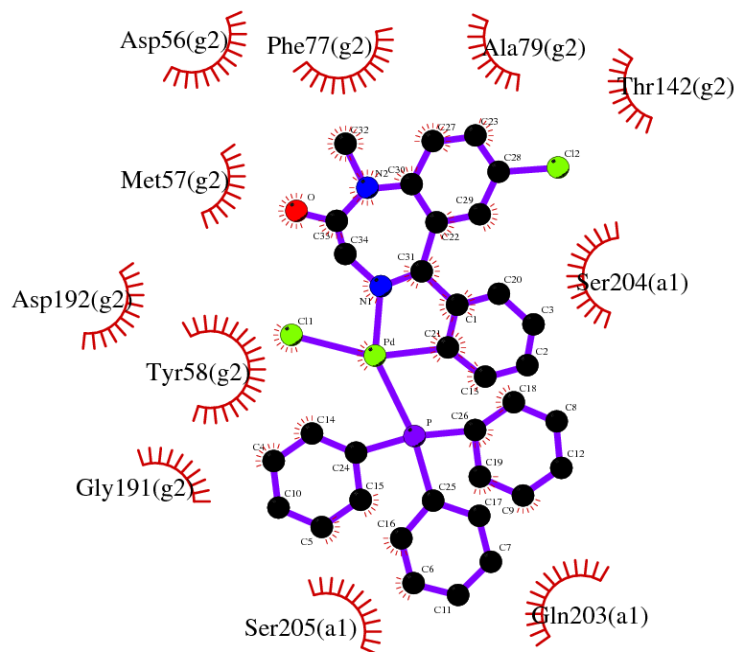


Figura 32: Mapa de interação do [(DZP)PdCIPPh₃]. Os resíduos marcados com 'a1' pertencem à subunidade α₁ e os resíduos marcados com 'g2' pertencem à subunidade γ₂.

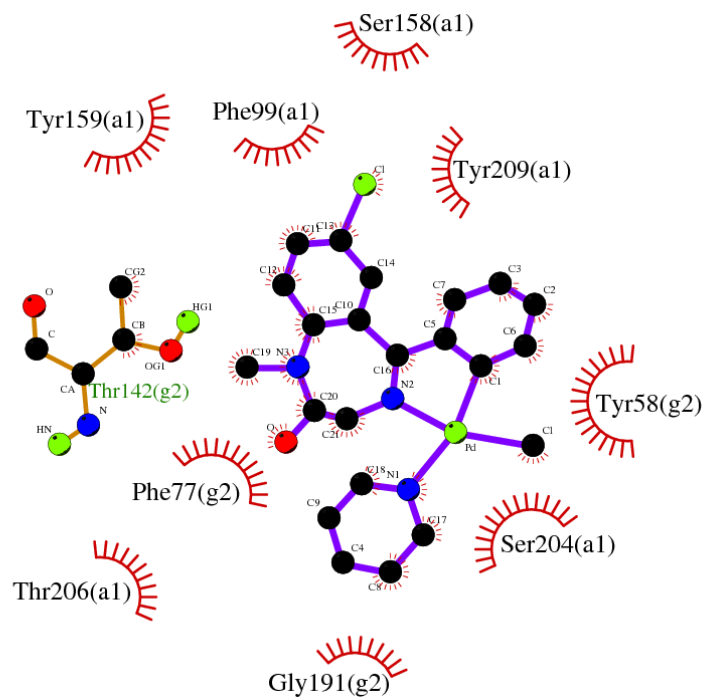


Figura 33: Mapa de interação do [(DZP)PdClPy]. Os resíduos marcados com 'a1' pertencem à subunidade α_1 e os resíduos marcados com 'g2' pertencem à subunidade γ_2 .

O servidor PLIP, em conjunto com o programa PyMol, auxiliou na representação da interação das poses escolhidas dos três ligantes com os resíduos (Figura 34, Figura 35 e Figura 36).

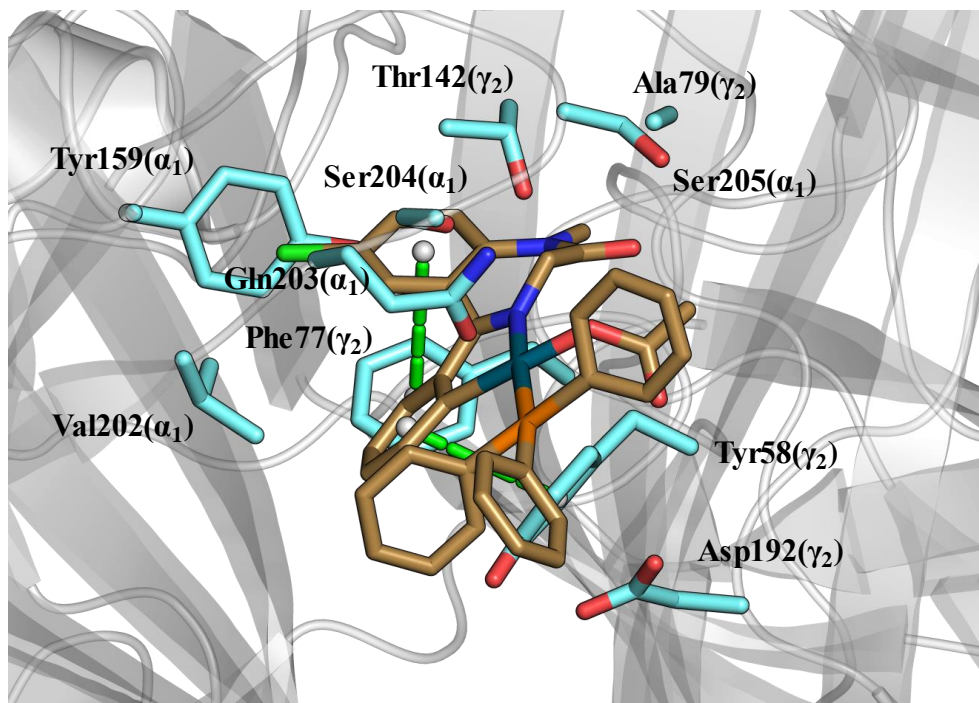


Figura 34: Análise das interações da pose escolhida do [(DZP)PdOAcPPh₃]. Linhas tracejadas verdes representam interações π -stacking, prevista pelo servidor PLIP.

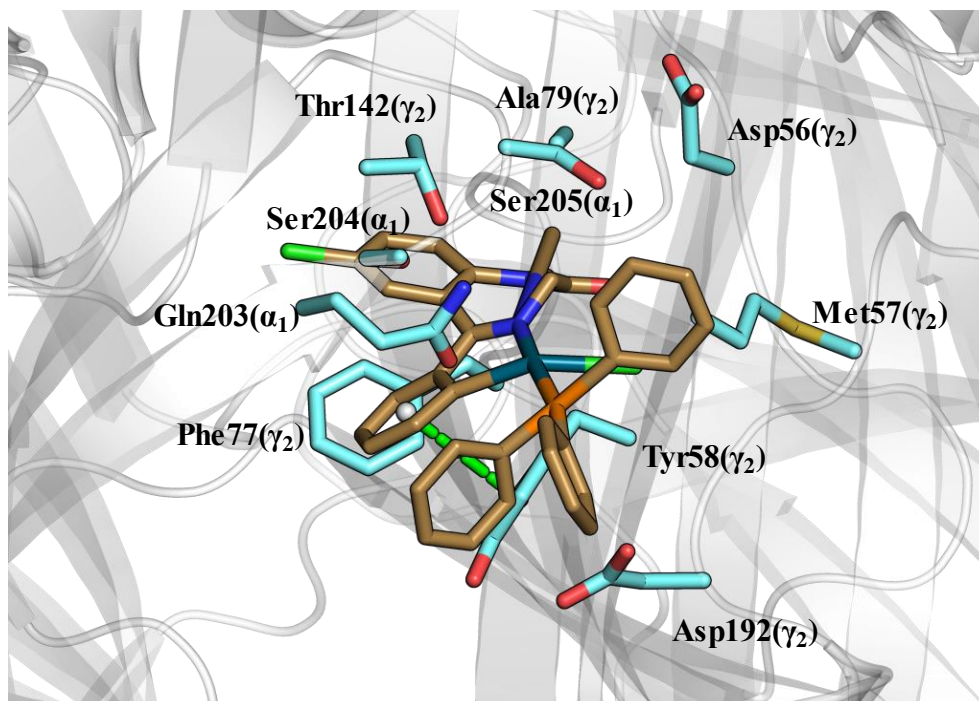


Figura 35: Análise das interações da pose escolhida do [(DZP)PdClPPh₃]. Linhas tracejadas verdes representam interações π -stacking, prevista pelo servidor PLIP.

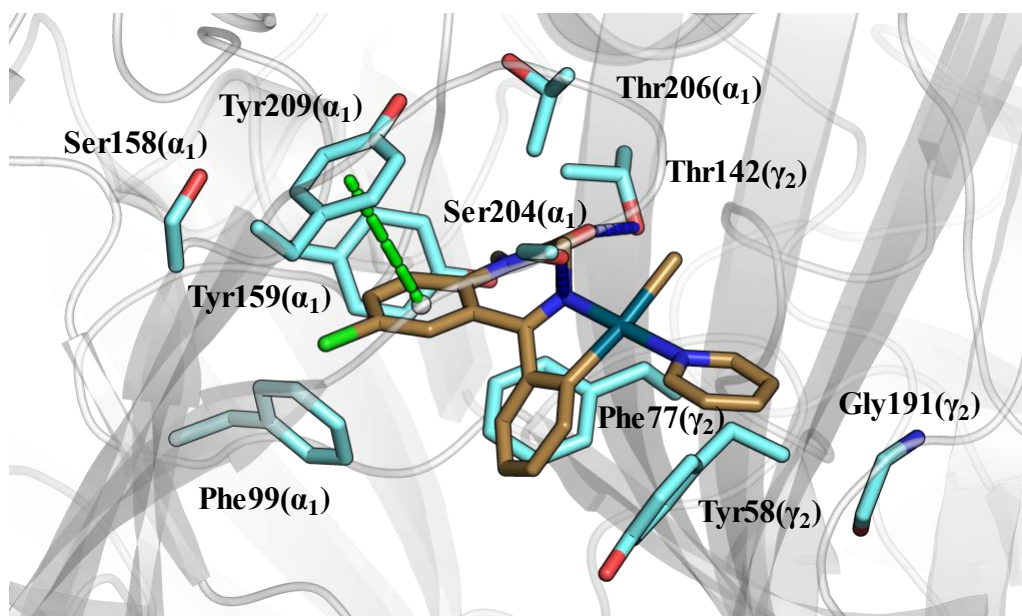


Figura 36: Análise das interações da pose escolhida do [(DZP)PdClPy]. Linhas tracejadas verdes representam interações π -stacking e linhas tracejadas azuis representam interações de ligações de hidrogênio, prevista pelo servidor PLIP.

Comparando as interações dos compostos de coordenação com as do flumazenil complexado com o receptor humano ⁸⁴ (Figura 22), observamos algumas semelhanças: [(DZP)PdOAcPPh₃] com os resíduos Tyr159(α_1), Ser204(α_1), Ser205(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2), Ala79(γ_2) e Thr142(γ_2); o [(DZP)PdClPPh₃] com os resíduos Ser204(α_1), Ser205(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2), Ala79(γ_2) e Thr142(γ_2); e o [(DZP)PdClPy] com Tyr159(α_1), Ser204(α_1), Tyr209(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2) e Thr142(γ_2). Podemos destacar que os resíduos Ser204(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2) e Thr142(γ_2) estão presentes em todas estas interações.

Diferente da pose do diazepam (Figura 29), todos os três ligantes com um átomo de paládio não apresentaram interação com a His101(α_1), porém o átomo de cloro estava voltado para a porção da subunidade α_1 (Figura 34, Figura 35 e Figura 36). Foi observado que por uma questão espacial, os grupamentos trifenilfosfinas presentes nos [(DZP)PdOAcPPh₃] e [(DZP)PdClPPh₃] estão localizados na porção externa do sítio, voltados para o solvente (Figura 34 e Figura 35). O grupamento trifenilfosfina do [(DZP)PdClPPh₃] fez interação com a Gly191(γ_2) (Figura 32), sendo um resíduo que não foi predito no sítio de ligação dos BZDs, corroborando a saída deste grupamento do sítio de ligação. O

[(DZP)PdCIPy] apresentou o grupamento piridina também voltado para a porção externa do sítio de ligação, também realizando interação com a Gly191(γ_2) (Figura 36).

Apesar do valor superior de energia de ligação média comparado aos outros compostos de coordenação com um átomo de paládio, o [(DZP)PdCIPy] apresentou o maior número de interações específicas: π -stacking com Tyr209(α_1) e ligação de hidrogênio com Ser204(α_1) e Tyr142(γ_2) (Tabela 10). O [(DZP)PdOAcPPh3] apresentou duas interações π -stacking com Tyr58(γ_2) e Phe77(γ_2) (Tabela 10). O [(DZP)PdCIPPh3] mostrou apenas uma interação específica π -stacking com o resíduo Tyr58(γ_2) (Tabela 10). Estes resultados sugerem um destaque para as interações específicas com os resíduos Tyr58(γ_2) e Phe77(γ_2).

Tabela 10: Interações específicas dos compostos de coordenação com um átomo de paládio

Interações	π -stacking		Ligações de Hidrogênio		
	Resíduo	Distância (Å)	Doador	Aceptor	Distância (Å)
[(DZP)PdOAcPPh3]	Tyr58(γ_2)	3,9		--	
	Phe77(γ_2)	4,1		--	
[(DZP)PdCIPPh3]	Tyr58(γ_2)	4,0		--	
[(DZP)PdCIPy]	Tyr209(α_1)	4,6	Thr142(γ_2):O3	O2:lig	2,4
			Ser204(α_1):O3	N3:lig	2,3

Interações detectadas pelo servidor PLIP do ensaio dos compostos de coordenação com um átomo de paládio com o modelo pentamérico GABA_A. Foi avaliada a pose mais bem ranqueada do cluster escolhido. Lig se refere ao ligante em questão.

O maior número de interações específicas das poses selecionadas dos compostos de coordenação com um átomo de paládio comparados às simulações com diazepam indicam que essas características podem estar influenciando diretamente na menor energia de afinidade destes ligantes.

Em ambas análises de interações específicas, LigPlot+ e PLIP, foi observada a presença dos resíduos Tyr58(γ_2) e Phe77(γ_2) nos ensaios com compostos de coordenação com um átomo de paládio e com o diazepam. Estes

resultados reforçam a importância destes resíduos nas interações com os benzodiazepínicos.

4.5.4. Compostos de coordenação com dois átomos de paládio

Nos ensaios de *docking* molecular foi observado que o *cluster* selecionado do [(DZP)PdOAc]₂ apresentou a menor energia de ligação média (-8,40 kcal/mol) entre todos os ligantes estudados; vale ressaltar que o *cluster* selecionado é o quinto *cluster* com a menor energia de ligação média (Tabela 11).

Tabela 11: Estimativa de energia de ligação dos compostos de coordenação com dois átomos de paládio

[(DZP)PdCl] ₂			
<i>Cluster</i>	n° de poses	Melhor (kcal/mol)	Média (kcal/mol)
1	34	-8,4	-8,0±0,2
2	5	-8,3	-8,0±0,2
3	137	-8,2	-7,9±0,4
4	14	-8,0	-7,7±0,1
5	6	-7,7	-7,5±0,1
[(DZP)PdOAc] ₂			
<i>Cluster</i>	n° de poses	Melhor (kcal/mol)	Média (kcal/mol)
1	121	-9,3	-9,0±0,3
2	10	-9,1	-8,7±0,1
3	3	-8,8	-8,6±0,1
4	14	-8,6	-8,4±0,3
5	47	-8,6	-8,4±0,4

Informações resumidas dos cinco melhores *clusters* dos ensaios com compostos de coordenação com dois átomos de paládio. Melhor: energia de ligação da melhor pose do respectivo *cluster*; Média: média e desvio padrão da energia de ligação do *cluster* correspondente.

O destaque do quinto *cluster* dos ensaios de [(DZP)PdOAc]₂ pode estar relacionado com o fato deste ligante ser capaz de realizar duas interações específicas: *π-stacking* com o resíduo Phe77(γ₂) e ligação de hidrogênio com Ser204(α₁) (Tabela 12). Além disso, um efeito adicional que pode estar envolvido com a ligação dos compostos de coordenação é a restrição conformacional da rotação do anel fenólico pelo complexo de paládio, possivelmente favorecendo a interação entre o ligante e o receptor.

O *cluster* selecionado do [(DZP)PdCl]₂ apresentou uma energia de ligação média superior ao outro ligante com dois átomos de paládio (-8,0±0,2 kcal/mol) (Tabela 11). Apesar da média de energia superior, este composto de coordenação apresentou duas interações específicas: *π-stacking* com o resíduo Tyr209(α₁) e ligação de hidrogênio com Ser204(α₁) (Tabela 12).

Tabela 12: Interações específicas dos compostos de coordenação com dois átomos de paládio

Interações	<i>π-stacking</i>		Ligações de Hidrogênio		
	Resíduo	Distância (Å)	Doador	Aceptor	Distância (Å)
[(DZP)PdCl] ₂	Tyr209(α ₁)	4,8	Ser204(α ₁):O3	N3:lig	2,2
[(DZP)PdOAc] ₂	Phe77(γ ₂)	4,0	Ser204(α ₁):O3	N3:lig	2,4

Interações detectadas pelo servidor PLIP para [(DZP)PdCl]₂ e [(DZP)PdOAc]₂ com o modelo pentamérico GABA_A. A pose mais bem ranqueada do *cluster* escolhido foi avaliada para cada ligante. Lig se refere ao ligante em questão.

O mapa de interação do [(DZP)PdCl]₂ indica interação com: Phe99(α₁), His101(α₁), Ser158(α₁), Tyr159(α₁), Ser204(α₁), Ser205(α₁), Thr206(α₁), Asp56(γ₂), Tyr58(γ₂), Phe77(γ₂), Thr142(γ₂), Arg185(γ₂), Val188(γ₂), Glu189(γ₂), Val190(γ₂), Gly191(γ₂) e Asp192(γ₂) (Figura 37).

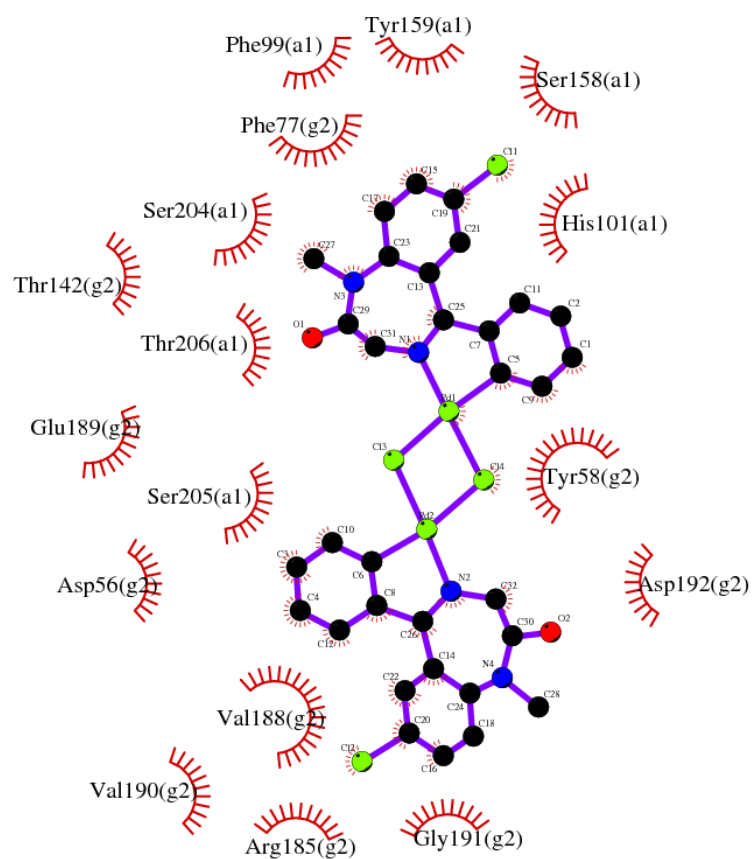


Figura 37: Mapa de interação do $[(DZP)PdCl]_2$. Os resíduos marcados com 'a1' pertencem à subunidade α_1 e os resíduos marcados com 'g2' pertencem à subunidade γ_2 .

Segundo o LigPlot+, o composto de coordenação $[(DZP)PdOAc]_2$ interagiu com os resíduos: Phe99(α_1), His101(α_1), Ser158(α_1), Tyr159(α_1), Gln203(α_1), Ser204(α_1), Ser205(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2) e Thr142(γ_2) (Figura 38).

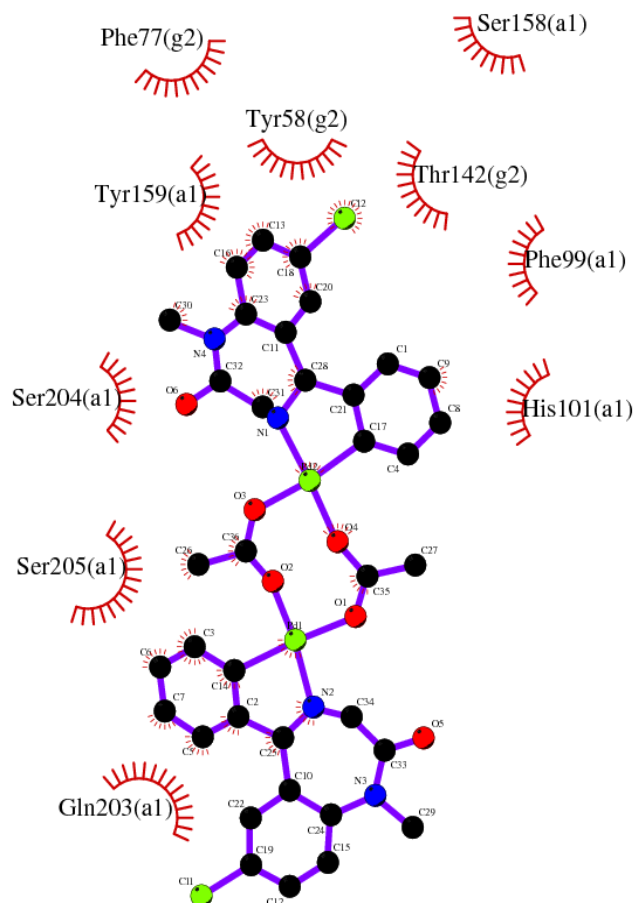


Figura 38: Mapa de interação do [(DZP)PdOAc]₂. Os resíduos marcados com 'a1' pertencem à subunidade α₁ e os resíduos marcados com 'g2' pertencem à subunidade γ₂.

Comparando o perfil de interação do [(DZP)PdCl]₂ (Figura 37) com os achados de Richter e colaboradores¹⁴⁸ (Figura 20), observamos a interação com cinco resíduos em comum: His101(α₁), Ser204(α₁), Thr206(α₁), Phe77(γ₂) e Thr142(γ₂). Enquanto comparando com o [(DZP)PdOAc]₂ (Figura 38) foram detectados quatro resíduos em comum: His101(α₁), Ser204(α₁), Phe77(γ₂) e Thr142(γ₂). Vale ressaltar que nos dois perfis de interação, o átomo de cloro do ligante interagiu com a His101(α₁) (Figura 37 e Figura 38).

Algumas semelhanças são observadas comparando os dois compostos de coordenação com dois átomos de paládio com a interação do flumazenil complexado com o receptor humano (Figura 22)⁸⁴: His101(α₁), Tyr159(α₁), Ser204(α₁), Ser205(α₁), Tyr58(γ₂), Phe77(γ₂) e Thr142(γ₂) (Figura 37 e Figura 38).

Comparando as interações do [(DZP)PdOAc]₂ (Figura 38) com as do diazepam (Figura 29), podemos observar um modo de interação similar,

apresentando sete resíduos em comum: His101(α_1), Ser158(α_1), Tyr159(α_1), Ser204(α_1), Tyr58(γ_2), Phe77(γ_2) e Thr142(γ_2).

O servidor PLIP, auxiliado pelo programa PyMol, disponibilizou representações da interação das poses escolhidas dos dois compostos de coordenação com os resíduos do sítio de ligação dos BZDs (Figura 39 e Figura 40).

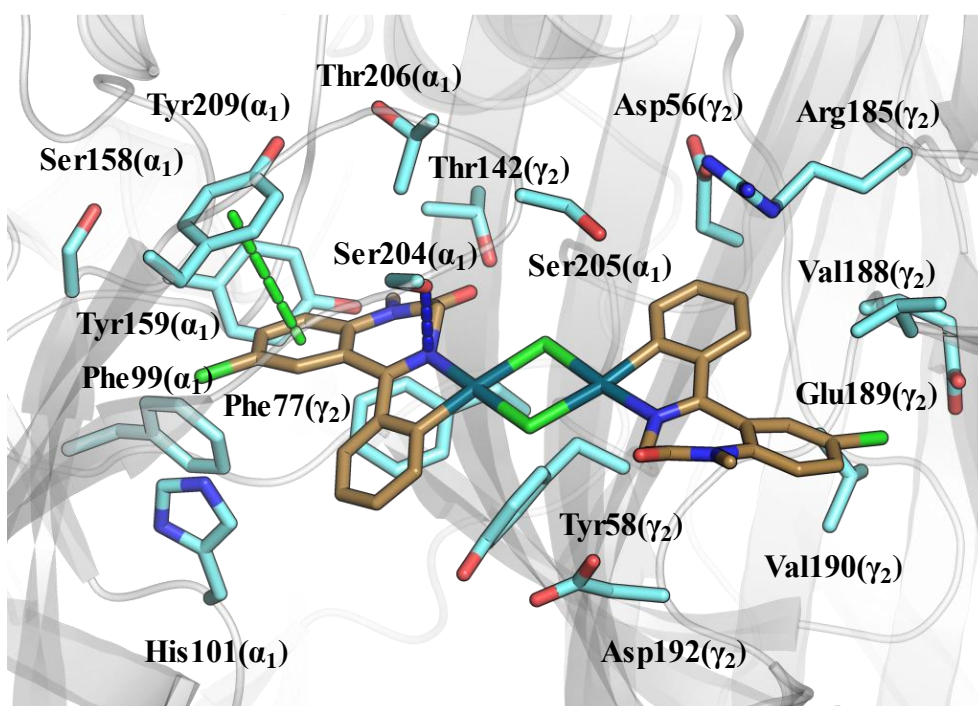


Figura 39: Análise das interações da pose escolhido do $[(DZP)PdCl_2]$. Linhas tracejadas verdes representam interações π -stacking e linhas tracejadas azuis representam interações de ligações de hidrogênio, prevista pelo servidor PLIP.

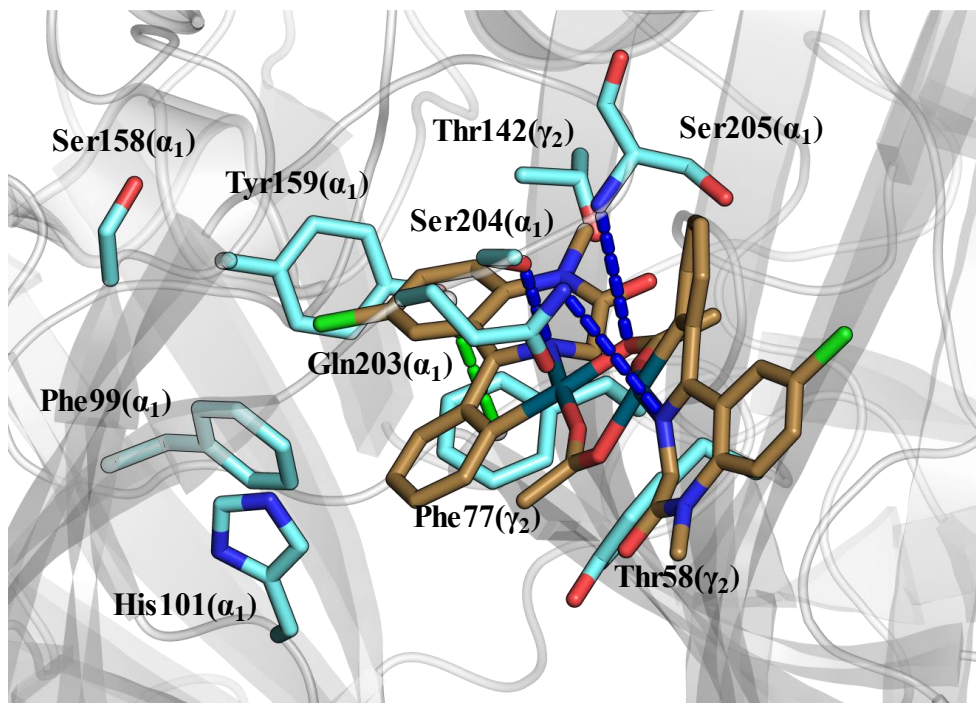


Figura 40: Análise das interações da pose escolhido do $[(DZP)PdOAc]_2$. Linhas tracejadas verdes representam interações π -stacking e linhas tracejadas azuis representam interações de ligações de hidrogênio, prevista pelo servidor PLIP.

A pose escolhida do $[(DZP)PdCl]_2$ mostrou um perfil divergente comparada às poses selecionadas dos outros compostos de coordenação estudados, apresentando quatro resíduos exclusivos: Arg185(γ_2), Val188(γ_2), Glu189(γ_2) e Val190(γ_2) (Figura 39) sugerindo que os compostos de coordenação derivados do diazepam com paládio podem interagir em outras porções do sítio dos benzodiazepínicos. A representação da pose do $[(DZP)PdOAc]_2$ com o sítio de ligação dos BZDs (Figura 40) mostra que uma porção do segundo diazepam se encontra na porção externa do sítio de ligação, não apresentando interação com nenhum resíduo (Figura 38).

5. Conclusões

O modelo gerado do receptor GABA_A com a combinação mais comum, utilizando sequências de camundongos, apresentou uma qualidade superior às estruturas depositadas na literatura, como o dímero proposto por Richter e colaboradores¹⁴⁸ e o cristal heteropentâmero humano (PDB ID:6D6U)⁸⁴, segundo análises do ERRAT e Ramachandran.

Nossos resultados de *docking* molecular indicam que os compostos de coordenação sintetizados por Barros e colaboradores (2016)¹²⁹ possuem afinidade semelhante pelo sítio de ligação dos BZDs, e até maior do que o diazepam. Além disso, foram identificados quatro resíduos que contribuem para a interação proteína-ligante, observados nas melhores poses, e corroboraram dados da literatura: His101(α_1), Ser204(α_1), Tyr58(γ_2) e Phe77(γ_2).

Com base nas características estruturais dos ligantes nas simulações de *docking*, o átomo de paládio apresentou uma função de estabilidade estrutural sobre esses compostos de coordenação, servindo com uma 'ponte' entre dois compostos de diazepam ou o diazepam com outra estrutura química; conseqüentemente, o número de átomos quando comparado com o próprio diazepam é maior, levando a um aumento no número de interações com o receptor no sítio de benzodiazepínicos.

Em suma, os compostos de coordenação derivados da associação do diazepam com átomo de paládio apresentaram afinidade pelo sítio de ligação dos BZDs, corroborando os resultados descritos e sugestões propostas por Barros e colaboradores¹²⁹.

6. Perspectivas

Diante dos resultados apresentados algumas perspectivas foram formuladas e algumas perguntas levantadas. Uma das propostas seria a aplicação deste método de *docking* molecular, utilizando o diazepam e os compostos de coordenação em outras combinações prevalentes do receptor GABA_A. Uma vertente desta proposta é realizar a técnica de *docking* nos sítios clássico dos BZDs e em outros sítios de ligação detectados por programas de predição de sítios.

Uma das maiores limitações do projeto foi a falta de informações físico-químicas do átomo de paládio, incluindo parâmetros para o campo de força deste átomo, impossibilitando realizar outras técnicas computacionais importantes, como dinâmica molecular. Caso haja a disponibilidade destas informações no futuro, uma das propostas é realizar simulações de dinâmica molecular.

Outra perspectiva seria a utilização de outros átomos de metal de transição, com o mesmo número de coordenação do paládio e que apresentem informações físico-químicas que possibilitem seu uso em outras técnicas computacionais, aumentando o espectro de observações e análises do comportamento destes ligantes.

7. Referências bibliográficas

1. Porto, L. A., Siqueira, J. de S., Seixas, L. N., Almeida, J. R. G. da S. & Quintans-Júnior, L. J. O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas: uma breve revisão. *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.* **13**, 169–175 (2008).
2. Moshé, S., Perucca, E., Ryvlin, P. & Tomson, T. Epilepsy: New advances. *Lancet* **385**, 884–898 (2015).
3. Quintas, R. *et al.* Psychosocial difficulties in people with epilepsy: A systematic review of literature from 2005 until 2010. *Epilepsy Behav.* **25**, 60–67 (2012).
4. da Costa, J., Vignes, M., Guilhermo, C. & Vellut, J. Bases Celulares da Epilepsia. *J. da liga Bras. Epilepsia* **5**, 9 (1992).
5. Adams, R. D., Victor, M., Ropper, A. H. & Daroff, R. B. Principles of neurology. (1997).
6. Engel J., P. T. A. eds. *A comprehensive textbook.* **3**, (Lippincott Williams & Wilkins, 2008).
7. Avanzini Giuliano & Franceschetti Silvana. Cellular biology of epileptogenesis Excitable properties of the neuronal membrane. *LANCET Neurol.* **2**, 33–42 (2003).
8. James McNamara. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* **399**, A15 (1999).
9. Löscher, W. & Schmidt, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res.* **50**, 3–16 (2002).
10. Oliveira, F. A. *et al.* Anticonvulsant properties of N-salicyloyltryptamine in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **68**, 199–202 (2001).
11. Treiman DM, . GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* **42**, 8–12 (2001).
12. Horton, R. W., Prestwich, S. A. & Meldrum, B. S. γ -Aminobutyric Acid and

- Benzodiazepine Binding Sites in Audiogenic Seizure-Susceptible Mice. *J. Neurochem.* **39**, 864–870 (1982).
13. McDonald, J. W. *et al.* Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* **29**, 529–541 (1991).
 14. Johnson, E. W. *et al.* 'Central' and 'peripheral' benzodiazepine receptors: Opposite changes in human epileptogenic tissue. *Neurology* **42**, 811–811 (2012).
 15. Olsen, R. W. *et al.* GABA/benzodiazepine receptors in human focal epilepsy. *Neurotransmitters in Epilepsy* **8**, 383–391 (2013).
 16. DURING, D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* **341**, 1607–1610 (2003).
 17. Schafer, D. F. & Jones, E. A. Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. *Lancet (London, England)* **1**, 18–20 (1982).
 18. Nutt, D. J. & Malizia, A. L. New insights into the role of the GABA A -- benzodiazepine receptor in psychiatric disorder New insights into the role of the GABA A ^ benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br. J. Psychiatry* **179**, 390–396 (2012).
 19. Nemeroff, C. B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol. Bull.* **37**, 133–46 (2003).
 20. Lydiard, R. B. The role of GABA in anxiety disorders. *J. Clin. Psychiatry* **64**, 21–27 (2003).
 21. Nutt, D. *et al.* Side effects of treatment. *Eur. J. Cancer* **38**, S130–S136 (2003).
 22. Lynagh, T. & Pless, S. A. Principles of agonist recognition in Cys-loop receptors. *Front. Physiol.* **5 APR**, 1–12 (2014).
 23. Bazemore, A. W., Elliott, K. A. C. & Florey, E. Isolation of Factor I. *J. Neurochem.* **1**, 334–339 (1957).

24. Their, I. & Motor, R. BLOCKING COMPOUNDS ACID AND OTHER IN CRUSTACEA IN RELATIVE MOTOR INTRODUCTION IN THE TWO PRECEDING PAPERS it was reported that gamma-aminobutyric acid (GABA) was the most active of ten blocking substances extracted from the nervous systems of lobsters a. *Methods* (1963).
25. Witt, A., Kubista, E. & Ambros, P. F. Short Communication. *J. Pathol.* **159**, 17–20 (2001).
26. Curtis, D. R., Hösl, L., Johnston, G. A. R. & Johnston, I. H. The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Exp. Brain Res.* **5**, 235–258 (1968).
27. Bhia, L. I. & Hole, W. of *Neuropharmacology*,. 259–277 (1973).
28. Rabow, L. E., Russek, S. J. & Farb, D. H. From ion currents to genomic analysis: Recent advances in GABAA receptor research. *Synapse* **21**, 189–274 (1995).
29. Jin, H. *et al.* Demonstration of functional coupling between -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4293–4298 (2003).
30. Cherubini, E. & Conti, F. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* **24**, 155–162 (2001).
31. Deken, S. L., Wang, D. & Quick, M. W. Plasma membrane GABA transporters reside on distinct vesicles and undergo rapid regulated recycling. *J. Neurosci.* **23**, 1563–8 (2003).
32. Nutt, D. GABAA receptors: Subtypes, regional distribution, and function. *J. Clin. Sleep Med.* **2**, S7–S11 (2006).
33. Smith, G. B. The GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 260–261 (2005).
34. Manville, R. W., Papanikolaou, M. & Abbott, G. W. Direct neurotransmitter activation of voltage-gated potassium channels. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
35. Sieghart, W. Structure and Pharmacology of GABA Receptor Subtypes.

- Pharmacol. Rev.* **47**, 182–224 (1995).
36. Kerr, D. I. B. & Ong, J. GABAB receptors. *Pharmacol. Ther.* **67**, 187–246 (1995).
 37. Fritschy, J.-M. E/I balance and GABAA receptor plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **1**, 5 (2008).
 38. Bowery NG, Hudson AL & Price GW. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* **20**, 365–83 (1987).
 39. Sieghart, W. *et al.* Structure and subunit composition of GABA-A receptor. *Neurochem. Int.* **34**, 379–385 (1999).
 40. Olsen, R. W., Chang, C. S. S., Li, G., Hanchar, H. J. & Wallner, M. Fishing for allosteric sites on GABAA receptors. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1675–1684 (2004).
 41. Korpi, E. R. & Sinkkonen, S. T. GABAA receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. *Pharmacol. Ther.* **109**, 12–32 (2006).
 42. Wellen, D. *et al.* Utility of the Leyton Obsessional Inventory. *Depress. Anxiety* **6**, 1–6 (2006).
 43. Brohan, J. & Goudra, B. G. The Role of GABA Receptor Agonists in Anesthesia and Sedation. *CNS Drugs* **31**, 845–856 (2017).
 44. Whiting, P. J. GABA-A receptor subtypes in the brain: A paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov. Today* **8**, 445–450 (2003).
 45. Löw, K. *et al.* Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science (80-.)*. **290**, 131–134 (2000).
 46. Mckernan, R. M. *et al.* Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA. *America (NY)*. **3**, 587–592 (2000).
 47. Miller, P. S. & Aricescu, A. R. Crystal structure of a human GABA A receptor. *Nature* **512**, 270 (2014).

48. Chebib, M. & Johnston, G. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin. Exp. ...* 937–940 (1999).
49. Macdonald, R. L. & Olsen, R. W. GABA_A receptor channels 3. *Annu.Rev.Neurosci.* **17**, 569–602 (1994).
50. Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. & Hayasaki, H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. in *International Review of Cytology* **213**, 1–47 (2002).
51. Simon, J., Wakimoto, H., Fujita, N., Lalande, M. & Barnard, E. A. Analysis of the set of GABA_A receptor genes in the human genome. *J. Biol. Chem.* **279**, 41422–41435 (2004).
52. Cossart, R., Bernard, C. & Ben-Ari, Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: Multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci.* **28**, 108–115 (2005).
53. Londono, D., Kuhs, W. F. & Finney, J. L. Enclathration of helium in ice II: The first helium hydrate. *Nature* **332**, 141–142 (1988).
54. Olsen, R. W. & Sieghart, W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid_A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacol. Rev.* **60**, 243–260 (2008).
55. Pirker, S. Neuroscience 2000 Pirker. **101**, 1–36 (2000).
56. Reid, C. A., Berkovic, S. F. & Petrou, S. Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog. Neurobiol.* **87**, 41–57 (2009).
57. Hedblom, E. & Kirkness, E. F. A novel class of GABA(A) receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J. Biol. Chem.* **272**, 15346–15350 (1997).
58. Yip, G. M. S. *et al.* A propofol binding site on mammalian GABA_A receptors identified by photolabeling. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 715–720 (2013).
59. Mckernan, R. M. & Whiting Gaba, P. J. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? receptors a heterogeneous family ligand-gated

- ion responsible for mediating inhibitory. *Trends Neurosci* **19**, 139–143 (1996).
60. Nayeem, N., Green, T. P., Martin, I. L. & Barnard, E. A. Quaternary Structure of the Native GABAA Receptor Determined by Electron Microscopic Image Analysis. *J. Neurochem.* **62**, 815–818 (2010).
 61. Van Ness, P. C., Watkins, A. E., Bergman, M. O., Tourtellotte, W. W. & Olsen, R. W. γ -Aminobutyric acid receptors in normal human brain and Huntington disease. *Neurology* **32**, 63–63 (2012).
 62. Sieghart, W. Pharmacology of benzodiazepine receptors: An update. *J. Psychiatry Neurosci.* **19**, 24–29 (1994).
 63. Whiting, P. J. *et al.* Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **868**, 645–653 (1999).
 64. Wisden, W. & Stephens, D. N. Pharmacology: Towards better benzodiazepines. *Nature* **401**, 751 (1999).
 65. Sigel, E. Mapping of the Benzodiazepine Recognition Site on GABA-A Receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 833–839 (2005).
 66. Wieland, Heike A., Lueddens, Harmut, Seeburg, P. H. Receptors Is Essential for. *J. Biol. Chem.* **267**, 1426–1429 (1992).
 67. Rudolph U *et al.* Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Nature* **401**, 796–800 (1999).
 68. Kelly, M. D. *et al.* Role of the histidine residue at position 105 in the human $\alpha 5$ containing GABA A receptor on the affinity and efficacy of benzodiazepine site ligands . *Br. J. Pharmacol.* **135**, 248–256 (2006).
 69. Clayton, T. *et al.* An Updated Unified Pharmacophore Model of the Benzodiazepine Binding Site on γ -Aminobutyric Acida Receptors: Correlation with Comparative Models. *Curr. Med. Chem.* **14**, 2755–2775 (2007).
 70. Mokrab, Y. *et al.* Exploring ligand recognition and ion flow in comparative

- models of the human GABA type A receptor. *J. Mol. Graph. Model.* **26**, 760–774 (2007).
71. Berezhnoy, D., Gibbs, T. T. & Farb, D. H. Docking of 1,4-Benzodiazepines in the $\alpha 1/\alpha 2$ GABAA Receptor Modulator Site. *Mol. Pharmacol.* **76**, 440–450 (2009).
 72. Sancar, F., Ericksen, S. S., Kucken, A. M., Teissere, J. A. & Czajkowski, C. Structural Determinants for High-Affinity Zolpidem Binding to GABA-A receptors. *Mol. Pharmacol.* **71**, 38–46 (2006).
 73. Suqin, C., Tianrui, R. & Zhiguo, S. Investigating the putative binding-mode of GABA and diazepam within GABAA receptor using molecular modeling. *Protein J.* **27**, 71–78 (2008).
 74. van Dijk, W. J. *et al.* Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269–276 (2001).
 75. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. & Unwin, N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949–955 (2003).
 76. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **346**, 967–989 (2005).
 77. Hilf, R. J. C. & Dutzler, R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **452**, 375–379 (2008).
 78. Bocquet, N. *et al.* X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* **457**, 111–114 (2009).
 79. Hibbs, R. E. & Gouaux, E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* **474**, 54–60 (2011).
 80. Nury, H. *et al.* X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **469**, 428–431 (2011).
 81. Wang, S. *et al.* Possible binding sites and interactions of propanidid and AZD3043 within the γ -aminobutyric acid type A receptor (GABA A R). *J.*

- Biomol. Struct. Dyn.* **36**, 3926–3937 (2018).
82. Delano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*. Schrodinger (2002).
 83. Sigel, E. The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 425–429 (2002).
 84. Zhu, S. *et al.* Structure of a human synaptic GABA A receptor. *Nature* **559**, 67–88 (2018).
 85. Masiulis, S. *et al.* GABA A receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature* **565**, 454–459 (2019).
 86. Laverty, D. *et al.* Cryo-EM structure of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ GABAA receptor in a lipid bilayer. *Nature* **565**, 516 (2019).
 87. Liu, S. *et al.* Cryo-EM structure of the human $\alpha 5\beta 3$ GABA A receptor. *Cell Res.* **28**, 958 (2018).
 88. Swastik, P. *et al.* Cryo-EM structure of the benzodiazepine- sensitive $\alpha 1\beta 1\gamma 2\delta$ tri-heteromeric GABAA receptor in complex with GABA. *Elife* **1**, 1–21 (2018).
 89. Ayd Jr., F. J. Social issues: Misuse and abuse. *Psychosomatics* **21**, 21–25 (2016).
 90. Lader, M. Benzodiazepines-the opium of the masses? in *Neuroscience* **3**, 159–165 (Elsevier, 1978).
 91. Olfson, M., King, M. & Schoenbaum, M. Benzodiazepine use in the United States. *JAMA Psychiatry* **72**, 136–142 (2015).
 92. Sheikman, M. B. Use of Benzodiazepines in Treatment of Anxiety in the Elderly. *South. Med. J.* **84**, 37 (2011).
 93. Csizmadia, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. in *Proceedings of ECSOC-3, The Third International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, September 1a30* 1775 (2019).

94. Haefely, W. E. Pharmacology of the benzodiazepine receptor. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.* **238**, 294–301 (1989).
95. Depondt, C. Review article The potential of pharmacogenetics in the treatment of epilepsy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **10**, 1–9 (2006).
96. Griffin, C. E., Kaye, A. M., Bueno, F. R. & Kaye, A. D. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J.* **13**, 214–23 (2013).
97. Schachter, S. Review of the mechanisms of action of antiepileptic drugs. *CNS Drugs* **4**, 469–477 (1995).
98. Kaufmann, W. A., Humpel, C., Alheid, G. F. & Marksteiner, J. Compartmentation of alpha 1 and alpha 2 GABA(A) receptor subunits within rat extended amygdala: implications for benzodiazepine action. *Brain Res.* **964**, 91–9 (2003).
99. Moehler, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* **62**, 42–53 (2012).
100. Griffin, C. E., Kaye, A. M., Bueno, F. R. & Kaye, A. D. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J.* **13**, 214–23 (2013).
101. Greenblatt, D. J., Divoll, M., Abernethy, D. R., Ochs, H. R. & Shader, R. I. K ~. **252**, 233–252 (1983).
102. Chouinard, G. Issues in the clinical use of benzodiazepines: Potency, withdrawal, and rebound. *J. Clin. Psychiatry* **65**, 7–12 (2004).
103. Fox, C. *et al.* Clinical aspects of pain medicine and interventional pain management: a comprehensive review. *Paducah, KY ASIP Publ. Antianxiety agents* 543–552 (2011).
104. Revuz, J. & Hornac, P. Side effects of treatment with sulfones. *LARC Med.* **1**, 68–70 (1981).
105. Frank J. Faracha, *, L. D. P. *et al.* Pharmacological and Brain Stimulation Treatment of Anxiety Disorders: Current Treatments and Future

- Directions. *J. Anxiety Disord.* **26**, 57 (2012).
106. Beers, M. H. Explicit Criteria for Determining Potentially Inappropriate Medication Use by the Elderly. *Arch. Intern. Med.* **157**, 1531 (2011).
 107. Fick, D. M. *et al.* Updating the Beers Criteria for Potentially Inappropriate Medication Use in Older Adults. *Arch. Intern. Med.* **163**, 2716 (2003).
 108. Couto, A. T. R., Silva, D. T., Silvestre, C. C., Lyra, D. P. & Quintans, L. J. Quality analysis of research on the use of benzodiazepines by elderly patients in the emergency room: a systematic review. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **69**, 1343–1350 (2013).
 109. Hartinger, C. G. & Dyson, P. J. Bioorganometallic chemistry - From teaching paradigms to medicinal applications. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 391–401 (2009).
 110. Wang, D. & Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 307–320 (2005).
 111. ROSENBERG, B., VAN CAMP, L. & KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli By Electrolysis Products From a Platinum Electrode. *Nature* **205**, 698–699 (1965).
 112. Barros, W. B. Z. G. *et al.* Palladium-benzodiazepine derivatives as promising metallodrugs for the development of antiepileptic therapies. *J. Inorg. Biochem.* **155**, 129–135 (2016).
 113. Bradford, S. S. & Cowan, J. A. From Traditional Drug Design to Catalytic Metallodrugs: A Brief History of the Use of Metals in Medicine. *Metallodrugs* **1**, 10–23 (2015).
 114. Braunschweig, H., Kollann, C. & Müller, M. Synthesis and Structure of the First η^1 -Borazine Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 291–293 (2002).
 115. Spencer, J., Rathnam, R. P. & Chowdhry, B. Z. 1,4-Benzodiazepin-2-Ones in Medicinal Chemistry. *Future Med. Chem.* **2**, 1441–1449 (2010).
 116. Bradford, S. S. & Cowan, J. A. From Traditional Drug Design to Catalytic

Metallo drugs: A Brief History of the Use of Metals in Medicine.

Metallo drugs **1**, 10–23 (2015).

117. Shahraki, S. & Heydari, A. Binding forces between a novel Schiff base palladium(II) complex and two carrier proteins: human serum albumin and β -lactoglobulin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **36**, 2807–2821 (2018).
118. Ferraz, K. O. S. *et al.* N(4)-tolyl-2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) and platinum(II) complexes: Cytotoxicity against human solid tumor cells. *Polyhedron* **30**, 315–321 (2011).
119. Abu-surrah, A. S., Al-sa, H. H. & Abdalla, M. Y. Palladium-based chemotherapeutic agents : Routes toward complexes with good antitumor activity Review Article. *Therapy* **6**, 1–10 (2008).
120. Miklášová, N. *et al.* Antiproliferative effect of novel platinum(II) and palladium(II) complexes on hepatic tumor stem cells in vitro. *Eur. J. Med. Chem.* **49**, 41–47 (2012).
121. Ulukaya, E. *et al.* Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4957–4963 (2011).
122. Ulukaya, E. *et al.* Cell death-inducing effect of novel palladium(II) and platinum(II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 1425–1434 (2011).
123. Ruiz, J. *et al.* Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with 4,7-dihydro-5-methyl-7-oxo[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine. Antitumor activity of the platinum compounds. *Inorg. Chem.* **47**, 4490–4505 (2008).
124. Eslami Moghadam, M., Divsalar, A., Abolhosseini Shahrnoy, A. & Saboury, A. A. Synthesis, cytotoxicity assessment, and interaction and docking of novel palladium(II) complexes of imidazole derivatives with human serum albumin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **34**, 1751–1762 (2016).
125. Divsalar, A. *et al.* Biological evaluation and interaction of a newly designed anti-cancer pd(ii) complex and human serum albumin. *J.*

- Biomol. Struct. Dyn.* **29**, 283–296 (2011).
126. Zareian-Jahromi, S. & Mansouri-Torshizi, H. Synthesis, characterization, DNA and HSA binding studies of isomeric Pd (II) antitumor complexes using spectrophotometry techniques. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **36**, 1329–1350 (2018).
 127. Kacar, O. *et al.* Evaluation of the molecular mechanisms of a palladium(II) saccharinate complex with terpyridine as an anticancer agent. *Anticancer. Drugs* **25**, 17–29 (2014).
 128. King-Turner, A. C. The treatment of epilepsy by collosol palladium. *Br. Med. J.* **2**, 255 (1918).
 129. Barros, W. B. Z. G. *et al.* Palladium-benzodiazepine derivatives as promising metallodrugs for the development of antiepileptic therapies. *J. Inorg. Biochem.* **155**, 129–135 (2016).
 130. Storz, J. F. *Principles of protein structure. Hemoglobin* (Springer Science & Business Media, 2018).
 131. Guido, R. V. C., Andricopulo, A. D. & Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. Avançados* **24**, 81–98 (2010).
 132. Martí-Renom, M. A. *et al.* Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291–325 (2000).
 133. Webb, B. & Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER: Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. 5.6.1-5.6.32 (2014).
 134. Lipman, D. J. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
 135. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).

136. Šali, A. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Mol. Med. Today* **1**, 270–277 (1995).
137. Misura, K. M. S. & Baker, D. Progress and challenges in high-resolution refinement of protein structure models. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **59**, 15–29 (2005).
138. Sievers, F. & Higgins, D. G. Clustal Omega. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **2014**, 3.13.1-3.13.16 (2014).
139. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–7 (2004).
140. Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment 1 Edited by J. Thornton. *J. Mol. Biol.* **302**, 205–217 (2002).
141. Baker, D. & Sali, A. Protein structure prediction and structural genomics. *Science (80-.).* **294**, 93–96 (2001).
142. Rost, B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* **12**, 85–94 (1999).
143. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3381–5 (2003).
144. Colovos, C. & Yeates, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* **2**, 1511–1519 (1993).
145. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291 (2002).
146. Hooft, R.W., G. Vriend, C. Sander, and E. E. A. Errors in protein structures. *Nature* 381: 272. *Nature* **381**, 272 (1996).
147. Vriend, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52–6, 29 (1990).
148. Richter, L. *et al.* Diazepam-bound GABA A receptor models identify new

- benzodiazepine binding-site ligands Europe PMC Funders Group. *Nat Chem Biol* **8**, 455–464 (2012).
149. Amundarain, M. J., Viso, J. F., Zamarreño, F., Giorgetti, A. & Costabel, M. Orthosteric and benzodiazepine cavities of the $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ GABA A receptor: insights from experimentally validated in silico methods. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **37**, 1597–1615 (2019).
150. Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 882–894 (2002).
151. Langer, T. & Hoffmann, R. Virtual Screening An Effective Tool for Lead Structure Discovery. *Curr. Pharm. Des.* **7**, 509–527 (2005).
152. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R. & Ferrin, T. E. A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. (1982).
153. Gohlke, H. & Klebe, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 2644–2676 (2002).
154. Kastritis, P. L. *et al.* A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. *Protein Sci.* **20**, 482–491 (2011).
155. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 935–49 (2004).
156. Brooijmans, N. & Kuntz, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 335–373 (2003).
157. Taylor, R. D., Jewsbury, P. J. & Essex, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **16**, 151–66 (2002).
158. Wang, R., Lu, Y. & Wang, S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J. Med. Chem.* **46**, 2287–2303 (2003).
159. Huang, S. Y., Grinter, S. Z. & Zou, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and

- future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 12899–12908 (2010).
160. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comp Chem* **30**, 2785–91 (2009).
161. Ewing, T. J. A., Makino, S., Skillman, A. G. & Kuntz, I. D. <DOCK 4.0 Search strategies for automated molecular docking of flexible.pdf>. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **15**, 411–428 (2001).
162. Ervø, J. *et al.* Giftgas over Byen. Civilbefolkningens Beskyttelse Under Den Næste krig. **623**, 609–623 (1933).
163. De Magalhães, C. S., Almeida, D. M., Barbosa, H. J. C. & Dardenne, L. E. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Inf. Sci. (Ny)*. **289**, 206–224 (2014).
164. Pace, C. N. & Scholtz, J. M. *Protein structure: A practical approach*, 2. (Oxford University Press, USA, 1997).
165. BANASZAK, L. J. Introduction to Protein Structure. in *Foundations of Structural Biology* 1–5 (Garland Science, 2007).
166. Bairoch *et al.*, A. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **33**, 154–159 (2005).
167. Lassmann, T., Frings, O. & Sonnhammer, E. L. L. Kalign2: High-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. *Nucleic Acids Res.* **37**, 858–865 (2009).
168. Styczynski, M. P., Jensen, K. L., Rigoutsos, I. & Stephanopoulos, G. BLOSUM62 miscalculations improve search performance. *Nat. Biotechnol.* **26**, 274–275 (2008).
169. Abraham, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25 (2015).
170. Kresten, L.-L. *et al.* Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **78**, 1950–1958 (2010).

171. Taylor, P., Grubmüller, H., Heller, H., Windemuth, A. & Schulten, K. Generalized Verlet Algorithm for Efficient Molecular Dynamics Simulations with Long-range Interactions EFFICIENT MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS WITH LONG-RANGE. *Mol. Simul.* **6**, 37–41 (2012).
172. Fiser, A., Do, R. K. G. & Šali, A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci.* **9**, 1753–1773 (2000).
173. Yu, J., Zhou, Y., Tanaka, I. & Yao, M. Roll: A new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. *Bioinformatics* **26**, 46–52 (2009).
174. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. & Baker, N. A. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665–W667 (2004).
175. Wang, J. M., Cieplak, P. & Kollman, P. A. <Kollman-WangJunmeiJCC2000.pdf>. *J. Comput. Chem.* **21**, 1049–1074 (2000).
176. Le Guilloux, V., Schmidtke, P. & Tuffery, P. Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics* **46**, 767–774 (2009).
177. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* **34**, D668-72 (2006).
178. Hanwell, M. D. *et al.* Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **4**, 17 (2012).
179. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian~16 Revision A.03. (2016).
180. Sosa, C. *et al.* A local density functional study of the structure and vibrational frequencies of molecular transition-metal compounds. *J. Phys. Chem.* **96**, 6630–6636 (1992).
181. Besler, B. H., Merz, K. M., J. & Kollman, P. A. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* **11**, 431–439 (1990).
182. Singh, U. C. & Kollman, P. A. An approach to computing electrostatic

- charges for molecules. *J. Comput. Chem.* **5**, 129–145 (1984).
183. Sheeran, P., Streeter, J. & Dayton, P. Towards ultrasound molecular imaging with phase-change contrast agents. *Ultrasound Med. Biol.* **39**, 893–902 (2013).
 184. Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F. & Schroeder, M. PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* **43**, W443–W447 (2015).
 185. Laskowski, R. A. & Swindells, M. B. LigPlot + : multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery LigPlot + : multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery Roman A Laskowski *,† and Mark B Swindells. (2011).
 186. Šali, A. & Blundell, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815 (1993).
 187. Celie, P. H. N. *et al.* Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures. *Neuron* **41**, 907–914 (2004).
 188. Hansen, S. B. *et al.* Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J.* **24**, 3635–3646 (2005).
 189. Dellisanti, C. D., Yao, Y., Stroud, J. C., Wang, Z. Z. & Chen, L. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR α 1 bound to α -bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nat. Neurosci.* **10**, 953–962 (2007).
 190. Humphrey W., Dalke A. & Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).