

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CAMILA RIZZOTTO

**RECEPTOR DE CANABINOIDE 2. NOVO ALVO TERAPÊUTICO PARA
TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE: UMA ANÁLISE DA INTERAÇÃO COM
LIGANTES ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DA
BIOINFORMÁTICA**

Porto Alegre
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

CAMILA RIZZOTTO

**RECEPTOR DE CANABINOIDE 2. NOVO ALVO TERAPÊUTICO PARA
TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE: UMA ANÁLISE DA INTERAÇÃO COM
LIGANTES ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DA
BIOINFORMÁTICA**

Porto Alegre
2020

CAMILA RIZZOTTO

**RECEPTOR DE CANABINOIDE 2. NOVO ALVO TERAPÊUTICO PARA
TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE: UMA ANÁLISE DA INTERAÇÃO COM
LIGANTES ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DA
BIOINFORMÁTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.

Porto Alegre
2020

CAMILA RIZZOTTO

**RECEPTOR DE CANABINOIDE 2. NOVO ALVO TERAPÊUTICO PARA
TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE: UMA ANÁLISE DA INTERAÇÃO COM
LIGANTES ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DA
BIOINFORMÁTICA.**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Área de concentração: Biologia Molecular da Interação Droga/Alvo

Aprovada em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza

Prof. Dra. Fernanda Bueno Morrone

Prof. Dra. Maria Martha Campos

Porto Alegre
2020

Ficha Catalográfica

R627r Rizzotto, Camila

Receptor de Canabinoide 2. Novo Alvo Terapêutico para Tratamento da Osteoporose : uma Análise da Interação com Ligantes Através da Aplicação de Ferramentas da Bioinformática / Camila Rizzotto . – 2020. 111.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira De Azevedo Júnior.

1. Receptor Canabinoide 2. 2. Aprendizagem de máquina. 3. Mollegro Virtual Docker. 4. Osteoporose. I. De Azevedo Júnior, Walter Filgueira. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

Dedico à minha família, à Marcela Lewis que, sempre presentes, prestaram apoio incondicional ao meu desenvolvimento científico e intelectual. Agradeço à amiga Silvana Russo e à orientação do professor Walter que de maneira leve e didática me trouxeram até aqui. Ao mundo por nos manter em constante evolução e desafio.

“ Never interrupt someone doing what you said couldn't be done. Never do things others can do and will do if there are things others cannot do or will not do.”

Amelia Earhart

RESUMO

Os receptores canabinoide estão amplamente distribuídos nos tecidos animais e são classificados como tipos 1 e 2. Sabe-se que estes receptores são responsáveis por inúmeras funções nos tecidos saudáveis e tem sua estrutura preservada ao longo do tempo e das espécies. O receptor canabinoide 1, que recentemente teve sua estrutura resolvida por cristalografia de difração de raios-x, está presente em grande parte no sistema nervoso central - sendo responsável por funções como controle do gasto energético, da memória e do aprendizado. Sabemos também do seu papel em várias desordens dos sistemas como nas manifestações de dor crônica, epilepsia e outras doenças neurodegenerativas. Apesar de também presente no sistema nervoso central, o receptor canabinoide 2 é mais frequente no tecido hematopoético e no sistema imune, sendo responsável pelo controle de alguns processos relacionados ao metabolismo ósseo e no controle de rotas da atividade inflamatória do organismo. Ambos receptores pertencem à família de receptores ligados à proteína G em um sistema amplamente estudado e hoje conhecido como sistema endocanabinoide. O uso de ferramentas da bioinformática ajuda a elucidar alvos terapêuticos para controle da expressão destes receptores visando sanar algumas carências nos tratamentos de doenças crônicas complexas. Recentemente a estrutura cristalográfica do Receptor Canabinoide 1 foi resolvida com elevada resolução. Por ser um receptor de membrana existem dificuldades intrínsecas para determinação estrutural desta proteína. Em um curto período foram disponibilizadas na base de dados do *Protein Data Bank* duas estruturas do receptor ligadas à agonistas e outras duas ligadas à antagonistas. Mais recentemente foi resolvida a estrutura tridimensional do Receptor de canabinoide tipo 2 e esse avanço abriu espaço para, com certa segurança, termos usado a estrutura resolvida para achar as cavidades ativas da proteína para docagem e determinação de possíveis alvos terapêuticos para tratamento das doenças osteometabólicas, como a osteoporose, e das doenças inflamatórias crônicas. Visamos o uso da metodologia computacional na identificação de sítios de ligação da proteína e uso de docagem para teste de pequenas moléculas como agonistas e antagonistas do receptor. Foram usadas abordagens de docking molecular e o aprendizado de máquina para investigarmos as interações proteína-

ligante.

Palavras-chave: Receptor. Canabinoide 1. Canabinoide 2. Docagem. GCPR. CB1. CB2. CNR1. CNR2. Osteoporose.

ABSTRACT

Cannabinoid receptors are widely distributed in animal tissues and are classified as types 1 and 2. It is known that these receptors are responsible for numerous functions in healthy tissues and their structure is preserved over time and species. The cannabinoid receptor 1, which recently had its structure resolved by X-ray diffraction crystallography, is present largely in the central nervous system - being responsible for functions such as managing energy expenditure, memory and learning. We are also aware of its role in various disorders of the systems such as the manifestations of chronic pain, epilepsy and neurodegenerative diseases. Although also present in the central nervous system, the cannabinoid receptor 2 is more frequently found in hematopoietic tissue and in the immune system, being responsible for controlling some of the processes related to bone metabolism and in routes of inflammatory activity. Both receptors belong to the family of receptors linked to the G protein in a widely studied system and today known as the endocannabinoid system. The use of bioinformatics tools helps to elucidate therapeutic targets to control the expression of these receptors in order to solve some deficiencies in the treatment of complex chronic diseases. Recently, the crystallographic structure of the Cannabinoid Receptor 1 was resolved with high resolution. Because it is a membrane receptor, there are intrinsic difficulties for structural determination of this protein. In a short period, two structures of the receptor linked to agonists and two others linked to antagonists were made available in the Protein Data Bank database. Most recently, the three-dimensional structure of the type 2 cannabinoid receptor has been resolved and this advance made room for, with some certainty, the use of resolved structure to find the active protein cavities for docking and determining possible therapeutic targets for the treatment of osteometabolic diseases, like osteoporosis, and chronic inflammatory diseases. We used a computational methodology to identify protein binding sites and docking to test small molecules as receptor agonists and antagonists. Molecular docking approaches and machine learning were used to investigate protein-ligand interactions and to create a protein-specific score function to accurately predict other possible interactions should they be evaluated in the future.

Keywords: Receptor. Cannabinoid 1. Cannabinoid 2. Docking. GCPR. CB1. CB2. CNR1. CNR2. Osteoporosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vias de sinalização dos receptores de canabinoide tipos 1 e tipo 2.....	21
Figura 2 - Osteopenia por desuso.....	29
Figura 3 - Vias de sinalização na célula osteoclástica.....	35
Figura 4 - Complicações odontológicas uso bifosfonados.....	42
Figura 5 - Alterações uso crônico bifosfonados.....	43
Figura 6 - Efeitos ósseos dos agentes anabólicos e antireabsortivos.....	46
Figura 7 - Fluxograma.....	52
Figura 8 - Estrutura molecular do ligante 9JU.....	54
Figura 9 - Modelo chave-fechadura.....	55
Figura 10 - Simulação de redocking.....	59
Figura 11 - Esfera de docking 5ZTY.....	62
Figura 12 - Gráfico variáveis monotônicas.....	63
Figura 13 - MDM afinidade experimental e nº de ângulos de torção do ligante.....	65
Figura 14 - MDM valores previstos para afinidade.....	67
Figura 15 - MDM mostrando a análise estatística.....	68
Figura 16 - Hélices alfa.....	72
Figura 17 - Posicionamento das cadeias laterais.....	73
Figura 18 - Estrutura cristalográfica do receptor CB2.....	73
Figura 19 - Modelo interação CB2/membrana plasmática.....	74
Figura 20 - Interações CB2 com agonista AM10257.....	75
Figura 21 - Alinhamento das sequências CB1 e CB2.....	76
Figura 22 - Resultado redocking AM10257.....	77
Figura 23 - Empacotamento cristalino da estrutura do CB2.....	78
Figura 24 - Mapa de densidade eletrônica AM10257.....	80
Figura 25 - Centro de massa do antagonista AM10257.....	81
Figura 26 - Gráfico dispersão: valor experimental de $\log(K_i)$ x valor de energia previsto pela função Moldock Score.....	84
Figura 27 - Gráfico dispersão: valor experimental de $\log(K_i)$ x nº de carbonos hibridizáveis sp^2	85
Figura 28 - SanDres: Gráfico de dispersão dos valores experimentais e teóricos de $\log(K_i)$	87

Figura 29 - SanDres: Gráfico de dispersão dos valores experimentais e teóricos de $\log(K_i)$	89
Figura 30 - Espaço de funções escores.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Poder de previsão de afinidade.....	7
Tabela 2 – Modelos de aprendizagem de máquina para o conjunto treino.....	12
Tabela 3 – Afinidade dos modelos de aprendizagem de máquina para o conjunto teste.	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEA	Anandamida
BP	Bifosfonados
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
CB1	Receptor Canabinoide 1
CB2	Receptor Canabinoide 2
CBD	Canabidiol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
DMO	Densidade Mineral Óssea
GCPR	<i>G Coupling Proteina Receptor/Receptor Acoplado à Proteína G</i>
THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
mRNA	RNA mensageiro
MVD	<i>Molegro Virtual Docking</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PTH	Paratormonio
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B</i>
RANK-L	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RMSD	<i>Root-Mean Square Deviation</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

K_i	Constante Inibitória
K_d	Constante de Dissociação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. O SISTEMA ENDOCANABINOIDE	20
2.1. OS FITOCANABINOIDES	20
2.2. OS RECEPTORES	20
2.3. OS LIGANTES: AGONISTAS, ANTAGONISTAS E AGONISTAS INVERSOS	21
2.4. A FILOGENIA DO RECEPTOR: UM PANORAMA EVOLUTIVO	24
2.5. DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES NO ORGANISMO	24
3. USOS CLÍNICOS	26
4. OSTEOPOROSE	28
4.1. PATOGÊNESE	31
4.1.1. FISILOGIA ÓSSEA: COMPONENTES E ESTRUTURA	31
4.1.2. FISILOGIA ÓSSEA REGULAÇÃO HORMONAL E METABÓLICA: A HOMEOSTASE DO CÁLCIO E DO FOSFATO	33
4.1.3. FORMAÇÃO ÓSSEA CANÔNICA.....	34
4.2. CLASSIFICAÇÃO	37
4.3. ETIOLOGIA DA OSTEOPOROSE	38
4.4. DIAGNÓSTICO	39
4.4.1. EXAMES DE IMAGEM	40
4.4.2. LABORATORIAIS.....	40
4.5. TRATAMENTO	41
4.5.1. NAO-FARMACOLÓGICO	41
4.5.2. FARMACOLÓGICO	42
4.5.2.1. FÁRMACOS ANTI CATABÓLICOS.....	42
4.4.2. FÁRMACOS ANABÓLICOS	46
4.4.3. ALTERNATIVOS/CANABINOIDES	48
4. JUSTIFICATIVA	50
5. HIPÓTESE	52
5.1. OBJETIVO GERAL	52
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
6. MATERIAIS E MÉTODOS	53

6.1	DOWNLOAD DOS DADOS ESTRUTURAIS	54
6.2	TESTE DOS PROTOCOLOS DE DOCKING DO MOLEGRO VIRTUAL DOCKER	56
6.3.	SELEÇÃO DO MELHOR PROTOCOLO DE DOCKING DO MOLEGRO VIRTUAL DOCKER.....	58
6.4	DOWNLOAD DOS DADOS DE AFINIDADE E DAS ESTRUTURAS DOS LIGANTES.....	60
6.5	FILTRAGEM DO DADOS DE AFINIDADE E DAS ESTRUTURAS	61
6.6	IDENTIFICAÇÃO DAS COORDENADAS ATÔMICAS DO CENTRO DO BOLSÃO DE LIGAÇÃO DA ESTRUTURA DO CB2	62
6.7	PREPARAÇÃO DA ESTRUTURA DO RECEPTOR CB2 PARA VIRTUAL SCREENING	62
6.8	SIMULAÇÃO DE VIRTUAL SCREENING	63
6.9	PREPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE VIRTUAL SCREENING PARA APRENDIZADO DE MÁQUINA	65
6.10	APRENDIZADO DE MÁQUINA	67
6.11	SERVIDOR E PROGRAMAS USADOS NAS SIMULAÇÕES	70
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
7.1	DADOS ESTRUTURAIS	72
7.2	ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES RECEPTOR CB2-ANTAGONISTA	75
7.3	DOCKING MOLECULAR	78
7.4	DADOS DE AFINIDADE E AS ESTRUTURAS DOS LIGANTES	81
7.5	SIMULAÇÃO DE VIRTUAL SCREENING	82
7.6	APRENDIZADO DE MÁQUINA	86
8.	CONCLUSÃO	94
8.1.	TRABALHOS FUTUROS	94
	REFERÊNCIAS.....	96
	ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO	111

1. INTRODUÇÃO

Proteínas de membrana são estruturas essenciais nas atividades celulares pela sua habilidade em intermediar o influxo de informação através do meio externo até o núcleo da célula (WATSON, 2015). O receptor canabinoide 2 (CB2) é uma dessas estruturas e tem grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas e possivelmente no tratamento de uma vasta gama de doenças humanas. O CB2 é um dos dois receptores que compõe o sistema endocanabinoide, sendo mais um membro da família de receptores acoplados à proteína-G. Esta família de receptores consiste hoje em aproximadamente 800 proteínas com uma topologia geral bastante similar (JACOB, 2008). O CB2 está expresso em menor quantidade no sistema neurológico e, em maior expressão, nos sistemas imune e hematopoético onde exerce parte de suas funções como por exemplo a osteogênese.

Do ponto de vista evolutivo o sistema endocanabinoide é bem preservado das plantas aos animais e é composto por: receptores canabinoides 1 e 2, os endocannabinoides (moléculas naturalmente expressas), os derivados sintéticos canabinoides e as enzimas do metabolismo canabinoide (MALFITANO, et al., 2014). Existem evidências sugerindo que os receptores canabinoides são filogeneticamente antigos, porque genes homólogos do Receptor Canabinoide 1 (CB1) são encontradas em outros animais. Invertebrados também expressam o receptor canabinoide (ELPHICK, 2001). O receptor canabinoide 1 foi o primeiro a ser identificado e resolvido por cristalografia. Atualmente se sabe sobre seus efeitos psicoativos no sistema nervoso central. O receptor canabinoide 2 foi o segundo a ser estudado, sendo primeiramente identificado em cDNA gerado na biblioteca de células HL60, linha celular leucêmica. A estrutura do CB2 foi recentemente cristalizada e resolvida em janeiro de 2019 e os resultados já sugerem uma complementariedade entre os receptores CB1 e CB2, o que permite desenho mais racional de fármacos envolvendo a rota canabinoide (XIAOTING, et al., 2019).

CB1 e CB2 compartilham de 44% de identidade nos seus aminoácidos componentes e na sequência desses, o que nos leva à conclusão de que sua estrutura não sofreu divergência evolucionária recente. O CB2 é ainda mais preservado no que tange a sua identidade sequencial foi estimada em 82% entre as espécies - humanos e camundongos (MALFITANO, et al., 2014). A resolução da estrutura agora nos permite aprimorar modelo computacionais de aprendizado de máquina visando a

possibilidade de encontrar novos ligantes desta proteína e também compreender melhor o seu comportamento bem como executar tentativas de virtual screening de moléculas para desenho de fármacos. A arquitetura molecular complexa dos receptores canabinoides permite que cada um dos receptores reconheça diversos tipos de ligantes que são responsáveis por múltiplas cascatas de sinalização (CONSOLE-BRAM, et al., 2012).

Tradicionalmente reconhecida pelos avanços nos campos da genômica bioinformática é um campo de estudo que, através de diferentes programas e ferramentas computacionais, também nos permite avançar em conhecimentos em outras áreas de biologia molecular e celular. No caso do desenvolvimento de fármaco algumas ferramentas nos permitem fazer as simulações das ligações entre proteínas específicas e seus ligantes, bem como criar modelos de maquina para agilizar o processo de reconhecimento dos ligantes e seu grau de compatibilidade com as proteínas estudadas - modelo de chave e fechadura explorado e explanado nas próximas seções desse trabalho. Sendo um campo interdisciplinar trabalha com aplicação de tecnologias da informática no sentido de analisar áreas de estudo da biologia. No presente estudo foram utilizadas técnicas para tratamento dos dados de proteínas e ligantes bem como avaliação de sua configuração tridimensional na tentativa de correlacionar os dados biológicos com os modelos gerados. A partir dos modelos de aprendizado de maquina é possível analisar bancos de dados maiores com centenas, até milhares, de ligantes visando possíveis pequenas moléculas capazes de atuar na expressão dos receptores CB1 e CB2, por exemplo.

2. O SISTEMA ENDOCANABINOIDE

A clonagem do Receptor Canabinoide 1 e a descoberta da anandamida como ligante importante deste receptor levaram ao entendimento da existência de um sistema complexo distribuído por todo o organismo com funções variadas nos diferentes sistemas. Em pouco tempo foi descoberta a existência do segundo receptor canabinoide e sua distribuição em tecidos diferentes do CB1 (MALFITANO, et al., 2014).

O sistema endocanabinoide consiste dos receptores canabinoides, seus ligantes e as enzimas que os metabolizam. São também incluídos os canabinoides naturais ou fitocannabinoides (DI MARZO, 2015).

2.1. OS FITOCANABINOIDES

As capacidades alteradoras de consciência da planta *Cannabis sativa* são conhecidas há mais de 12.000 anos. O delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) é o composto psicoativo primário da Cannabis. Os fitocannabinoides são definidos como uma família de compostos lipofílicos que estão relacionados estruturalmente ao THC. É estimado que a planta contenha mais de 100 fitocannabinoides diferentes disponíveis para interação com os receptores CB1 e CB2 (HUA, et al., 2017 e ELPHICK, 2001)

A Cannabis, em humanos, gera experiências subjetivas complexas, desde a elevação do humor, sensibilidade aumentada a estímulos externos e relaxamento, que ocorrem da interação do THC com o Receptor Canabinoide 1 nas áreas límbicas e paralímbicas do cérebro, ambas relacionados ao controle do comportamento emocional. Também pode estar relacionada com ativação dos receptores em outros tecidos, sendo responsável pela imunomodulação em receptores do tipo 2 (ELPHICK, 2001).

2.2. OS RECEPTORES

A família dos receptores ligados a proteína G, a qual consiste de aproximadamente 800 proteínas, são proteínas de membrana integrais. Apresentam uma topologia global comum que compreende 7 hélices alfa transmembrana, um terminal C intracelular, um terminal N extracelular, 3 alças intracelulares e 3 alças

extracelulares (JACOB, et al., 2008). Os receptores canabinoide 1 e 2 são parte desta grande família de proteínas tanto pela multiplicidade de ações como essencialmente pela sua conformação estrutural similar.

Segundo Ogawa, os Receptores Canabinoides 1 são abundantes no sistema nervoso central, particularmente no córtex, gânglio basais, hipocampo, amígdala, núcleo estriado, substância negra e cerebelo, nos terminais axônicos e nos segmentos de axônio pré-terminal, compartimento intracelulares (mitocôndria) e tecidos periféricos (pulmão, intestino delgado, útero, testículo). Os Receptores Canabinoides 2 estão presentes na micróglia, nos tecidos periféricos (baço, amígdala tonsiliana, linfonodos), também nas células osteogênicas e osteoreguladoras, mas principalmente nas células imunes (macrófagos, monócitos, linfócitos B e células natural killer) (OGAWA, 2015). Diferentemente de outros receptores ligados a proteína G os receptores canabinoides parecem ter mais de um ligante endógeno (DI MARZO, 2012) e uma multiplicidade de funções conforme o sítio de ligação utilizado, o que abre a possibilidade de uma diversidade enorme de alvos terapêuticos e de modulação desse receptor.

2.3. OS LIGANTES: AGONISTAS, ANTAGONISTAS E AGONISTAS INVERSOS

Os receptores associados a proteína G tem variados graus de atividade basal constitutiva. Quando pensamos nos modelos clássicos de desenvolvimento de fármacos e nos estágios convencionais dos modelos de droga-receptor alvo podemos dividir as atividades dos ligantes nos receptores como ligantes que iniciam a atividade da proteína sendo essa classe os agonistas (com vários graus de atividade intrínseca positiva) ou aqueles que evitam o efeito da proteína chamados antagonistas (com nenhuma atividade intrínseca). Os agonistas inversos se ligam constitutivamente aos receptores, os estabilizam e então produzem o efeito para o qual a proteína se destina - atividade intrínseca negativa (KHILNANI, 2011).

Os receptores CB1 e CB2 interagem com uma vasta gama de moléculas que agem como agonistas, antagonistas ou agonistas inversos desses receptores. Os agonistas dos receptores CB1 e CB2 são divididos didaticamente em 4 grupos principais: os clássicos, não-clássicos, os eicosanoides e os aminoalcalinoides. Os clássicos são os compostos Δ^9 -THC e a (6aR)-trans-3-(1,1-dimethylheptyl)-

6a,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6Hdibenzo[b,d]pyran-9- ethanol (HU-210) - uma molécula sintética análoga ao Δ 9-THC. Os não clássicos são os compostos bicíclicos e tricíclicos análogos do Δ 9-THC, mas que não contém um anel de pirídio. Os aminoalcalinoides são estruturas marcadamente diferentes das anteriores, principalmente o composto R-(+)-WIN55212. E, finalmente, os eicosanoides são os próprios endocanabinoides, nominalmente a anamida e o 2-AG. Os agonistas seletivos ativam mais os receptores do tipo 1 em relação aos receptores do tipo 2 (PERTWEE, et al., 2010).

Os receptores associados a proteína G tem variados graus de atividade basal. Quando pensamos nos modelos clássicos de desenvolvimento de fármacos e nos estágios convencionais dos modelos de droga-receptor alvo podemos dividir as atividades dos ligantes nos receptores como ligantes que iniciam a atividade da proteína sendo essa classe os agonistas (com vários graus de atividade intrínseca positiva) ou aqueles que evitam o efeito da proteína chamados antagonistas (com nenhuma atividade intrínseca). Os agonistas inversos se ligam constitutivamente aos receptores, os estabilizam e então produzem o efeito pelo qual a proteína se destina (atividade intrínseca negativa) (KHILNANI, 2011).

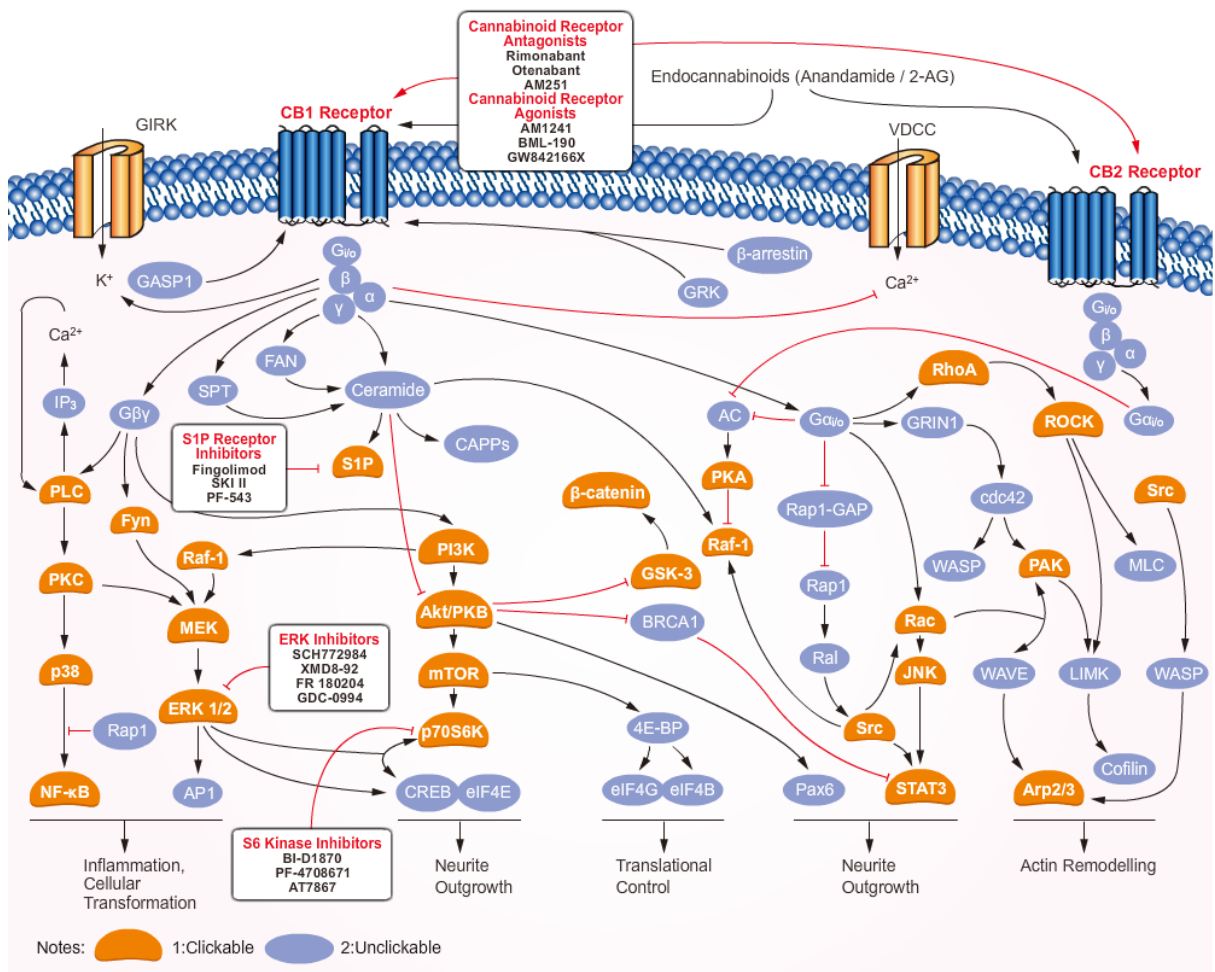
Os receptores canabinoides têm uma vasta gama de ligantes endógenos, fitocanabinoides e sintéticos que se ligam as cavidades das proteínas do sistema. Os endocanabinoides derivados do ácido araquidônico, o sn-2-aracondoiliglicerol (2-AG) e a N-aracondoiletanolamina (anandamida, AEA) são ácidos graxos polinsaturados derivados da hidrólise dos fosfolípídeos de membrana e conhecidos por serem agonistas do receptor canabinoide tipo 2. Hoje em dia é aceito que a 2-AG age como um agonista completo dos Receptores Canabinoides 1 e 2 com moderada afinidade, enquanto anandamida é um agonista parcial do receptor canabinoide 1 com alta afinidade (MARINO, 2017). Por seus precursores estarem presentes nas membranas lipídicas das células, a produção dos endocanabinoides pode ser recrutada conforme a necessidade e disponibilidade dessas substâncias em determinados tecidos, o que também está relacionado com a expressão dos próprios receptores, tanto do tipo 1 quanto do tipo 2. (LU, 2016).

Quanto ao receptor canabinoide do tipo 2 também podemos comentar a função complexa dos ligantes do tipo fitocanabinoide, tanto o 9-tetrahydrocannabinol (THC) ligante psicoativo quanto o canabidiol (CBD) - ligante sem ação psicoativa. A

farmacologia complexa dessas moléculas, ainda não bem compreendida, traz essas substâncias como agonistas parciais ou mesmo antagonistas. O papel desses ligantes está relacionado com o nível de expressão de ambos os receptores e os ligantes em tipos específicos de tecidos. (MARINO, 2017).

As diversas estruturas sintéticas já desenvolvidas são similares aos fitocanabinoides e são exemplos: JWH133, JWH133, JWH015, HU308 e AM1241 que atuam como agonistas ou agonistas inversos dependendo do tecido e da espécie estudada. Alguns compostos são ligantes específicos do receptor do tipo 2 são eles os agentes: AM630 e SR144528 que tem funções de antagonistas silenciosos ou agonistas inversos (MARINO, 2017).

Figura 1. Vias de sinalização receptores de canabinoide tipo 1 e tipo 2. Em destaques os agonistas e antagonistas do CB1. Fonte: website thermo fisher.



2.4. A FILOGENIA DO RECEPTOR: UM PANORAMA EVOLUTIVO

Existem evidências sugerindo que os receptores canabinoides são bastante antigos já que genes homólogos do Receptor Canabinoide 1 foram encontrados em outros animais. Invertebrados também expressam o receptor canabinoide (ELPHICK, 2001). Foi proposto que os humanos adquiriram o Receptor Canabinoide 1 via transferência horizontal de genes (ELPHICK, 2012) da planta *Cannabis sativa*, mas essa hipótese hoje é questionada em luz da descoberta do ligante endógeno do receptor canabinoide, o qual é produzido no cérebro humano. Os endocanabinoides são uma boa explicação do porque nós possuímos receptores que respondem aos compostos da *Cannabis* - os ligantes da planta são muito similares aos nossos ligantes endógenos (DI MARZO, 2015)

A avaliação genética do receptor canabinoide 1 sugere que um gene antigo desse receptor passou por um evento de duplicação dando origem ao que seriam atualmente os Receptores Canabinoides 1 e 2. Há hipótese de que esse evento ocorreu antes da divergência entre vertebrados e invertebrados porque, pelo menos um dos produtos da duplicação, o gene do Receptor Canabinoide 1 tem ortólogos em ambos vertebrados e invertebrados (DI MARZO, 2015).

A disponibilidade da estrutura cristalográfica do CB2 torna possível o uso de abordagens computacionais para identificação de potenciais ligantes com ações farmacológicas.

2.5 DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES NO ORGANISMO

Os Receptores Canabinoides 1 são expressos em diferentes tipos de células do sistema nervoso central e periférico, sendo expressos também em diferentes quantidades. Essa distribuição ampla e a sua expressão diferencial refletem a complexidade e podem explicar a variedade de funções e alguns dos efeitos bimodais das fármacos canabinoides (DI MARZO, 2015).

Os Receptores Canabinoides 1 localizados nos neurônios gabaérgicos controlam comportamentos associados à alimentação, adição à drogas e, também, os processos de aprendizado e de memória (BUSQUETS, et al., 2016 e LORENZETTI, et al., 2016). Aqueles presentes nos neurônios glutamatérgicos controlam neuroproteção, processos olfatórios, memórias de medo, comportamento social e

ansiedade. Receptores presentes nos neurônios serotoninérgicos modulam as respostas emocionais (BUSQUETS, et al., 2016 e LORENZETTI, et al., 2016). Aqueles presentes na astróglia parecem modular aprendizado e memória no hipocampo (BUSQUETS, et al., 2016) e, finalmente, os receptores mitocondriais promovem amnésia induzida por agonistas dos Receptores Canabinoídeos 1 no hipocampo (KOCH, 2017).

Já os receptores canabinoíde tipo 2 são abundantes nos tecidos da microglia, linhas celulares hematopoiéticas, em especial linhagens de macrófagos, e em outras células do sistema imune (DHOPESHWARKAR, 2014). Uma propriedade biológica interessante dos receptores CB2 é a sua alta capacidade de indução, podendo se observar um aumento de produção nos níveis de mRNA codificantes da proteína em até 100 vezes após uma lesão neurológica ou durante processos inflamatórios (MARESZ, et al., 2005 e HSIEH 2011). Tecidos de ação dos receptores CB2 centrais e periféricos incluem a atividade de analgesia mediada nos processos de inflamação crônica e modelos de dor neuropática em camundongos (HSIEH, 2011).

Em organismos saudáveis a expressão do CB2 é mais abundante nas células da linhagem dos macrófagos, porém também foram observados em outras células do sistema imune. Conforme Galiègue e colegas a ordem da frequência de expressão no tecido imune conforme avaliação da quantidade de mRNA segue em sequência decrescente: células B, células linfocíticas natural killer, células monócitos tipo S, neutrófilos polimorfonucleares, células T8 e, finalmente, células T4.

3. USOS CLÍNICOS

Os Receptores Canabinoides 1 são alvos terapêuticos para um grande número de doenças e a inativação da enzima FAAH produz efeitos analgésicos, antiinflamatórios, ansiolíticos, e antidepressivos sem causar os efeitos colaterais dos agonistas dos Receptores Canabinoides 1, indicando que a enzima em si pode ser um alvo terapêutico promissor (AHN, 2009).

Quanto aos receptores canabinoide 2 já existem estudos apontando para seus efeitos benéficos nos tecidos humanos. Sua modulação seletiva sem ativação da via psicoativa do CB1 pode ser alvo também no tratamento de doenças inflamatórias, fibróticas ou neurodegenerativas. Estudos recentes mostram que a pose de ligação do sítio de ligação é bastante diferente entre estes receptores, sugerindo uma oposição entre agonistas do receptor CB1 e antagonistas do receptor CB2 (XIAOTING, et al., 2019).

Complicações esqueléticas são causas comuns de morbidade em pacientes com tumores ósseos primários e metastáticos. O receptor canabinoide 2 vem sendo implicado no câncer, metabolismo ósseo e também na percepção da dor. Em camundongos já pode ser observada a relação de aumento da absorção óssea e diminuição na produção do tecido ósseo conforme envelhecimento nos animais experimentais com deficit de expressão do CB2. Antagonistas do receptor do tipo 2 podem servir clinicamente como agentes antireabsortivos no tratamento da osteoporose já que o CB2 está presente nas células osteoblásticas e sua ativação pode implicar na melhoria do processo de osteogênese (MORALES, 2016)

No Canadá, um fármaco contendo THC e Canabidiol foi aprovado para o tratamento da dor neuropática central da esclerose múltipla (MOULIN, 2014). O “Food and Drug Administration” (FDA), órgão americano que faz a regulação de substâncias para uso terapêutico entre outras funções, aprovou o uso de dois derivados sintéticos de fitocannabinoides para o tratamento da náusea associada a quimioterapia e para o tratamento da perda de peso associada a síndrome de imunodeficiência adquirida (STROUSE, 2016).

No Brasil, a Anvisa liberou o uso de derivados de fitocannabinoides para o tratamento de crianças com epilepsias graves e de difícil tratamento e para o tratamento de espasmos musculares da esclerose múltipla hoje com outras indicações

de tratamento em avaliação para liberação. Há relatos cada vez mais frequentes da eficácia do seu uso nas síndromes muito graves de epilepsia infantil. Nesses casos, se observou diminuição expressiva no número de crises epiléticas (ROSENBERG, 2015 e REDDY, 2016).

Com estudos mais apurados existe potencial de estender a liberação do uso das substâncias tendo o receptor tipo 2 como alvo, na tentativa de tratamento de doenças osteomusculares, em especial aquelas com déficit de formação óssea e remodelamento, como a osteopenia e osteoporose.

4. OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma doença silenciosa e sistêmica definida pela perda de massa óssea corpórea que aumenta a fragilidade micro estrutural dos ossos e a deterioração do tecido ósseo com consequente fragilidade óssea global. Apesar de passível de profilaxia, a doença afeta em torno de 200 milhões de pessoas no mundo todo sendo um problema de saúde e um problema socioeconômico. Ossos comumente envolvidos em fraturas chamadas por insuficiência - devido a perda do suporte estrutural do osso saudável, são principalmente: porção do corpo das vértebras, ossos do punho como o rádio e a ulna e no quadril o fêmur proximal. Entre estas fraturas as do fêmur proximal são as mais graves e chegam a aumentar a morbimortalidade em 12 a 20% nos dois anos seguidos à fratura, sendo que, entre os sobreviventes e por diversas razões, em torno de 50% são incapazes de manter uma vida independente após tratamento da lesão óssea (RADOMINSKIA et al., 2017). Outros ossos podem estar envolvidos em fraturas por fragilidade porém menos comumente.

Do ponto de vista epidemiológico a osteoporose se torna mais significativa, de maneira geral, com o passar da idade. Em torno de 15% dos caucasianos apresentam a doença aos 50 anos, ao passo em que 70% apresentam a doença após os 80 anos de idade conjurando em torno de 22 milhões de mulheres e 5 milhões de homens portadores de osteoporose nos Estados Unidos da América. Esse número chama atenção quando pensamos na associação da doença com mais de 2 milhões de fraturas anualmente gerando gastos gerais da saúde pública com esses eventos de aproximadamente 25 bilhões de dólares (BURGE et al., 2007). A massa óssea tem pico em torno da terceira década de vida e decai lenta e progressivamente após. Falha na obtenção da estrutura óssea otimizada é um dos fatores que leva a osteoporose e explica porque algumas mulheres apresentam osteoporose pós menopausa enquanto outras apresentam apenas diminuição na massa mineral óssea (DMO) (MORA et al., 2003).

A perda da massa óssea se caracteriza por evolução insidiosa e assintomática onde o primeiro indício da doença, em alguns pacientes, pode ser apresentado através de uma fratura após trauma de baixa energia ou mesmo fraturas espontâneas em casos mais graves da doença. Após as fraturas comorbidades como dor crônica, deformidades residuais e limitação funcional podem ocorrer. A baixa densidade

mineral óssea (DMO) é fator preditivo de fraturas. A cada redução de um desvio padrão o risco de fratura aumenta de duas até três vezes. Outros fatores de risco para fraturas associadas a osteoporose além da idade e sexo feminino, status pós menopausa e etnia branca ou asiática incluem história prévia pessoal de fratura, baixa DMO no colo femural e baixo índice de massa corporal.

A diminuição da qualidade óssea pode ser devido aos níveis abaixo do normal de massa óssea ou mesmo à perda acelerada da mesma em pacientes previamente saudáveis. Pode estar associada aos mecanismos extrínsecos em quando em conjunto com outras doenças - anorexia, etilismo, doenças metabólicas renais ou ovarianas, hiperparatireoidismo, ou mesmo em decorrência de tratamentos para doenças onde classicamente dois fármacos que estão associados a osteoporose são utilizados, sendo eles as corticoterapias prolongadas - uso superior a 5mg ao dia por período superior a 3 meses; e o uso de anticonvulsivantes no tratamento da epilepsia (barbitúricos e fenitoína). Entretanto novas associações tem sido estudadas como a quimio e radioterapias, fármacos inibidores seletivos da receptação da serotonina utilizados em transtornos de humor, inibidores da bomba de prótons de uso comum em doenças do trato gastrointestinal, o uso prolongado dos anticoagulantes como a warfarina e a heparina, modificadores de doença como methotrexate e as terapias antirretrovirais.

São fatores de risco, além da ingesta diminuída de cálcio durante o período de desenvolvimento e crescimento ósseo, o tabagismo e a vida sedentária, especialmente naqueles pacientes em que as atividades de impacto estejam restringidas ou sejam insuficientes (Figura 2) para ajudar na manutenção do *turnover* do metabolismo ósseo.

A prevenção das morbidades da doença inclui a alimentação adequada ou a suplementação de compostos essenciais, principalmente durante o período da infância, bem como evitar uso de medicações que aumentem a taxa de perda óssea. Mudanças nos hábitos de vida também tem importante impacto no tratamento e prevenção da osteoporose e suas complicações, são estas: cessação do hábito tabágico, exercícios de impacto regulares bem como exposição solar diária e

prevenção de quedas, especialmente nos pacientes mais idosos, com debilidade clínica neurológica (ex. Parkinson, Alzheimer, demência, etc.)

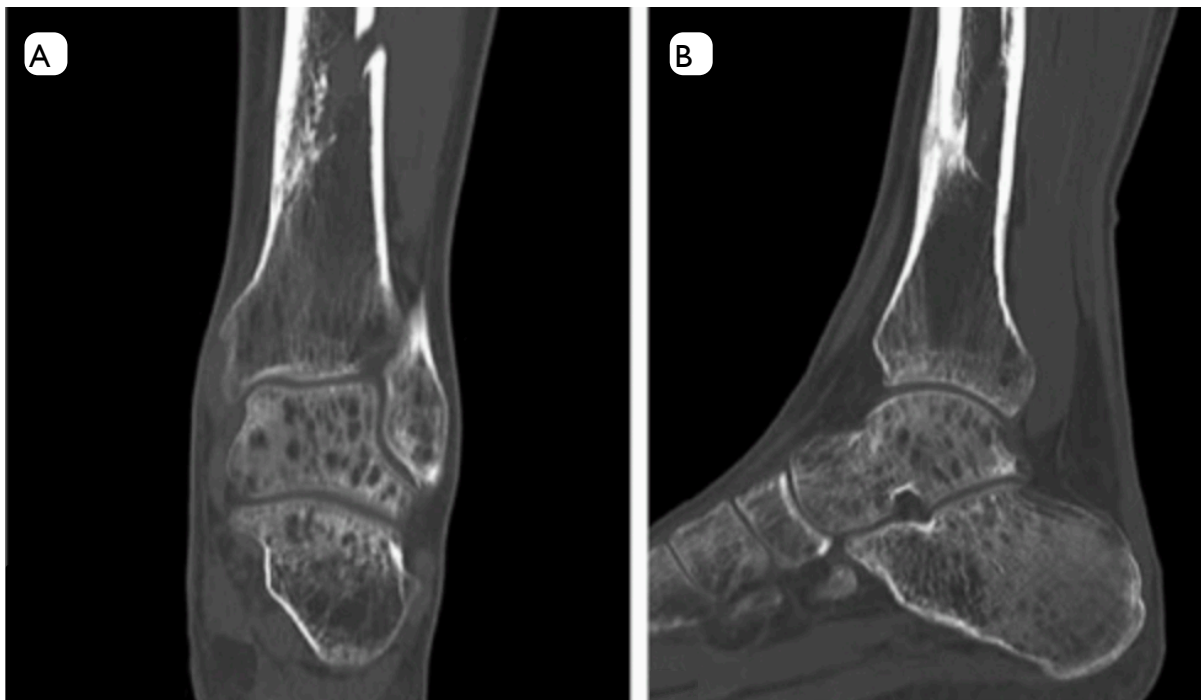


FIGURA 2. Osteopenia por desuso no retopé em cortes coronal (A) e sagital (B) de tomografia computadorizada. Fonte: acervo pessoal, dado de imagem tomográfica coletado com prévia autorização da paciente.

Quanto a avaliação a osteoporose é essencialmente uma doença que necessita de screening para seu diagnóstico, devendo respeitar alguns critérios para sua investigação. Pacientes considerados de alto risco conforme fatores previamente comentados devem ser submetidos a testes clínicos, laboratoriais e de imagem para adequado diagnóstico e acompanhamento. Para todos os pacientes antes de se iniciar qualquer forma de tratamento é recomendada avaliação laboratorial inicial incluindo hemograma completo, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, função tireoidiana e dosagem da 25(OH) vitamina D sérica, calciúria de 24 horas, além de radiografia simples lateral da coluna torácica e lombar e a medida da DMO na coluna lombar, fêmur proximal e rádio distal (RADOMINSKIA et al., 2017). Outros testes específicos podem ser aplicados em busca da causa da osteoporose quando existe suspeita clínica de comorbidades associadas como doenças gastrointestinais, inflamatórias, endocrinológicas, reumatológicas, renais ou pulmonares crônicas que possam

necessitar de tratamento associado para melhora do quadro de baixa massa mineral óssea.

4.1 PATOGÊNISE

O A causa subjacente em todos os casos de osteoporose é em essencial o desbalanço entre a reabsorção e a formação óssea levando a uma alteração na arquitetura e composição óssea, não necessariamente havendo alteração na qualidade do osso remanescente. Os três mecanismos principais pela qual se desenvolve a osteoporose podem ser: aporte inadequado de massa óssea durante infância/puberdade, reabsorção óssea excessiva ou formação óssea inadequada nos processos de remodelamento.

Fatores hormonais têm importante papel na taxa reabsorção óssea. Diminuição do estrogênio - a exemplo o período pós menopausa, aumenta a reabsorção óssea e também diminui a deposição de osso *de novo* que ocorre nos ossos de suporte de carga (membros inferiores e eixo axial - coluna vertebral baixa). Hoje múltiplos fatores tem sido reconhecidos como mecanismos patogênicos que interagem pluralmente para o desenvolvimento da doença portanto para entender a patogênese da doença é necessário primeiramente explorar a fisiologia óssea normal.

4.1.1 FISILOGIA ÓSSEA: COMPONENTES E ESTRUTURA

O tecido ósseo se encontra em remodelamento constante durante a vida. Em geral o metabolismo deste tecido responde à microtraumas de repetição ocorrendo o processo que chamamos de remodelamento ósseo. O remodelamento consiste em reabsorção óssea no locais de estímulo repetitivo seguido por formação e deposição óssea portanto respondendo as demandas funcionais de carga mecânica particulares à cada organismo e dependente de suas atividades. A este processo de balanço fisiológico damos o nome de homeostase óssea e hoje sabemos que a mesma envolve múltiplos eventos celulares e moleculares atuando de maneira coordenada já que normalmente a reabsorção óssea determina deposição/formação óssea sequencialmente (RAGGATT et al., 2010).

Anatomicamente a micro estrutura do osso denso cortical e do osso esponjoso medular é diferente devido a suas funções, porem a composição molecular é bastante

similar. Em ambos os tipos existe uma matriz óssea mineral e outra celular, havendo preponderância dos componentes minerais inorgânicos que podem chegar até 70% do peso do osso e o remanescente representado pela matriz celular - componente com maior flexibilidade responsável pela adaptabilidade a carga mecânica de repetição (HALL, 2011). A resistência do tecido ósseo se dá em duas propriedades: resistência tensil garantida pelas proteínas colágenas e resistência a compressão garantida pela matriz óssea mineralizada. (BONO; EINHORN, 2003).

A matriz óssea é composta em sua maioria por fibras colágenas do tipo I enrijecidas por deposição de cristais de hidroxapatita de cálcio e fosfato de cálcio, sacrificando sua flexibilidade quanto maior for a densidade mineral. Maiores concentrações de cálcio levam a maior resistência a compressão tendo, portanto, o osso via de regra menor resistência às forças torcionais e de cisalhamento. Currey JD. Bones: structure and mechanics (CURREY, 2006). Os proteoglicanos são responsáveis pela resistência a compressão e por inibir a mineralização. Ainda outros três tipos de proteínas estão presentes na promoção da formação e mineralização óssea: osteocalcinina (proteína não colágena produzida por osteócitos e a mais abundante chegando a 10-20% da matriz total), osteonectina (secretada pelos osteoblastos e plaquetas) e osteopontina (proteína de ligação). Além disso na matriz estão presentes fatores de crescimento e citocinas em pequenas quantidades incluindo: IL-1, IL-6, IGF, TGF-beta e as BMPs.

Quanto à composição celular do tecido ósseo podemos citar os osteócitos - células já maduras que abandonam a função de secretar matriz óssea porém tem importante função metabólica na secreção substâncias necessárias a manutenção do tecido; se localizam aprisionados nas lacunas e irradiam canalículos para comunicação entre si (canais de Volkmann e Havers) tendo comportamento de comunicação que se assemelha a sinalização do tecido neurológico. Grande número de osteons por unidade de volume de osso aumentam a quantidade de linhas cimentadas de cada lamela concêntrica e determinam a quebra dos vetores da energia nas fibras colagens mineralizadas com orientações distintas o que limita a propagação de fraturas pela obstrução e divisão entre si da passagem de energia. Os osteócitos são diferenciados no tecido mesênquimal a partir dos osteoblastos e expressam a esclerosina que atua de maneira parácrina como inibidora da formação óssea; a esclerosina é inibida pelo paratohormônio (PTH) e por carga mecânica

(BELLIDO, 2007). Além do osteócito a composição celular são: os osteoblastos e osteoclastos, celular da fisiologia óssea com papéis complementares e opostos.

Derivadas de precursores hematopoéticos os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea em contraposição aos osteoblastos advindos das células mesenquimais responsáveis pela formação e deposição óssea. Estes dois componentes do tecido ósseo são dependentes entre si e ligados ao remodelamento ósseo pelo balanço adequado das suas atividades. Os osteoblastos não apenas secretam e mineralizam o osteóide (matriz óssea) como também parecem regular a ação dos osteoclastos através de mediadores. Osteoclastos realizam ação de reabsorção em processos que tem duração de semanas ao passo em que deposição óssea osteoblástica pode levar alguns meses. Logo qualquer processo que aumente a taxa do remodelamento ósseo resulta em prejuízo líquido de massa óssea à longo prazo (SADHU; HAMPSON, 2011).

4.1.2. FISILOGIA ÓSSEA REGULAÇÃO HORMONAL E METABÓLICA: A HOMEOSTASE DO CÁLCIO E DO FOSFATO

O metabolismo ósseo é uma sequencia complexa de eventos de remodelamento, também chamado de *turnover* ósseo. Para sua preservação estrutural e resistência o tecido ósseo deve estar em constante remodelamento e substituição. São reguladores do metabolismo do tecido ósseo: hormônios como o paratormonio (PTH), calcitonina, hormônios gonadais (como estrogênio e androgênio), hormônios tireoideanos e do crescimento; vitamina D e corticoesteroides; cálcio e fosfato. A regulação desse balanço dinâmico entre ativação de osteoblastos e inativação dos osteoclastos passa pelas vias de sinalização de moléculas como os fatores de transcrição derivados da medula óssea como o RANK-L, VEGF, IL-6; fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), genes *wingless-type* (Wnt), fator de transcrição 2 relacionado à *runt* (RUNX2), antagonista da proteína morfogênica óssea (BMP) a esclerostina (KAMIYA et al., 2008). Quando consideramos a homeostase óssea também falamos sobre balanço e biodisponibilidade do cálcio e fosfatos séricos já que o tecido ósseo tem papel na liberação ou absorção do cálcio sérico.

São propriedades do metabolismo ósseo: a massa e a perda óssea. A massa óssea é a mensuração do total de tecido ósseo presente na idade da maturidade esquelética, estimada cronologicamente em torno dos 14-16 anos para meninas e 18

anos para meninos, com um pico de massa entre os 16-25 anos e maior em algumas descendências como a afro-americana, por exemplo (MENDES et al., 2010). Quanto a perda óssea existe um decréscimo de massa de 0.3 até 0.5% ao ano após a maturidade esquelética. Quanto consideradas mulheres do sexto ao décimo ano após menopausa e que não receberam nenhuma forma de tratamento esse deficit pode chegar até 2 ou 3 por cento da massa (BERGER et al., 2016).

4.1.3 FORMAÇÃO ÓSSEA CANÔNICA

Os ossos são formados por duas vias distintas. A ossificação endocondral é responsável pelo crescimento longitudinal e pela consolidação secundária das fraturas que ocorre através da diferenciação primária das células mesodérmicas em condrócitos que progressivamente são substituídos por osso. Este processo é, portanto, guiado por um arcabouço cartilágneo. A ossificação intramembranosa por outro lado ocorre nos ossos chatos, na osteogênese por distração e na consolidação primária. Ocorre sem uma estrutura cartilaginosa de maneira direta por aposição ou expansão direta do tecido ósseo onde a diferenciação das células mesenquimais é direta para osteoblastos. Em ambos os processos a formação blástica é a mesma já que a síntese da matriz óssea inicia com a produção de colágeno tipo I via osteoblastos que serve de andaime para deposição de outros componentes da matriz, como exemplo a hidroxiapatita.

É importante salientar que a ação dos osteoclastos é dependente de sinalização e a ação dos osteoblastos. Os osteoblastos recebem sinalização para deposição óssea pela ativação das vias inflamatórias (IL-1 e IL-6) moduladas pelo fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1), vitamina D, paratormonio e também por fatores de crescimento como o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), as proteínas morfogênicas do osso (BMPs) e a via de sinalização Wnt - responsável pela diferenciação e proliferação das células blásticas. O paratormonio atua no tecido ósseo resultando em degradação da hidroxiapatita portanto aumentando o cálcio e fosfato séricos. A nível renal o PTH é responsável pela ativação da enzima 1-alfa-hidroxilase responsável pela ativação da vitamina D metabolizando esta na forma do hormônio calcitriol. Quanto aos osteoblastos o PTH tem três ações distintas responsáveis pela *turnover* ósseo: a proliferação dos osteoblastos, o estímulo da expressão do ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e,

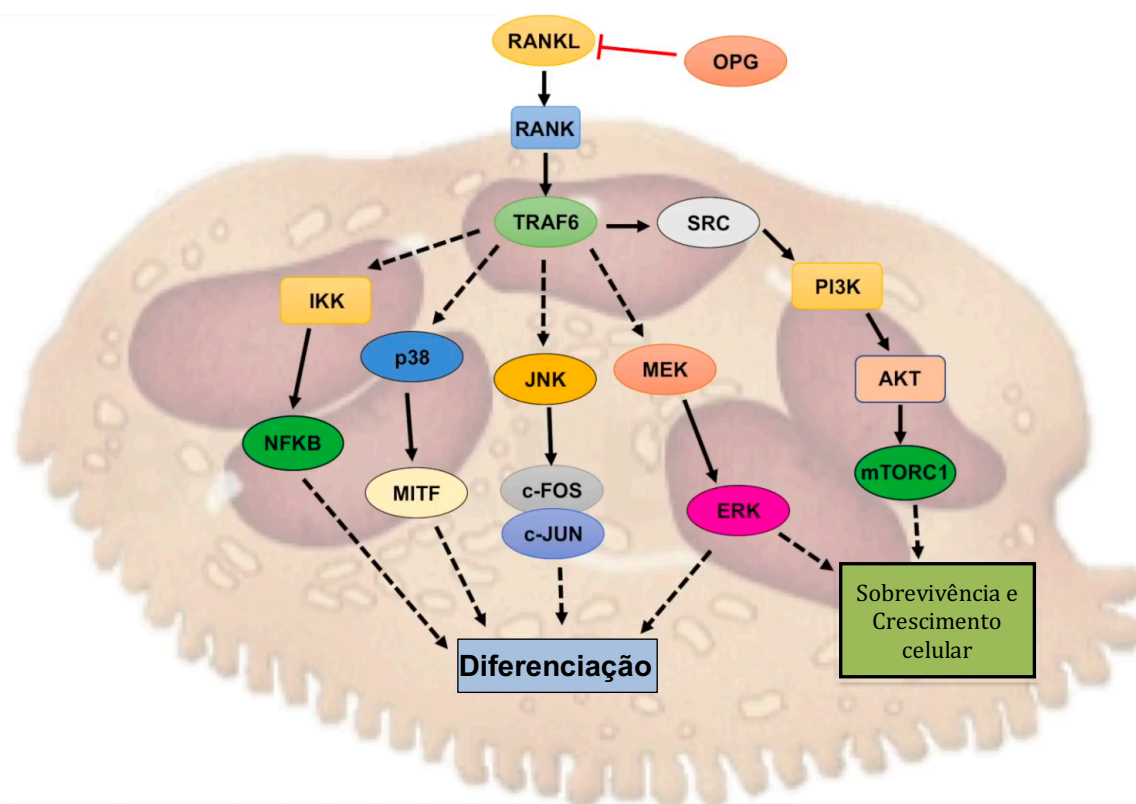
finalmente, feedback negativo na via da osteoprotegerina inibindo a produção da mesma. Calcitriol por sua vez tem ação no osso aumentando a degradação do tecido ao mesmo tempo em que sua tem feedback negativo na paratireoide inibindo a produção de PTH para realizar homeostase do cálcio e do fósforo de maneira adequada. Em contraposição aos efeitos destes, a calcitonina é o hormônio que atua na diminuição dos níveis séricos do cálcio e formação óssea.

A sinalização que ativa o osteoclasto (Figura 3) é proveniente do osteoblasto e ocorre através da via do RANK/RANKL/Osteoprotegerina, mas também por ser uma célula do tipo similar a um macrófago especializado os precursores dos osteoclastos recebem em parte sinalização pela ligação direta do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF). Os osteoblastos tem ação de secreção do colágeno tipo I para estruturação do tecido ósseo e a secreção da enzima fosfatase alcalina, uma hidrolase que remove os grupos fosfato de diferentes moléculas. No tecido ósseo os osteócitos, em maior volume, e os osteoblastos expressam o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) estimulados pelo paratormônio. O RANKL realiza feedback positivo para formação e para ativação de osteoclastos maduros a partir de precursores de osteoclastos através da ligação ao receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) (NAGY; PENNINGER, 2015). A ligação do RANKL ao seu receptor leva ao recrutamento de moléculas como o fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral 6 (TRAF6) e consequente ativação da cascata da MAP quinase (ERK/MAPK), do fator nuclear kappa B (NF-kB) e uma das proteínas da cascata da apoptose c-Jun N-terminal quinase (JNK) envolvidas na via de sinalização cuja expressão final dos genes envolve a osteoclastogênese.

A ativação dos osteoclastos é responsável pela degradação óssea - através da secreção de catepsina K⁺ (degradação do colágeno tipo I, logo da matriz óssea) e anidrase carbônica II, e, portanto, liberação de íons cálcio na circulação com aumento do cálcio sérico. Os osteoclastos ainda são macro regulados pela calcitonina, um hormônio antagonista dos efeitos de outros hormônios como o paratormônio (PTH) e a Vitamina D (calcitriol). O efeito da calcitonina é a inibição dos osteoblastos, a inibição da reabsorção de cálcio e fósforo nos túbulos renais e a absorção de cálcio no intestino.

Finalmente, a osteoprotegerina (ou fator inibidor da osteoclastogênese) também expressada e liberada por osteoblastos tem ação de inibir a gênese dos osteoclastos

atuando na interação entre os receptores RANK e seu ligante. A osteoprotegerina mimetiza a conformação do receptor RANK o que resulta em ligação com moléculas de RANKL as inativando e diminuindo, portanto, a ação de degradação do tecido ósseo pela menor ativação e diferenciação dos osteoclastos. A OPG também é tem aumento quando da ativação pela via do Fator de transformação do crescimento beta ($TGF-\beta$). Correlata a osteoprotegerina a ação dos esteróides hormonais como o estrogênio que também atua na preservação da massa óssea. Estrogenios como o estradiol (E2) regulam a transcrição e expressão da OPG através dos receptores de



estrogênio na superfície de células osteoblásticas (MILLÁN, 2015).

Figura 3. Vias de sinalização para ativação do osteoclasto

A sinalização Wingless Int-1 (Wnt) é um grupo de vias de transdução de sinal celular responsável por, entre outras funções, a regulação do cálcio intracelular na sua via não canônica. A via canônica do Wnt exerce funções como migração celular e proliferação, também tendo importância no desenvolvimento do sistema osteomuscular e na regeneração tecidual, entre outros tecidos, da medula óssea (GOESSLING et al., 2009). A esclerostina, expressada pelos osteócitos, tem um efeito catabólico no osso. Estudos mostram que ela pode desempenhar estes efeitos

por duas vias: ou por antagonizar a BMP7 ou pela inibição da via Wnt, embora os mecanismos pelos quais isso ocorra ainda esteja incertos (KRAUSE, 2010). A expressão da glicoproteína esclerostina é regulada pelos genes SOST e supressão desses leva, portanto, ao aumento da massa óssea, já a esclerostina compete com receptores das BMPs tipo 1 e tipo 2 pela ligação das BMPs com efeito deletério na mineralização das células osteoblásticas. A expressão do gene SOST não foi observada em osteoclastos, sugerindo seu efeito anabólico. Camundongos após terapias gênicas que levaram a super expressão do SOST exibiram baixa massa óssea e diminuição da resistência do tecido como resultado da diminuição das ações dos osteoblastos e subsequente da deposição mineral óssea. Modulação dessa via pode ser alvo terapêutico relevante para as distúrbios metabólicos dos ossos. (WINKLER, 2003).

4.2 CLASSIFICAÇÃO

Por motivos didáticos a osteoporose pode ser separada essencialmente em grupos de pacientes: as osteoporoses primárias juvenil e idiopática - esta última ainda subdividida em osteoporose pós menopausa (tipo I) e osteoporose senil (Tipo II); e as osteoporoses secundárias que incluem doenças que levam a perda da massa óssea de maneira direta ou indireta como por exemplo medicamentosa, genética, congênitas, hematológica, endocrinológicas inflamatórias e neoplásicas. Embora estas classificações não tenham valor prognóstico elas podem ajudar a compreender os mecanismos e a etiologia das alterações do metabolismo normal.

Nos casos de osteoporose do tipo senil os portadores da doença habitualmente tem mais de 70 anos de idade, o osso trabecular é mais afetado do que o osso cortical porém a perda da massa mineral é mais genérica. Neste grupo as fraturas mais comuns envolvem a pelve e o quadril e geralmente há pobre absorção de cálcio. (OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2018)

Entre os pacientes com osteoporose pós menopausa, mulheres por definição, há maior incidência do diagnóstico da doença já entre os 50 e 70 anos. O osso afetado é majoritariamente a massa trabecular e são mais comuns as fraturas do rádio distal e do corpo vertebral. (COSMAN, Felicia *et al*, 2019). O desbalanço no cálcio sérico se dá por diminuição da absorção intestinal desse elemento e aumento da excreção

urinaria, levando a um déficit metabólico. Nessas pacientes também pode ser observado diminuição dos níveis séricos de vitamina D total, embora os níveis de 1,25-dihidroxitamina D possam estar normais.

É importante lembrar que as causas de perda óssea podem se correlacionar aumentando o deficit total final. Não sendo incomum que as causas se sobreponham como, por exemplo, pacientes com doenças hormonais da tireoide em período pós-menopausa.

4.3 ETIOLOGIA DA OSTEOPOROSE

Em condições fisiológicas o *turnover* ósseo encontra-se em equilíbrio de formação e reabsorção óssea. Quaisquer fatores que possa intervir de maneira a desequilibrar esse fino ajuste pode desencadear patologias ósseas como a osteoporose. Esta patologia pode ser causada tanto por uma falha na aquisição de massa óssea durante o pico que ocorre na adolescência e jovens adultos, quanto pela perda acelerada da massa óssea.

Quanto a osteoporose primária juvenil o mecanismo pela qual ocorre ainda não é bem elucidado sendo, também, chamada de osteoporose idiopática juvenil. Na osteoporose idiopática do tipo senil mecanismos passam pela perda progressiva da massa óssea com envelhecimento esquelético e a maior dificuldade na própria absorção do cálcio e sua consequente deficiência. (BERGER, Claudie *et al*, 2019).

Ainda nesta categoria sobre a osteoporose primária pós-menopausa se sabe que o processo de remodelamento ósseo passa pela regulação do estrogênio. Estudos mostram que a perda óssea acelera em mulheres rapidamente nos primeiros anos. A deficiência do estrogênio leva a aumento da expressão do RANKL por osteoblastos mas à diminuição na liberação de osteoprotegerina por estes. Aumento do RANKL leva a recrutamento e aumento da atividade de pro-osteoclastos e também aumento da vida útil dos osteoclastos maduros. Se considerarmos as ações secundárias do estrogênio estudos mostram que ele tem papel importante na perda óssea em homens. A deficiência do estrogen acompanha reabsorção óssea mas também formação óssea inadequada. Tanto osteócitos, como osteoblastos e castos apresentam receptores para estrogênio. Em adição esta classe de hormônios ainda afeta o tecido ósseo de maneira indireta pela ação através de citadinas e fatores de

crescimento locais. O aumento da produção de TGF- β nos estados de produção estrogênica fisiológicos podem manter o equilíbrio através da apoptose dos osteoclastos. Na ausência do estrógeno as células T do sistema imune promovem recrutamento dos osteoclastos, diferenciação e aumento da sobrevivência via produção de interleucinas como IL-1, IL-6 e TNF- α (JILKA et al., 1992).

Em contraste a osteoporose Pós-menopausa associada a aumento da ação dos osteoclastos, a perda óssea que acompanha o avanço da idade está relacionada ao declínio progressivo do fornecimento de osteoblastos em proporção às demandas do esqueleto senil. Sabemos que o remodelamento ósseo constante é a garantia da qualidade e da quantidade óssea adequada. A cada terço de década de vida os processos de reabsorção excedem os processos de formação óssea levando a osteopenias, nos casos severos de desbalanço grave levando à osteoporose. Mulheres podem perder 30-40% do osso cortical e até 50% de perda do osso trabecular nos estágios de idade avançada. Em contraposição os homens perdem apenas 15-20% do osso cortical e 25-35% do osso trabecular.

Quanto às etiologias secundárias da osteoporose os processos ocorrem de acordo com a alteração que a doença de base gera no metabolismo direto ou indireto do tecido ósseo. A deficiência de cálcio e vitamina D, por exemplo, podem ocorrer por perda da habilidade intestinal de absorção do cálcio devido à idade, em casos mais graves, levando até o hiperparatireoidismo. A menor disponibilidade de cálcio sérico leva à síntese de PTH que tem como consequência a degradação óssea para liberação de cálcio e fósforo para corrente circulatória.

Sosa e colaboradores e Migliaccio e colaboradores demonstraram que o tratamento com metilprednisolona induz a apoptose de osteoblastos e osteócitos o que reduz a formação óssea sendo o uso crônico de corticoides uma das causas para diminuição da densidade mineral óssea.

4.4 DIAGNÓSTICO

Por ser uma doença cuja primeira manifestação podem ser as fraturas ósseas por insuficiência o diagnóstico da osteoporose passa pela triagem dos pacientes com ou sem fatores de risco para doença sendo o *screening* da doença essencial para o diagnóstico (SCHNATZ et al., 2011). Fatores que sugerem a investigação incluem:

mulheres acima de 65 anos, homens acima de 70 anos, menopausa precoce, historia de fratura por fragilidade/insuficiência óssea, caucasianos e portadores de doenças que afetam o metabolismo ósseo.

4.4.1 EXAMES DE IMAGEM

O padrão ouro para diagnóstico da osteoporose por não ser invasivo e de maior acessibilidade ainda é a densitometria óssea, com o método DEXA-scan (dual-energy x-ray absorption) que traz como resultado a densidade óssea baseada na parametrização de densidade de imagens de duas regiões anatômicas: coluna vertebral lombar e quadril (GUGLIELMI et al., 2011). Radiografias convencionais podem ser usada para avaliação semiquantitativa, com menor precisão. Além das formas de densitometria a tomografia computadorizada quantitativa (QCT) também pode fazer parte da avaliação diagnóstica.

O espaço para exames invasivos como a biópsia óssea vem diminuindo conforme a tecnologia da informação se alia a física médica. O desenvolvimento e a consolidação das ferramentas de imagem mais sofisticada permitem diagnósticos menos invasivos, mais rápidos e seguros.

4.3.2 LABORATORIAIS

A avaliação laboratorial da osteoporose se refere mais ao acompanhamento e o diagnóstico de doenças que geram osteoporose secundária do que propriamente ao diagnóstico da doença. Embora sejam usados para estabelecer marcadores metabólicos de base.

A avaliação inclui, entre outros, a aferição dos níveis séricos de: 25-Hidroxivitamina D, cálcio, fosfato e fosfatase alcalina. Atualmente marcadores de formação óssea incluem os níveis séricos de procolágeno tipo I (C-terminal/N-terminal): C1NP or P1NP; osteocalcitonina e fosfatase alcalina óssea específica. Os marcadores de reabsorção óssea são os níveis séricos de sialoproteína óssea e fosfatase ácida resistente ao tartarato (FART), bem como os marcadores urinários: hidroxiprolina, piridinolina, deoxipiridinolina livre, colágeno tipo I cross-linked N-telopeptídeo e colágeno tipo cross-linked C-telopeptídeo (SHETTY et al., 2016). Para as causas secundárias da osteoporose outros exames devem ser explorados

conforme a suspeição clínica.

4.5 TRATAMENTO

O tratamento da osteoporose visa a prevenção de fraturas que podem ser debilitantes para os pacientes. Atualmente é oferecido em duas modalidades uma conservadora e outra com intervenção medicamentosa. Para os pacientes em que a profilaxia não for suficiente, ou seja, fraturas por fragilidade ocorreram os tratamentos conservador e cirúrgico são diretamente dependentes da lesão óssea subjacente.

4.5.1 NAO-FARMACOLÓGICO

A prevenção da osteoporose incide sobre medidas que evitem o início precoce ou diminuam a sua progressão. Na modalidade não farmacológica estão bem estabelecidas as correções dos fatores de risco modificáveis e a prevenção das fraturas.

Quanto aos fatores de risco modificáveis podemos citar: cessação do hábito tabágico, etilismo e ambientes que aumentem o risco de quedas. Ainda no tratamento não farmacológico é importante citar o aporte nutricional adequado ou a suplementação dos déficits de cálcio e vitamina D, bem como a exposição solar para adequado metabolismo da vitamina D. Diretamente correlacionadas as fraturas está o aporte adequado de proteínas para manutenção do sistema muscular. Outros micronutrientes como zinco, silício, magnésio, vitamina K, E, B6 e B12 também parecem estar associados a efeitos protetivos do sistema osteomuscular. (NUTI et al., 2019). A suplementação de cálcio é recomendada para adultos em doses de 1000mg ao dia até a idade de 50 anos, após 1.200mg ao dia. Administração de Vitamina D concomitante em doses de 800-1000 unidades internacionais nessa mesma população visando níveis séricos mínimos de 30ng/ml garante a absorção adequada do cálcio (Calcium and Vitamin D: National Osteoporosis Foundation, 2018)

O tecido osteomuscular depende da manutenção biomecânica do estímulo. É sabido que períodos prolongados de imobilização por qualquer razão leva a perda de massa óssea, portanto a manutenção do estímulo apropriado através da atividade física em níveis adequados é de extrema importância. Exercícios regulares de baixo

ou alto impacto aeróbicos e atividades para fortalecimento muscular são recomendadas (MOREIRA et al., 2014).

4.5.2 FARMACOLÓGICO

Medicações disponíveis para o tratamento da osteoporose podem ser divididas em dois grupos: as antireabsortivas ou anticatabólicas e as anabólicas. Todos os fármacos destas categorias demonstraram eficácia na redução das fraturas vertebrais por fragilidade, porém poucos casos de prevenção de outras fraturas são relatados (NUTI et al., 2019). Boa parte das terapêuticas farmacológicas disponíveis hoje trabalham apenas contra a atividade catabólica dos osteoclastos não tendo, portanto, consequências diretas no metabolismo dos osteoblastos (RUSSOW et al., 2018).

4.5.2.1 FÁRMACOS ANTI CATABÓLICOS

Diversos fármacos constituem a classe dos medicamentos anti catabólicos para o tratamento da osteoporose. Dentre estes podemos citar: os bifosfonatos (BP), os estrógenos e os moduladores dos receptores do estrogênio (SERMs) e anticorpos monoclonais como o denosumab.

Os bifosfonatos são análogos sintéticos dos compostos do pirofosfato capazes de atuar seletivamente nas superfícies ósseas durante o remodelamento através do bloqueio da atividade osteoclástica reduzindo o *turnover* ósseo e aumentar a densidade mineral óssea. A eficácia de fármacos como o alendronato e o risendronato para prevenção tanto de fraturas vertebrais quanto outras por fragilidade, incluindo as fraturas do quadril, já está sedimentada em múltiplos estudos com acompanhamento longitudinal. Em estudos o cognato ibrandronato com uma dose de 2.5mg ao dia é apenas efetivo na prevenção das fraturas por fragilidade das vértebras.

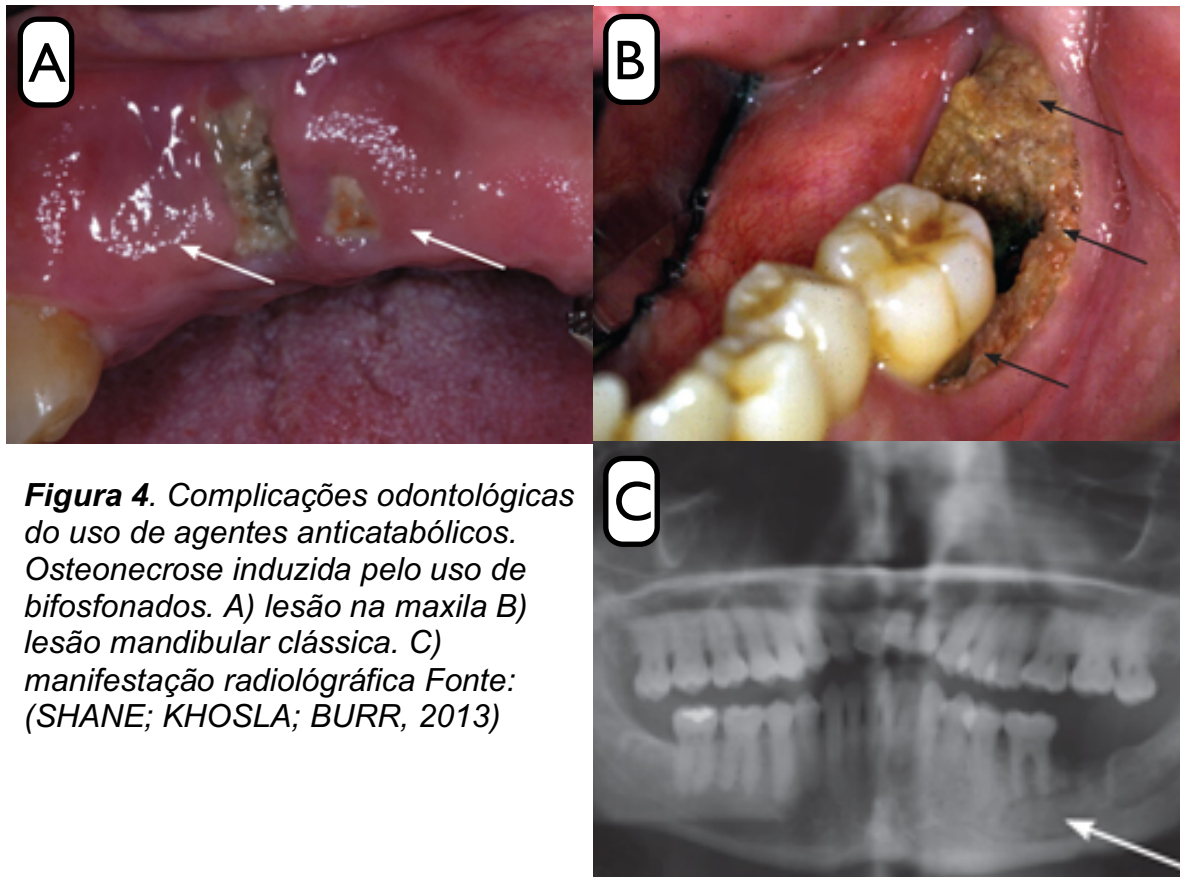


Figura 4. Complicações odontológicas do uso de agentes anticatabólicos. Osteonecrose induzida pelo uso de bifosfonados. A) lesão na maxila B) lesão mandibular clássica. C) manifestação radiológica. Fonte: (SHANE; KHOSLA; BURR, 2013)

O último fármaco dessa classe e, também o mais recente, é o ácido zolendrônico registrado para tratamento da osteoporose por comprovar eficácia após 3 anos de uso para todas as fraturas por fragilidade e com a vantagem de administração única endovenosa de 5mg ao ano (GUGLIELMI, Giuseppe *et al.*, 2011).

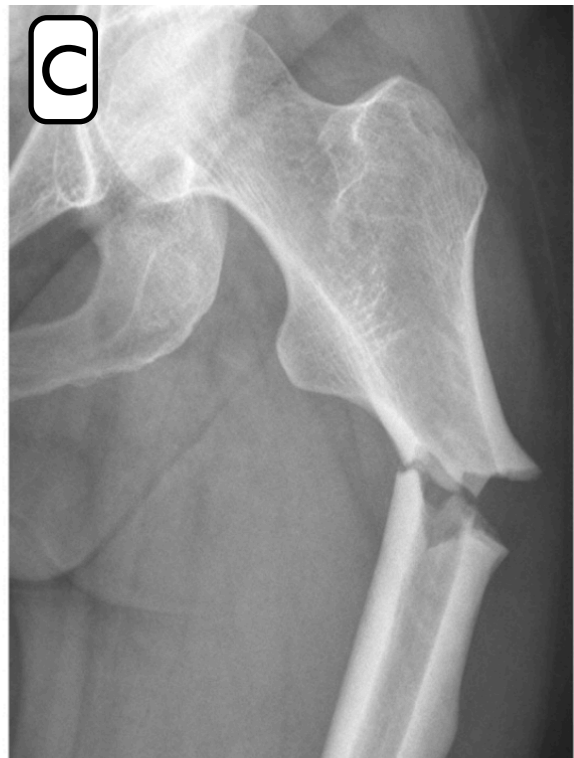
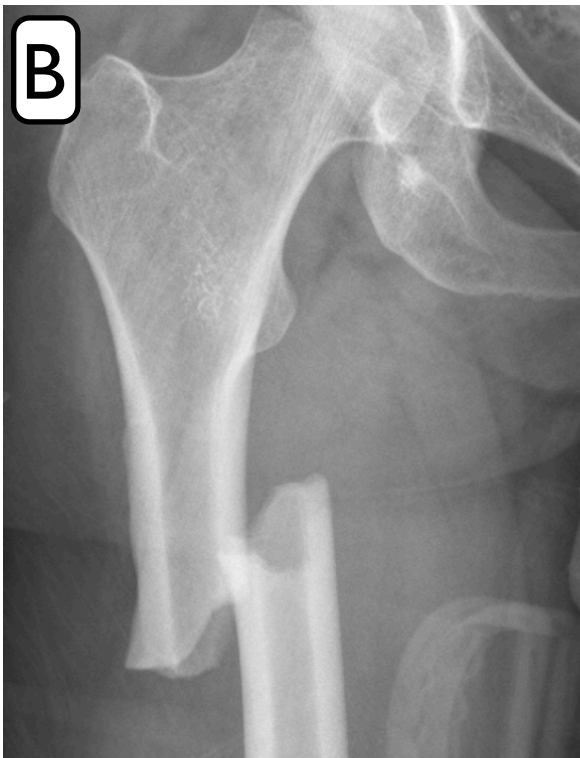
Embora efetivos para o aumento da massa óssea alterações paradoxais ocorrem nos pacientes portadores de osteoporose entre outros efeitos adversos dos BPs. Síndromes tipo gripais com duração de 1 até 3 dias com febre e mialgia difusa foram reportados em pacientes em uso de BPs. Fraturas femorais atípicas reportadas em incidências que variam de 3.2 até 50 casos por 100.000 usuários ao ano são uma



Figura 5. Alterações da morfologia óssea induzida por bifosfonados.

A) Espessamento cortical lateral atípico do fêmur proximal, Fonte: MULGUND et al. (2011).

B,C) Fraturas atípicas denotadas por traço horizontal e esporão ósseo medial em pacientes com menos de 60 anos e traumas de baixa energia, quedas da própria altura. Fonte: acervo pessoal, exames radiológicos coletados com prévia autorização dos pacientes



complicação importante do uso dessas medicações. Tal qual a osteonecrose da mandíbula (Figura 4) com menor frequência porem chegando a 1 caso em 10.000 pacientes que utilizam essa terapia (SADHU, Sunita K; HAMPSON, Geeta, 2019).

A revisão constante e reavaliação do real risco de fraturas nos pacientes

usuários de BPs deve ser respeitada com o guia de reconsiderar o risco-benefício dos pacientes em uso do alendronado, ibandronado e risendronado após 5 anos de uso e após 3 anos de uso do zolendronato visando sempre diminuir as chances das complicações do seu uso a longo prazo. (Figura 5)

A perda quantitativa cumulativa do estrogênio com o envelhecimento e a sintomatologia desse evento levaram ao desenvolvimento das terapias de reposição hormonal para mulheres na menopausa e na pós menopausica (COSMAN, Felicia *et al.*, 2019). Pacientes em tratamento com estrogênio isolado ou combinado à progestina ou o uso da tibolona reduzem o *turnover* ósseo e aumentam a massa óssea, já que a perda do estrogênio parece estar associada a um atraso na apoptose dos osteoclastos levando a um déficit na densidade óssea. A eficácia do estrogênio no que tange a profilaxia das fraturas é confirmada por múltiplos estudos clínicos randomizados e estudos observacionais maiores porém, apesar desse efeito positivo nas fraturas, o uso dessas terapias hormonais está associado a aumento no risco do câncer de mama, infartos e eventos tromboembólicos. Com base nisso as terapias de reposição hormonais não estão mais indicadas na prevenção da osteoporose.

Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs) são compostos sintéticos capazes de se ligar ao estrogênio e produzir efeitos agonistas no osso e função hepática. Hoje descritos e em uso estão o raloxifeno e o bazedoxifeno. Esses fármacos parecem reduzir a incidência de novas fraturas vertebrais e não vertebrais bem como as fraturas femorais - no uso do raloxifeno.

A calcitonina comercializada como Fortical® nos Estados Unidos foi aprovada para uso em 1986 como medicação injetável e em 1995 com formato de *spray* nasal. Seu mecanismo teórico era o aumento do nível de cálcio mineralizado ósseo em contrapartida a diminuição do cálcio sérico. Em 2012 a *European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use* mudou a recomendação para contra-indicação do uso da calcitonina como terapêutica primária para o tratamento da osteoporose após determinar um risco de 2,4% de desenvolver câncer (QASEEM *et al.*, 2017). A calcitonina é hoje utilizada como terapêutica secundária por mostrar benefício para controle da dor causada por fraturas vertebrais - *crush fracture syndrome*, e apenas por tratamentos de curto período visando minimizar os riscos. O comitê também recomendou o uso da calcitonina para prevenção de perda óssea associada a imobilizações com uso por duas até quatro semanas, a hipercalcemia causada por câncer ou pacientes portadores de doença de Paget que não respondem

ao tratamento usual, sendo restrito o uso por até três meses visando minimizar os efeitos adversos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2020).

Por fim o denosumab - alcunha do anticorpo monoclonal já aprovado pelo FDA (agencia nacional de controle de saúde e serviços humanos americana), atua como anticorpo ao RANKL. Primeiramente introduzido para tratamento de pacientes pós menopáusicas com osteoporose, o denosumab está na terceira fase do FDA para avaliação do uso clínico já sendo observados três efeitos importantes: redução do *turnover* ósseo, redução das fraturas na população portadora de osteoporose pós menopausa e aumento da massa densidade mineral óssea (CASTELLANO et al., 2011).

4.4.2 FÁRMACOS ANABÓLICOS

Classe com menor número de compostos atualmente liberados para uso no tratamento da osteoporose pelo FDA são os fármacos anabólicos, ou seja, aqueles que estimulam a formação óssea. A teriparatida é uma forma recombinante do hormônio da paratireoide (PTH) que estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea porém com efeito predominante sobre a neoformação óssea, ligando-se com afinidade semelhante à do PTH endógeno ao receptor ligado à proteína G (CARTER et al., 1999). Demonstrou-se capaz de reduzir o número de fraturas vertebrais e de fraturas não vertebrais em mulheres pós menopausa. Entretanto a recomendação atual é que não se ultrapasse o uso durante 24 meses e seu uso está indicado como segunda linha para prevenção em pacientes com osteoporose e com alto risco avaliado para fraturas ou que não desejam responsivas ao uso das medicações antireabsortivas/anticatabólicas (JIANG et al., 2009).

No final de 2017 o FDA aprovou uma proteína análoga relacionada ao paratormônio sob nome comercial de Tymlos[®], o abaloparatide. Essa medicação, também injetável, simula os efeitos do PTH no organismo estimulando a formação óssea. Estudos do laboratório farmacêutico mostram superioridade do abaloparatide sobre a teriparatida com uma diminuição do risco relativo de fraturas vertebrais de 86% e de 86% para fraturas não, embora estudos independentes mostrem que a diminuição desse risco seja similar entre o abaloparatide e a teriparatida sendo de aproximadamente 2-4% (MOREIRA et al., 2017). Ambas as medicações devem ser reavaliadas quanto ao risco *versus* benefícios após dois anos de uso devido ao

aumento de desenvolvimento de osteossarcoma em usuários da medicação - avaliado em modelos animais. Os efeitos destas medicações podem ser observados na figura 6.

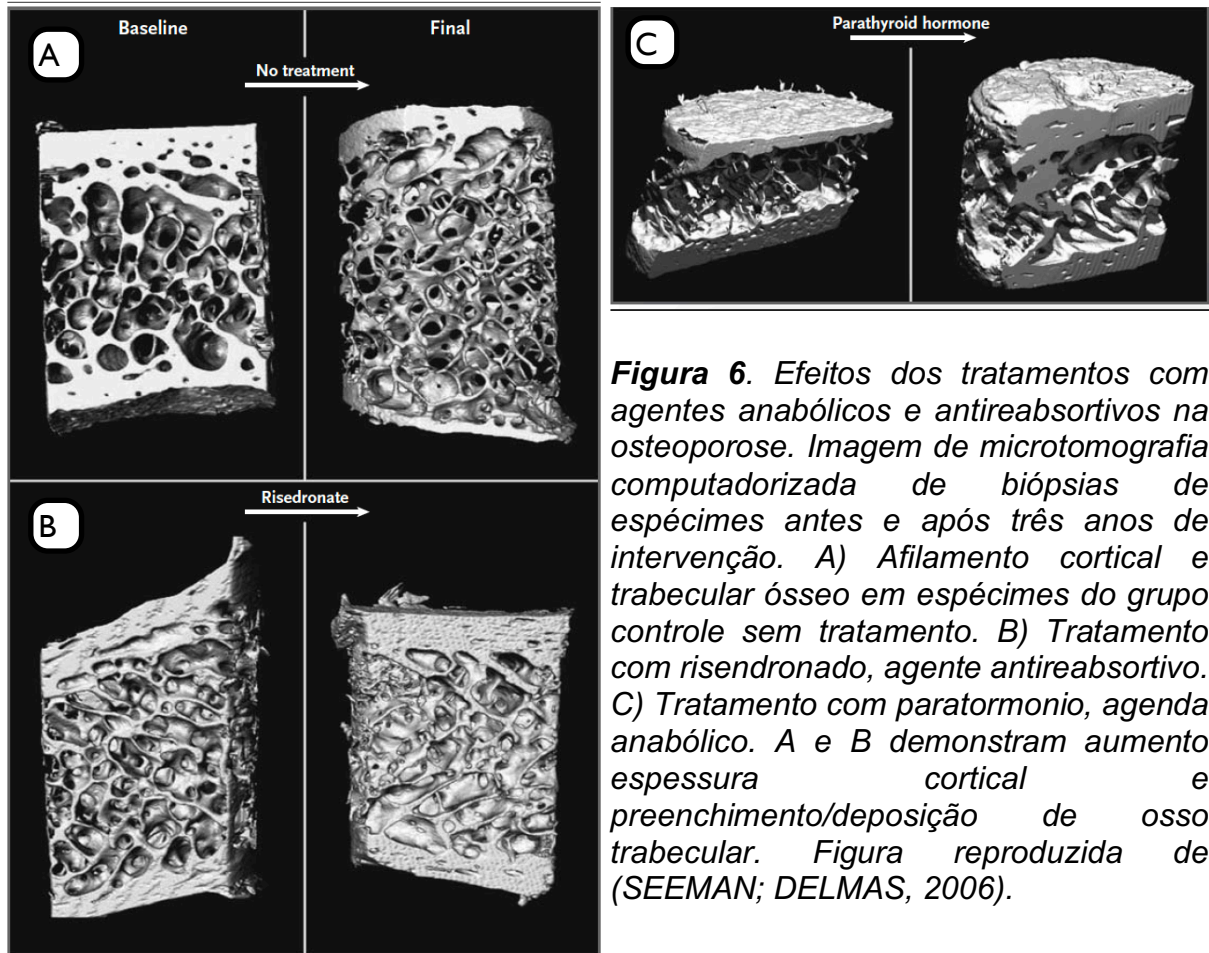


Figura 6. Efeitos dos tratamentos com agentes anabólicos e antireabsortivos na osteoporose. Imagem de microtomografia computadorizada de biópsias de espécimes antes e após três anos de intervenção. A) Afilamento cortical e trabecular ósseo em espécimes do grupo controle sem tratamento. B) Tratamento com risendronado, agente antireabsortivo. C) Tratamento com paratormonio, agenda anabólico. A e B demonstram aumento espessura cortical e preenchimento/deposição de osso trabecular. Figura reproduzida de (SEEMAN; DELMAS, 2006).

A última classe de drogas anabólicas disponíveis no mercado atualmente é o inibidor da esclerosina sob nome do composto Romosozumab. A esclerosina é uma proteína que ajuda a regular o metabolismo ósseo, produzida por osteócitos ela inibe a formação óssea. A indicação do Romosozumab é para uso em mulheres com osteoporose pós menopausa que tenham alto risco para fraturas por fragilidade. O Romosozumab se liga a esclerosina impedindo que esta bloqueio a via de sinalização para formação óssea. O resultado é um aumento na massa óssea e, em menor grau, a diminuição da reabsorção. Seu uso deve ser descontinuado após 1 ano devido a redução na sua eficácia como e seus efeitos adversos mais comuns tem menor gravidade como dor articular e cefaléia. Embora raros alguns pacientes podem

desenvolver osteonecrose da mandíbula e o risco cardiovascular para eventos isquêmicos possa se elevar (COSMAN et al., 2016). É importante lembrar que a suplementação de vitamina D e cálcio como terapia adjuvante é essencial para o funcionamento de todos os agentes anabólicos como terapia para osteoporose.

4.4.3 ALTERNATIVOS/CANABINOIDES

Terapias disponíveis para tratamento da osteoporose como as descritas anteriormente possuem efeitos adversos que limitam sua eficácia e segurança. Por esta razão nas últimas décadas terapias novas e novas drogas vem sendo buscadas. O estudo da patofisiologia da osteoporose encorajou que pesquisadores tenham como alvo partes das vias de formação ou reabsorção óssea sendo os alvos mais modernos: a osteoprotegerina, os inibidores da quinase c-src, antagonistas da $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ integrina, inibidores da catepsina K, dos canais de cloreto e nitrato. Em estudo seguem os anticorpos contra a esclerosina e os agonistas endocanabinoides (BHUTANI; GUPTA, 2013).

Endocanabinoides e seus receptores vem sendo estudados pela sua expressão nos tecidos periféricos, inclusive no tecido mieloide e ósseo. Os receptores CB1 e, majoritariamente, CB2 estão envolvidos na regulação da formação óssea e diferenciação osteoblástica junto à outros mecanismos previamente descritos. Células ósseas apresentam receptores CB1 e CB2, bem como canais TRPV1 e produzem localmente os endocanaendocanabinoidesinoies AEA e 2-AG e as enzimas envolvidas em sua síntese e degradação. O receptor CB2 atua como indutor da deposição de matriz óssea enquanto TRVP1 e CB1 são inibidores da sinalização osteogênica. Em 2008 Bab e Ofek demonstraram que camundongos deficientes em receptores CB2 tinham fenótipo normal ao nascimento porem sofriam uma redução da massa óssea com o passar dos anos. O agonista CP55940 dos receptores CB1 e CB2, tal como o agonista HU308 seletivo ao receptor CB2 mostraram estimular e realizar a diferenciação dos tecidos mieloides em precursores osteoblásticos melhorando a formação óssea em culturas *in vitro* (SOPHOCLEOUS et al., 2009). Em contrapartida o tratamento com agonistas inverso e antagonista AM251 faz supressão do numero de osteoblasto através da ação nos receptores CB1. Estudos clínicos randomizados ainda são necessários para avaliar a real eficácia destes tratamentos como escolha terapêutica factível (IDRIS et al., 2009).

CB1 exerce funções dependentes da idade na regulação da massa óssea através da diferenciação de osteoclastos e das células do estroma mesênquima com potencial de diferenciação para osteoblastos ou adipócitos. Idris e colegas foram os primeiros a reportar que a inativação da expressão do receptor CB1 resultava em aumento da densidade mineral óssea na medula de camundongos, mas esses desenvolviam osteoporose associada a idade devido ao acúmulo de adipócitos no tecido medular ósseo (IDRIS et al., 2008), (BAB et al., 2008).

Em 2005 Karsak e colegas demonstraram que o polimorfismo no gene que codifica o receptor CB2 está fortemente associado a perda óssea em uma população de pacientes pós menopáusicas. Esse polimorfismo afeta a expressão do CB2 e a atividade está significativamente associada às formas mais graves da osteoporose por indução hormonal.

A interrupção da função gonadal na pós menopausa parece retardar a apoptose dos osteoclastos mas não dos osteoblastos induzindo a uma perda óssea progressiva que, surpreendentemente, não parece se beneficiar dos tratamentos de reposição hormonal (MANOLAGAS et al., 2013).

A modulação do sistema endocanabinoide e endovaniloide podem limitar os efeitos do uso crônico de glicocorticoides na massa óssea. Migliaccio sugere que o uso de antagonistas CB1 podem ser usados para prevenir osteoporose induzida por corticoide em pacientes jovens porém deve ser evitado nos pacientes mais idosos. Um estudo ratificou que a metilprednisolona inibe CB2 em camundongos, possivelmente pela inibição da via da proteína quinase C Beta II, levando a indução da superativação dos osteoclastos (MIGLIACCIO et al., 2007), (BELLINI et al., 2017). Estudos com agonistas seletivos do CB2 (HU308) mostra a inibição do complexo RANKL e da formação de osteoclastos em modelos RAW 264.7 *in vitro* (MIGLIACCIO et al., 2007), (ROSSI et al., 2019).

4. JUSTIFICATIVA

A osteoporose e a osteopenia são as doenças ósseas metabólicas mais comuns no nosso meio. Cada vez mais se observa precoce perda de massa óssea corporal tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. A doença atinge cerca de 200 milhões de pessoas no mundo todo e tem como associação aproximadamente 1,5 milhões de fraturas a cada ano, sendo estas por insuficiência ou traumas de menor energia (BURGE, Russel *et al.*, 2007)

A doença é predominante nas mulheres acima de 45 anos, não mostrando diferenças significativas entre as classes econômicas. Os tratamentos farmacológicos atuais disponíveis não estão isentos de complicações maiores como fraturas atípicas, osteonecrose da mandíbula, disfagia, esofagite, câncer endometrial, hiperplasias e cânceres uterinos, artralgias e alterações eletrolíticas (em especial hipercalcemia). Compreendendo o funcionamento deste importante receptor para o metabolismo ósseo talvez seja possível utilizá-lo para tratamento adjuvante ou mesmo como terapia isolada no tratamento do déficit de massa óssea prevenindo as complicações do mesmo.

O ano de 2015 marcou a expressão do receptor CB2 nos osteoblastos humanos diferenciados de linhagem celular da medula óssea de doadores saudáveis. Foi também observado que o estímulo do CB2 aumenta atividade osteoblástica humana. Esses estudos provaram que os receptores CB2 tem função protetiva no metabolismo ósseo e, portanto, torná-los alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos poderia ser benéfico para as populações portadoras tanto da osteoporose quanto de outras doenças metabólicas ósseas (ROSSI *et al.*, 2015).

As informações estruturais da proteína são importantes no auxílio para o estudo das funções da proteína, da dinâmica e interações com seus ligantes e até mesmo interações com outras proteínas. A resolução através da cristalografia é um processo longo, complexo e bastante custoso que permite encontramos com variada qualidade a estrutura da proteína estudada. No caso das proteínas de membrana, em especial dos receptores ligados a proteína G, pode haver importante atividade basal mantendo essas proteínas em movimento mesmo sem ligantes. Estudos sugerem que há flexibilidade estrutural importante desses receptores, sendo relevante o entendimento das mudanças conformacionais que ocorrem quando do complexo proteína-ligante ocorre para desenvolvimento mais acurado de fármacos compatíveis com a estrutura. (CHANG, *et al.*, 2016) Portanto quando

consideramos as simulações *virtual screening* das pequenas moléculas através do software molegro virtual database (MVD) o CB2 com estrutura já resolvida é fundamental para acurácia dos resultados de congruência entre ligantes possíveis e sítios de ligação, embora a elevada complacência estrutural dos receptores de canabinoide potencialmente dificultem a avaliação dos resultados. Protein Database (PDB): 5ZTY.

5. HIPÓTESE

Através do uso das estruturas cristalográficas já resolvidas e verificadas disponíveis na base de dados PDB será possível avaliação de moléculas passíveis de ligação ao sitio ativo do receptor canabinoide 2.

5.1. OBJETIVO GERAL

Explorar as ferramentas da bioinformática para testar sua eficiência na simulação de ligações do receptor de canabinoide 2 e moléculas com potencial bioativo ou biomodulador.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Explorar uma biblioteca de pequenas moléculas - que apresentem massa molecular inferior a 700 Daltons e testar sua ligação contra o Receptor Canabinoide 2. Elaborar um modelo computacional para previsão de afinidade (constante de ligação). Utilizar esse modelo para testar possíveis drogas para tratamento da osteoporose através da modulação dos receptores canabinoide do tipo 2.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

O foco do presente trabalho é a elaboração de um modelo computacional para a predição de afinidade de potenciais fármacos que se ligam de forma não covalente ao receptor CB2. Usamos as simulações de *docking* molecular e a modelagem por métodos de aprendizado de máquina para o desenvolvimento de uma função escore específica para o receptor CB2. Para uma melhor apresentação das metodologias usadas no desenvolvimento desta dissertação, ilustramos as principais etapas da metodologia no fluxograma da figura 7. Na sequência descrevemos cada etapa do fluxograma da figura abaixo.

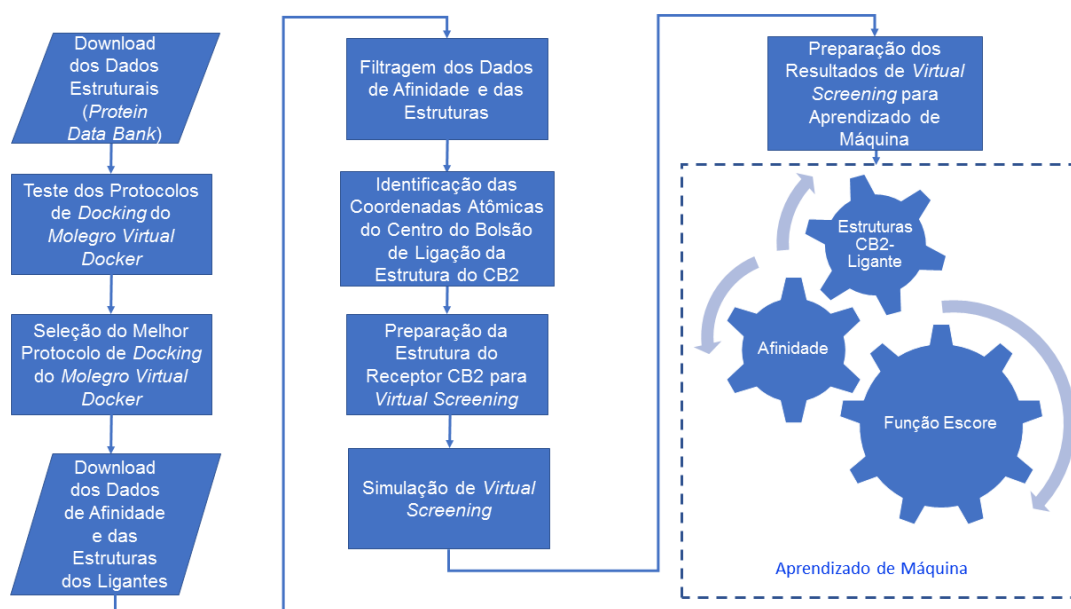


Figura 7. Fluxograma com todas as etapas usadas para o desenvolvimento de funções escore específicas para o receptor CB2. Inicialmente são captados os dados estruturais da proteína estudada (CB2) no Protein Data Bank (PDB), após através do uso o Mollogro Virtual Docker (MVD) são testados os protocolos de docagem para escolha do melhor. Após seleção do protocolo é realizado o download de estruturas ligantes e sua afinidade pela proteína. A filtragem desses dados exclui estruturas repetidas ou com informações ausentes para então serem identificadas as coordenadas atômicas do bolso de ligação da proteína CB2. A estrutura proteica é preparada para realização do Virtual Screening e a simulação é então realizada. A preparada e análise dos dados de screening permitem a montagem de um modelo computacional através da aprendizagem de máquina que resulta em uma função escore padronizada de maneira específica a proteína CB2, permitindo estudos futuros de afinidade de outros ligantes com maior acurácia.

6.1 DOWNLOAD DOS DADOS ESTRUTURAIS

A base de dados *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000, 2002; WESTBROOK *et al.*, 2003) é a principal fonte de informações sobre a estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas e seus complexos com ligantes. Atualmente temos mais de 150.000 estruturas tridimensionais depositadas no PDB. Há um vasto espectro de sistemas biológicos disponíveis no PDB, de estruturas simples de peptídeos como a crotamina extraída do veneno *Crotalus durissus terrificus* com 42 resíduos de aminoácidos (FADEL *et al.*, 2005) (código de acesso PDB: 1Z99) à estrutura do vírus da Zika (WANG *et al.*, 2019) (código de acesso PDB: 6JFI) com mais de 157 mil resíduos de aminoácidos na estrutura completa.

A informação sobre a estrutura tridimensional é um fator importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. A descoberta de inibidores da protease do HIV-1 foi possível graças à disponibilidade da estrutura cristalográfica desta enzima e o estudo computacional e cristalográfico de complexo com inibidores (DESJARLAIS & Dixon, 1994; Pintro & Azevedo, 2017). Mesmo quando não é utilizada para o desenvolvimento de um fármaco específico, a informação estrutural do complexo proteína-fármaco possibilita o entendimento aprofundado das bases estruturais para o sucesso de um dado fármaco (CANDURI; AZEVEDO, 2008).

Apesar da resolução da estrutura tridimensional de uma proteína ser possível por algumas técnicas distintas tais como cristalografia por difração de raios X, ressonância magnética nuclear e crio-microscopia eletrônica, a maioria dos dados estruturais sobre complexos envolvendo proteínas e ligantes para os quais dados de afinidade são conhecidos foi obtida por meio da cristalografia por difração de raios X. Dados do PDB de 2017 indicam que mais de 90 % da informação experimental estrutural sobre complexos proteína-ligante foi obtida por cristalografia por difração de raios X (HECK *et al.*, 2017).

No início deste projeto (2018) não havia a estrutura tridimensional do receptor CB2 depositada no PDB, assim, inicialmente, nossa abordagem de estudo foi por meio de modelagem molecular por homologia (UCHÔA *et al.*, 2004; BITENCOURT-FERREIRA & DE AZEVEDO, 2019a), onde usaríamos as coordenadas atômicas do receptor CB1 (HUA *et al.*, 2016) (códigos de acesso PDB: 5TGZ, 5U09, 5XR8, 5XRA) como molde para a modelagem por homologia do receptor CB2. A partir da consulta constante da base de dados PDB, tomamos conhecimento do depósito das

coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica do receptor CB2 (Li *et al.*, 2019) (código de acesso PDB: 5ZTY), de forma que o uso da modelagem molecular foi abandonado. Esta estrutura foi resolvida a partir do uso de cristalografia por difração de raios X a uma resolução de 2,8 Å e mostrou a semelhança estrutural dos receptores CB1 e CB2.

A partir da disponibilização das coordenadas atômicas do CB2, fizemos o download da estrutura tridimensional no formato PDB e usamos as coordenadas do receptor CB2 em complexo com ligante (N-(adamantan-1-yl)-1-(5-hidroxipentil)-4-metil-5-fenil-1H-pirazole-3-carboxamida) (figura 8) para nossos estudos posteriores de simulação computacional de interação de ligantes em potencial com o receptor CB2.

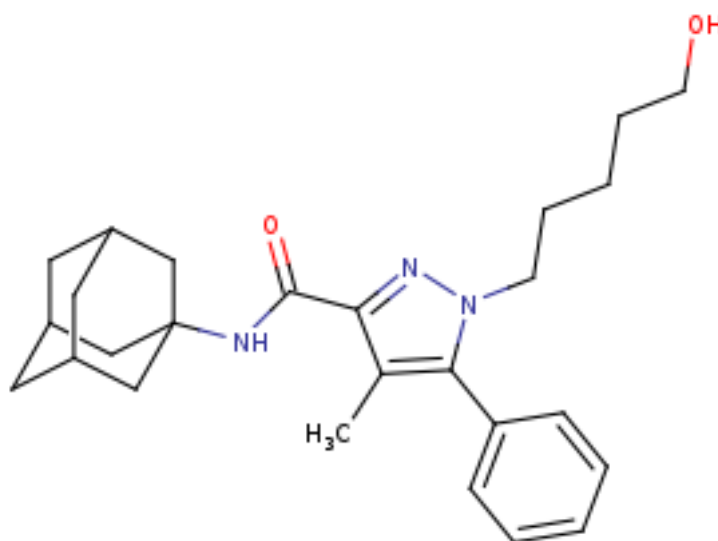


Figura 8. Estrutura molecular do ligante N-(adamantan-1-yl)-1-(5-hidroxipentil)-4-metil-5-fenil-1H-pirazole-3-carboxamida (código do ligante: 9JU). Esta molécula foi cristalizada em complexo com o receptor CB2 (código de acesso PDB: 5ZTY) (Li *et al.*, 2019).

6.2 TESTE DOS PROTOCOLOS DE DOCKING DO MOLEGO VIRTUAL

DOCKER

Docking molecular é a simulação computacional da interação de um ligante potencial com o bolsão de ligação de uma macromolécula biológica (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019b). Para entendermos os aspectos gerais do processo, faremos uso do modelo chave-fechadura, onde o bolsão de ligação da proteína é a fechadura e o ligante a chave. Usaremos no presente texto o termo proteína, mas a fechadura pode ser o sítio de ligação de outra macromolécula como ácido nucleico. A figura 9 ilustra a analogia da chave-fechadura com o sistema proteína-ligante, onde representamos a superfície molecular de um ligante (superfície em verde) encaixado a uma proteína. A superfície molecular da proteína está representada em diferentes cores, com os átomos neutros representados por ciano, os átomos polares negativos por vermelho e os positivos por azul. Vemos claramente o encaixe do ligante no bolsão de ligação da proteína.

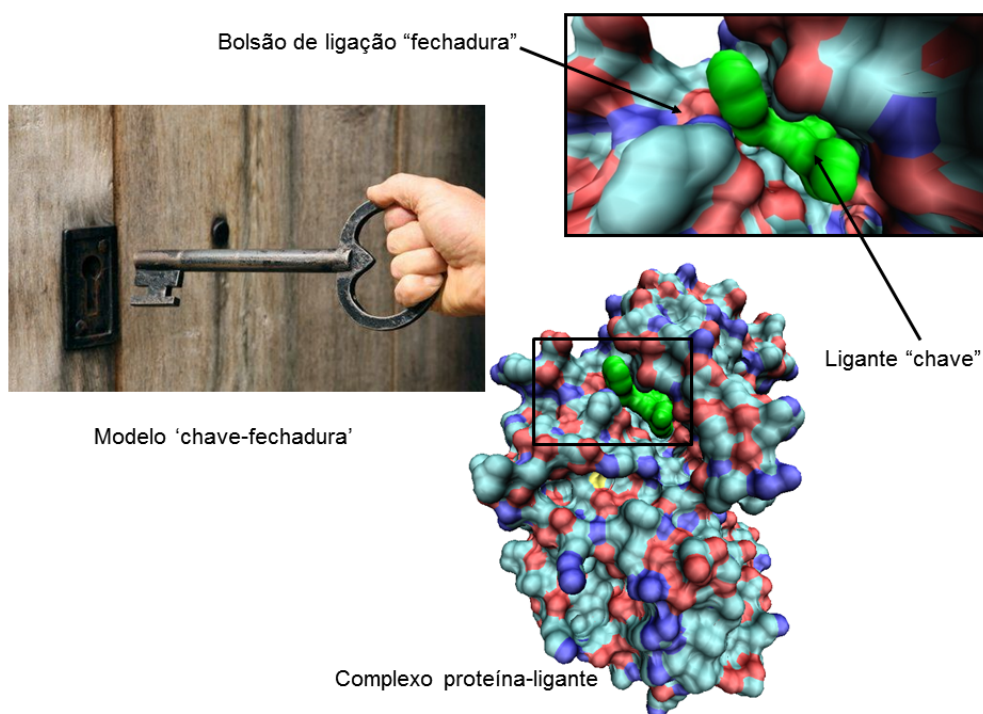


Figura 9. Modelo chave-fechadura. Na figura temos a quinase dependente de ciclina 2 (cyclin-dependent kinase 2) CDK2 humana em complexo com o ligante roscovitine. Nesta analogia consideramos o ligante como a chave e o bolsão de ligação da proteína como a fechadura. Código de acesso PDB: 2A4L (AZEVEDO et al., 1997). Figura gerada pelo programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY et al, 1996).

A partir do modelo chave-fechadura fica fácil visualizar a simulação computacional do *docking*. O processo de *docking* molecular visa encaixar computacionalmente a estrutura do ligante (chave) no sítio de ligação da proteína (fechadura). Todo algoritmo de *docking* molecular possui dois processos básicos. A primeira parte é a busca, normalmente chamado de algoritmo de busca nos programas de *docking* molecular.

Recorrendo à analogia do modelo chave-fechadura, é como se tentássemos encaixar a chave na fechadura com os olhos vendados. Consideramos que estamos próximo à fechadura e vamos procurando por tentativa-e-erro o posicionamento da chave na fechadura. É exatamente que o algoritmo busca faz no processo de *docking* molecular. O outro processo que ocorre no *docking* molecular é a avaliação do encaixe da chave na fechadura. No *docking* molecular essa etapa é feita pela função *escore*. Podemos pensar na função *escore* numa forma computacional de fazermos uma estimativa do encaixe. Quanto melhor posicionada estiver a chave menor será o valor da função *escore*. O desafio do ponto de vista computacional é encontrarmos uma função *escore* que seja computacionalmente rápida de calcular com recursos computacionais modestos.

O programa *Molegro Virtual Docker* (MVD) (THOMSEN & Christensen, 2006; HEBERLÉ & Azevedo, 2011; BITENCOURT-FERREIRA & DE AZEVEDO, 2019c) tem as duas etapas descritas anteriormente, o algoritmo de busca e a função *escore*. Na verdade, o programa MVD dispõe de quatro algoritmos de busca (evolução diferencial, evolução simples, iteração simples, e otimização da colônia de formigas (*ant colony optimization*, ACO)). Os três primeiros algoritmos de busca são baseados nas ideias de Darwin e são chamadas de forma geral de algoritmos evolucionários. O último algoritmo (ACO) usa o paradigma da procura por folhas realizado por certas espécies formigas. Na busca por folhas as formigas deixam uma trilha de feromônios que apresentam uma taxa de evaporação e podem ser reforçados se o mesmo caminho for seguido por outras formigas. Assim, ao se achar um caminho com sucesso, equivalente a uma posição favorável da chave na fechadura, o processo de busca foca na trilha de sucesso. Esses algoritmos de inspiração biológica são coletivamente chamados de algoritmos bio-inspirados (HEBERLÉ & Azevedo, 2011).

No MVD temos a função *escore Moldock Score* que leva em conta interações intermoleculares envolvendo ligações de hidrogênio (BITENCOURT-FERREIRA *et*

al.,2019a), interações de van der Waals (potencial de Lennard Jones)(BITENCOURT-FERREIRA *et al.*, 2019b) e eletrostáticas (BITENCOURT-FERREIRA *et al.*,2019c). Esses termos energéticos são usados para a montagem de uma equação polinomial que leva em consideração as coordenadas x,y,z dos átomos do ligante e da proteína para uma estimativa da energia de ligação, ou um termo chamado pseudo-energia, visto que fisicamente ele não representa a energia e sim uma expressão matemática da afinidade proteína-ligante. Espera-se que quanto menor for a energia calculada (pseudo-energia) para o sistema proteína-ligante, mais próximo a posição do ligante está da posição real.

6.3. SELEÇÃO DO MELHOR PROTOCOLO DE DOCKING DO MOLEGRU VIRTUAL DOCKER

Considerando-se as simulações de *docking* molecular realizadas com o MVD, temos um total de quatro algoritmos de busca e mais quatro funções escore para a estimativa da interação proteína-ligante. Se consideramos que podemos ou não considerar a participação de moléculas de água na interação intermolecular, temos um total de 4x4x2 (32) protocolos de *docking* possíveis com o MVD (XAVIER *et al.*, 2019; BITENCOURT-FERREIRA & DE AZEVEDO, 2019d). Previamente havíamos testados os 32 protocolos de *docking* no estudo computacional do receptor CB1 no nosso laboratório (RUSSO & Azevedo, 2019, 2020) (códigos de acesso PDB: 5TGZ, 5U09, 5XR8, 5XRA). Aplicamos o mesmo protocolo para o estudo do receptor CB2. Este protocolo faz uso do algoritmo de busca ACO com a função escore *Moldock Score*.

Para o uso de determinado protocolo de *docking* este deve ser submetido a uma validação. Tal etapa é que chamamos de *redocking*, onde achamos o melhor protocolo *docking* capaz de recuperar a posição cristalográfica de um ligante acoplado ao bolsão de ligação de uma proteína. A condição para que possamos validar nosso protocolo de *docking* é que haja informações sobre pelo menos uma estrutura cristalográfica de um complexo proteína-ligante.

Na figura 10 temos um resultado típico de uma simulação de *redocking*. Chamamos da posição obtida computacionalmente de pose (em vermelho) e a comparamos com a cristalográfica (em cinza claro) a partir do RMSD (*root-mean*

square deviation) que pode ser pensado como uma régua que mede a distância da posição cristalográfica da pose. A posição cristalográfica do ligante é nosso padrão ouro. Quanto mais próxima a posição da pose do ligante cristalográfico melhor é nosso protocolo de *docking*. Consideramos aceitáveis resultados com RMSD inferior a 2 Å (XAVIER *et al.*, 2016).



Figura 10. Resultado da simulação de redocking onde em vermelho temos a pose e em cinza claro a posição cristalográfica do ligante. A posição cristalográfica funciona como padrão ouro do redocking. Foi usado o programa MVD (THOMSEN & Christensen, 2006) para gerar esta figura.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [(x_{x,i} - x_{p,i})^2 + (y_{x,i} - y_{p,i})^2 + (z_{x,i} - z_{p,i})^2]}{N}}$$

O cálculo do RMSD é dado pela seguinte equação:

onde x_x, y_x, z_x são as coordenadas atômicas experimentais do ligante (posição cristalográfica), x_p, y_p, z_p são as da pose e N o número de átomos no ligante. Normalmente no cálculo do RMSD não usamos os átomos de hidrogênio. A principal razão de omitirmos os hidrogênios é devido ao fato da imprecisão nas coordenadas atômicas deste tipo de átomo em estruturas resolvidas por cristalografia de difração de raios X. A cristalografia usa dados de difração de raios X para obter a estrutura tridimensional, ou seja, as coordenadas atômicas (x,y,z) de cada átomo na estrutura. Como os raios X são ondas eletromagnéticas e interagem com a parte eletrônica do

cristal, quanto menor a densidade eletrônica mais fraco é o sinal de raios X relativo ao átomo. Como o hidrogênio só tem um elétron, a sua contribuição para o padrão de difração de raios X é menor. Normalmente nas estruturas resolvidas por difração de raios X não visualizamos a posição dos hidrogênios, por isso omitimos do cálculo do RMSD (XAVIER *et al.*, 2016).

Usamos o cálculo do RMSD disponível no programa MVD para avaliarmos se o protocolo de *docking* usado para CB1 é adequado para a estrutura do CB2. Usamos o ligante destacado na figura 8 complexado com o receptor CB2 (código de acesso PDB: 5ZTY).

6.4 DOWNLOAD DOS DADOS DE AFINIDADE E DAS ESTRUTURAS DOS LIGANTES

Um dos principais desafios no estudo da interação proteína-ligante é a disponibilidade de dados experimentais não só para a estrutura tridimensional do complexo mas a informação sobre a afinidade do ligante na estrutura pela proteína. O PDB dispõe de dados de afinidade para os ligantes que apresentam esta informação experimental, mas infelizmente ainda é relativamente baixa a informação de afinidade considerado-se as quase duas centenas de milhares de estruturas cristalográficas, há aproximadamente 5 mil estruturas com dados de afinidade (HECK *et al.*, 2017). Especificamente para o receptor CB2, não temos dados de afinidade proteína-ligante para a estrutura depositada (código de acesso PDB: 5ZTY). Assim, fizemos uso de uma base de dados que disponibiliza as estruturas dos ligantes (formato *structure-data file*, SDF) e os dados de afinidade, a base de dados BindingDB (LIU *et al.*, 2007). Especificamente no presente projeto usamos os dados de constante de ligação (K_i).

Do ponto de vista molecular, sabemos que se a concentração de um ligante atinge o valor de K_i temos que 50 % dos bolsões de ligação das proteínas estão ocupados por este. Assim, quanto menor o valor de K_i , maior é a afinidade do ligante pela proteína. Os valores de K_i são expressos em Molar. Só para ilustrar, um inibidor típico da protease do HIV-1 como o indinavir tem um K_i na faixa de nanomolar (3,3 nM) (COMAN *et al.*, 2008) (código de acesso PDB: 2R5P).

Aqui vale uma pequena nota sobre o parâmetro K_i . As constantes de ligação e inibição são usadas como sinônimos para constante de dissociação (K_d). Esta

definição não é consistentemente usada na literatura científica e problemas de interpretação podem aparecer, como destacado por Schneider & Barihghaus (SCHNEIDER & Barihghaus, 2008). Aqui usaremos K_i como constante de ligação (*binding constant*). Os dados disponíveis de K_i para o receptor CB2 são expressos em nM (10^{-9} M) na base de dados de afinidade proteína-ligante BindingDB (LIU *et al.*, 2007).

6.5 FILTRAGEM DO DADOS DE AFINIDADE E DAS ESTRUTURAS

Uma situação recorrente na análise de dados biológicos é a filtragem da informação biológica e química contidas em bases de dados públicas como o BindingDB e o PDB. Especificamente para os dados estruturais da proteína, não tínhamos o que filtrar, há somente uma estrutura do receptor CB2 depositada no PDB (busca realizada em 22 de janeiro de 2020). Além do BindingDB, as bases de dados MOAD (SMITH *et al.*, 2019) e PDBbind (WANG *et al.*, 2005) também apresentam dados de afinidade proteína-ligante. Usamos no presente trabalho somente os dados disponíveis no BindingDB por serem mais abrangentes (LIU *et al.*, 2007). Há milhares de estruturas com informação sobre afinidade proteína-ligante para o receptor CB2 no BindingDB (busca realizada em 23 de janeiro de 2020).

Para a informação sobre afinidade, filtramos os dados experimentais de forma que dispomos de estruturas que tenham o código de identificação do ligante gerado pelo BindingDB e que não apresentem erros na representação estrutural ao serem lidas pelo programa MVD. O BindingDB disponibiliza as estruturas tridimensionais dos ligantes para os quais há dados de afinidade no formato SDF e como usamos o MVD para as simulações de *docking* faz-se necessário que o mesmo reconheça as moléculas dos ligantes da base de dados BindingDB. Há situações na base de dados onde a estrutura do ligante apresenta padrões de ligações covalentes não reconhecidos pelo MVD.

Além disso há repetição de ligantes, ou seja, dois ou mais dados de afinidade distintos para o mesmo ligante. Todos ligantes que apresentaram as situações previamente descritas foram deletados da nossa base de dados. Como essa informação será usada para gerarmos modelos computacionais para previsão de afinidade, é importante que os dados sejam selecionados para que seja garantida a

qualidade da informação experimental que será a base para treinarmos os modelos de aprendizado de máquina.

6.6 IDENTIFICAÇÃO DAS COORDENADAS ATÔMICAS DO CENTRO DO BOLSÃO DE LIGAÇÃO DA ESTRUTURA DO CB2

Uma vez definido o protocolo de *docking*, como descrito anteriormente, partimos para identificação da posição dos ligantes com informação de afinidade no sítio de ligação do CB2. Para isto precisamos ter as coordenadas atômicas onde serão centradas as simulações de *docking*. Usamos as coordenadas atômicas do ligante (código do ligante: 9JU) complexado com a estrutura do receptor CB2 disponível na estrutura cristalográfica 5ZTY (LIU *et al.*, 2019).

6.7 PREPARAÇÃO DA ESTRUTURA DO RECEPTOR CB2 PARA VIRTUAL SCREENING

O processo de *virtual screening* é a aplicação repetida do protocolo de *docking* para a identificação do encaixe ou não de ligantes potenciais para uma dada proteína alvo (AZEVEDO, 2010). Normalmente usamos essa abordagem para buscarmos numa biblioteca de ligantes potenciais de uma proteína alvo a posição e a energia de interação prevista para um ligante.

Na preparação da estrutura da proteína, no caso o receptor CB2 (código de acesso PDB: 5ZTY), eliminamos as moléculas de água da estrutura cristalográfica, bem como todos os ligantes e co-fatores usados no processo de cristalização, inclusive o ligante 9JU. Assim, dispomos somente das coordenadas atômicas da proteína. Na sequência adicionamos os átomos de hidrogênio na estrutura da proteína, o receptor CB2 não apresenta átomos de hidrogênio na sua estrutura devida à baixa resolução cristalográfica dos dados de difração de raios X. Para adicionar os átomos de hidrogênio usamos o programa MVD (THOMSEN & Christensen, 2006).

Na preparação para o *virtual screening* também adicionamos átomos de hidrogênio nas estruturas dos ligantes em potencial que foram baixados da base de dados BindingDB. As cargas dos átomos dos ligantes e do receptor CB2 foram atribuídas usando os padrões do programa MVD (THOMSEN & Christensen, 2006).

6.8 SIMULAÇÃO DE VIRTUAL SCREENING

Na simulação de *virtual screening* usamos o protocolo de *docking* com ACO e a função escore *Moldock Score* do programa MVD. A simulação foi centrada nas coordenadas atômicas do centro de massa da molécula 9JU. Usamos um raio da esfera de *docking* de 14 Å. Este raio é onde restringimos nossas simulações de *docking*, como mostrado na figura 11. A esfera verde da figura abaixo indica a região onde procuraremos na proteína as posições possíveis dos ligantes potenciais. Usamos tal artifício para economizarmos tempo de computação, visto que quanto maior for a região (volume da esfera de *docking*) a ser vasculhada pelo algoritmo de

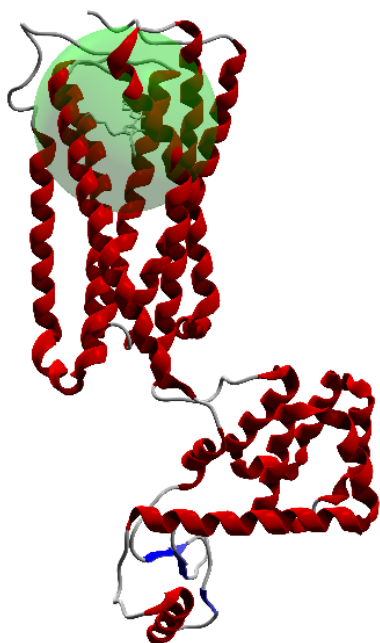


Figura 11. Esfera de *docking* usada para as simulações de *docking* e *virtual screening* para o receptor de CB2. A esfera verde está centrada no ligante 9JU das coordenadas da estrutura 5ZTY. A figura foi gerado com o programa MVD (THOMSEN & Christensen, 2006).

busca, maior será o tempo de simulação.

A afinidade do ligante é avaliada pelo valor da função escore calculada pelo *Moldock Score*. Esta função usa as coordenadas atômicas da pose (posição do ligante obtida computacionalmente) e do receptor CB2. Espera-se que quanto menor o valor da função *Moldock Score* menor o valor da afinidade experimental (K_i).

Uma situação comumente encontrada na análise de sistemas biológicos é a pergunta se duas variáveis, ou conjuntos de medidas, estão relacionadas de alguma forma. Por exemplo, podemos dizer que a massa corporal dos seres humanos tem relação com a altura, ou seja, pessoas mais altas apresentam maior massa corporal.

Obviamente tal observação não é uma verdade absoluta, mas uma tendência. Esta situação pode ser avaliada a partir do coeficiente de correlação. Há dois tipos principais de coeficientes usados na análise estatística de dados biológicos, os coeficientes de Pearson e Spearman (ZAR, 1972). O coeficiente de Pearson pode ser usado para avaliarmos se há uma relação linear entre duas variáveis.

O coeficiente de Spearman é usado para verificar se há uma relação monotônica entre duas variáveis. Para entendermos o que é uma relação monotônica, consideremos o exemplo citado da relação da altura e a massa corporal dos seres humanos. Pessoas mais altas tendem a ter uma massa corporal maior, ou seja, conforme aumentamos a variável altura, esperamos que a variável massa corporal aumente. Toda vez que temos uma relação entre duas variáveis, por exemplo x e y , em que ambas aumentam juntas, temos uma relação monotônica (monotônica crescente), mostrada na figura 12A. Podemos ter também uma relação monotônica para duas variáveis, onde quando uma aumenta a outra diminui (monotônica decrescente), figura 12B.

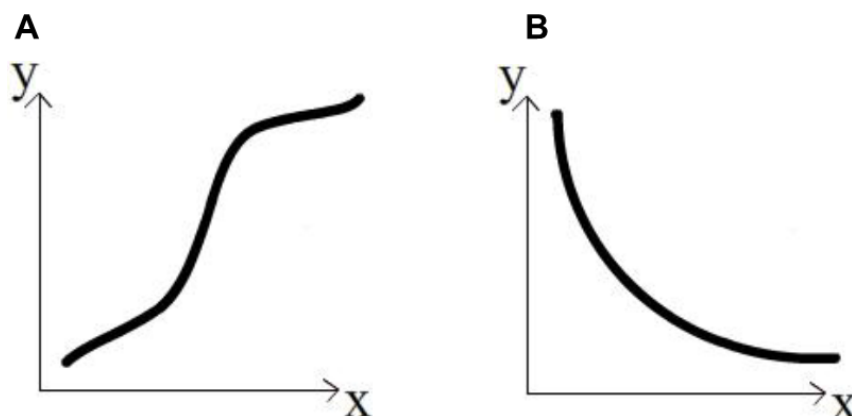


Figura 12. A) Duas variáveis x e y com relação monotônica crescente. B) Duas variáveis x e y com relação monotônica decrescente.

O coeficiente de correlação de Spearman (ρ) apresenta valores que variam no intervalo entre -1 e 1. Valores de correlação próximos a -1 ou a 1, indicam que há correlação entre as duas variáveis, resultados próximos de zero indicam que não há correlação entre as duas variáveis.

A principal aplicação da análise do coeficiente de correlação entre duas variáveis, é o teste de hipóteses, ou seja, realizamos um experimento ou modelagem computacional, ou coletamos dados de um sistema biológico, levanto hipóteses e testamos a partir da análise estatística. Para nossos propósitos, vamos considerar

uma aplicação para o desenvolvimento de funções escore. Esperamos funções escore para o receptor CB2 com correlação positiva e com gráfico de dispersão entre os valores previstos e experimentais com curvas monotônicas crescentes, como a indicada na figura 12A.

6.9 PREPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE *VIRTUAL SCREENING* PARA APRENDIZADO DE MÁQUINA

Os resultados da simulação de *virtual screening* são gerados de duas formas. Uma envolvendo a informação estrutural, ou seja, a estrutura tridimensional do complexo proteína-ligante (proteína-pose). Esta informação é salva na forma de um arquivo no formato MOL2 com as coordenadas atômicas do ligante (pose) em potencial e podemos montar a estrutura do complexo carregando as coordenadas do ligante (pose) em potencial na estrutura cristalográfica do receptor CB2 (BREDA *et al.*, 2008; AZEVEDO & Dias, 2008; DE AZEVEDO, 2010).

A outra informação relevante é a afinidade computacionalmente prevista, expressa na forma da função *Moldock Score*. Para o cálculo desta função o programa MVD usa as coordenadas atômicas do complexo proteína-pose e salva os resultados na forma de uma planilha no formato *comma separed value* (CSV) que pode inclusive ser lido pelo excel. Neste trabalho usamos o leitor de planilhas do MVD, chamado *Molegro Data Modeller* (MDM) (THOMSEN & Christensen, 2006).

A figura 13 mostra uma visão geral do programa MDM com a exibição parcial de uma planilha com cálculos de termos energéticos envolvendo ligações de hidrogênio, potencial de Lennard-Jones, termo eletrostático, de solvatação e número de ângulos de torção dos ligantes. Estas informações podem ou não apresentar correlação com os dados experimentais de afinidade, como destacado no gráfico de dispersão da figura 13. O programa MDM calcula além dos coeficientes de correlação o desvio médio quadrático entre o valor calculado computacionalmente e o experimental, representaremos no presente texto desvio médio quadrático pela sigla em inglês RMSE (*root mean squared error*), para não confundirmos com o RMSD de *docking*. A correlação de Spearman entre o número de ângulos de torção e o valor

experimental da afinidade é 0,18. Ou seja, no exemplo indicado há pouca correlação entre as duas grandezas.

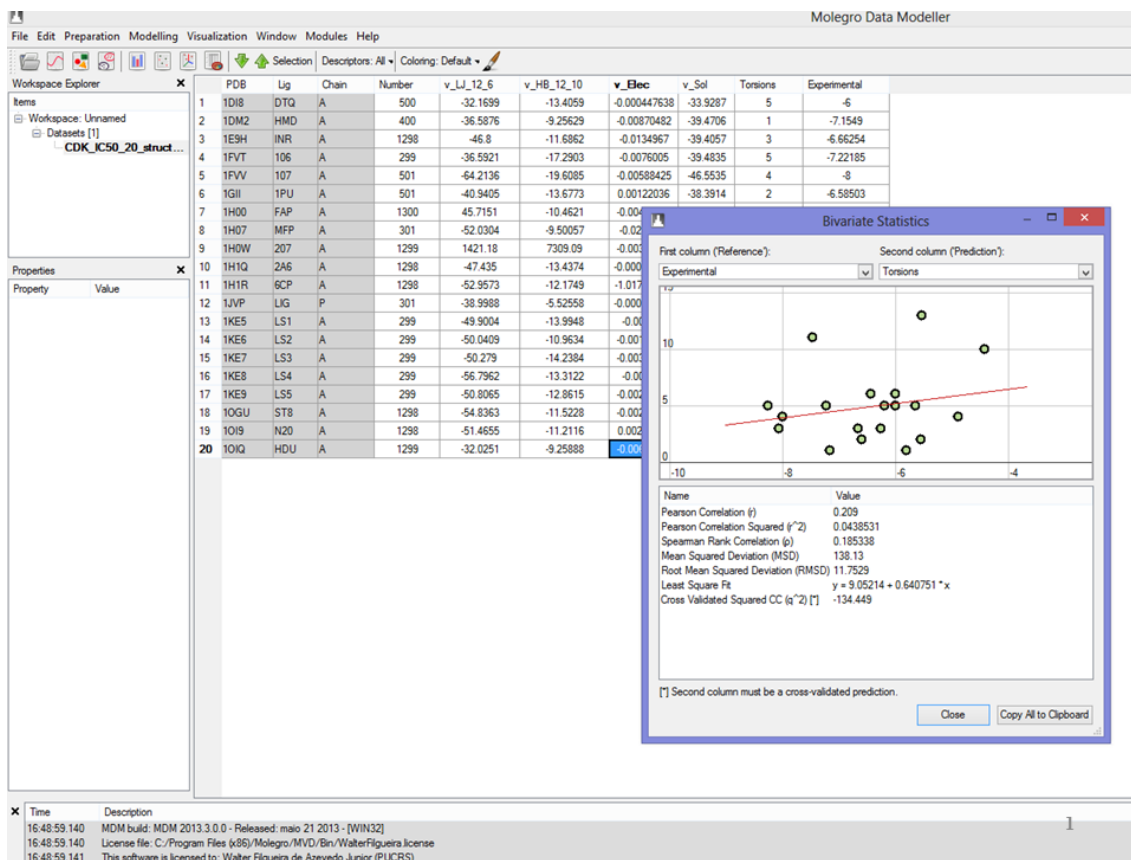


Figura 13. Tela do MDM mostrando a análise estatística da correlação entre a afinidade experimental e o número de ângulos de torção do ligante.

Uma forma de gerarmos um modelo computacional com maior correlação com os dados experimentais é montarmos uma equação polinomial onde os termos energéticos entram como variáveis independentes e usamos o método de aprendizado de máquina para determinarmos o peso relativo de cada termo energético (AZEVEDO & Dias, 2008). Como destacado, os resultados da simulação de *virtual screening* são apresentados na forma de uma planilha, onde temos os valores da energia de interação para cada ligante em potencial além do termos energéticos usados para a montagem do função *Moldock Score*. Nossa proposta é usar estes termos para montarmos uma função específica para o receptor CB2.

6.10 APRENDIZADO DE MÁQUINA

Como destacamos, para melhorarmos o poder de previsão do modelo computacional podemos montar uma equação polinomial que combina vários potenciais num único modelo. Chamamos este modelo de função escore que pode ser expresso por uma equação. Nesta equação cada potencial tem um peso que aproxima o valor previsto da afinidade (*predicted binding affinity*) (PBA) do valor experimental da afinidade o que aumenta a correlação do PBA com o valor experimental da afinidade. Quando usamos dados de afinidade é comum termos uma variação de várias ordens de grandeza, por exemplo um K_i variando entre 10^{-3} M a 10^{-10} M. Em tais situações é comum convertermos para uma escala logarítmica, onde usamos o $\log(K_i)$. Na planilha da figura 13 a coluna Experimental é o \log da afinidade, por isso os valores negativos.

A equação do PBA tem a forma mostrada abaixo,

$$PBA = \alpha_0 + \alpha_1(V_{LJ}) + \alpha_2(V_{HB}) + \alpha_3(V_{Elec}) + \alpha_4(V_{Sol}) + \alpha_5(Torsions)$$

(Equação 2)

onde os α_1 - α_5 são os pesos relativos de cada termo energético, o α_0 é a constante de regressão. O V_{LJ} representa o potencial de Lennard-Jones, o V_{HB} e potencial devidos às interações de ligação de hidrogênio, o V_{Elec} representa o potencial eletrostático, o V_{Sol} o potencial de solvatação e *Torsions* representa o número de ângulos de torção do ligante. Cada termo energético leva em consideração as coordenadas dos átomos do ligante (pose) e da proteína para o cálculo de seu valor.

Para computacionalmente gerarmos os pesos relativos de cada termo energético na equação 2, usamos métodos de aprendizado de máquina (BITENCOURT-FERREIRA & DE AZEVEDO, 2018; BITENCOURT-FERREIRA & DE AZEVEDO, 2019e; BITENCOURT-FERREIRA *et al.*, 2020). O objetivo final é termos uma equação capaz de prever com boa correlação a afinidade proteína-ligante. Usamos os termos energéticos da função *Moldock Score* como variáveis independentes (termos do polinômio) e o $\log(K_i)$ como variável dependente. No

presente trabalho usamos o programa MDM (THOMSEN & Christensen, 2006) e SAnDReS (XAVIER *et al.*, 2016) para gerarmos modelos de aprendizado de máquina.

Para ilustrarmos o processo de geração de modelos de aprendizado de máquina, vamos considerar a planilha vista na figura 13. Iremos montar uma nova função escore calibrada (treinada) para os dados experimentais de 20 ligantes indicados na planilha. A nova função escore terá a forma da equação polinomial mostrada na equação 2 e para ilustrar seu uso vamos gerar um modelo de aprendizado de máquina usando regressão linear. A figura 14 mostra os resultados

	PDB	Lig	Chain	Number	v_L1_12_6	v_H1_12_10	v_Elec	v_Sol	Torsions	Experimental	MLR-Train (SD)
1	IDB	DTQ	A	500	-32.1699	-13.4059	-0.00447638	-33.9287	5	-6	-5.50387
2	IDM2	HMD	A	400	-36.5876	-9.25629	-0.00870482	-39.4706	1	-7.1549	-7.10017
3	IESH	INR	A	1298	-46.8	-11.6862	-0.0134967	-39.4057	3	-6.66254	-6.61462
4	IFVT	106	A	299	-36.5921	-17.2903	-0.0076005	-39.4835	5	-7.22185	-6.20821
5	IFVV	107	A	501	-44.2136	-19.6985	-0.00589425	-46.5535	4	-8	-7.71425
6	IGI	IFU	A	501	-40.9405	-13.6773	0.00122036	-38.3914	2	6.88553	6.93938
7	IHQ0	FAP	A	1300	45.7151	-10.4621	-0.04487897	-39.9893	10	4.42022	-4.806
8	IHQ7	MFP	A	301	-52.0304	-9.50057	-0.0274728	-51.3736	13	-5.52388	-5.88234
9	IHQW	207	A	1299	1421.18	7309.09	-0.00343277	-31.361	4	-4.88806	-4.88552
10	IHQ	246	A	1298	-47.435	-13.4374	-0.00691725	-41.6579	5	-6	-6.75347
11	IHT1R	6CP	A	1298	-52.9673	-12.1749	-1.01712e-05	-42.3092	5	-5.63827	-6.90602
12	IJVP	LIG	P	301	-38.9888	-5.52558	-0.000301928	-27.3535	1	5.79898	-5.50229
13	IKE5	LS1	A	299	-49.8044	-13.9948	-0.005596	-35.9431	3	6.25181	6.26261
14	IKE6	LS2	A	299	-50.0409	-10.9634	-0.0166806	-44.2542	5	-9.24413	-7.15488
15	IKE7	LS3	A	299	-50.279	-14.2384	-0.00338535	-48.1899	3	-8.05061	-8.13636
16	IKE8	LS4	A	299	-56.7962	-13.3122	-0.006358	-40.3092	6	-6	-6.2843
17	IKE9	LS5	A	299	-50.8065	-12.8615	-0.00206488	-39.2094	5	-6.18046	-6.39023
18	IOGU	ST8	A	1298	-54.8363	-11.5228	-0.00263194	-50.89	11	-7.48852	-6.77852
19	IOI9	N20	A	1298	-51.4655	-11.2116	0.00201023	-41.8592	6	6.42098	-6.64417
20	IOIQ	HDU	A	1299	-32.0251	-9.25888	-0.00607761	-31.7664	2	-5.5376	-5.75513

gerados pelo MDM.

Figura 14. Tela do MDM mostrando os valores previstos para afinidade obtidos a partir do modelo de aprendizado de máquina usando a técnica de regressão linear para determinarmos os pesos relativos de cada termo energético da equação 2.

A análise estatística do poder de previsão do modelo gerado por aprendizado de máquina está na figura 15. Vemos que o modelo gerado tem boa correlação com o valor experimental de afinidade, com valor de correlação de Spearman de 0,78. O gráfico de dispersão mostra que os valores previstos (eixo y) estão próximos aos experimentais (eixo x), com uma relação monotônica crescente entre os parâmetros experimentais e calculados pelo modelo de aprendizado de máquina.

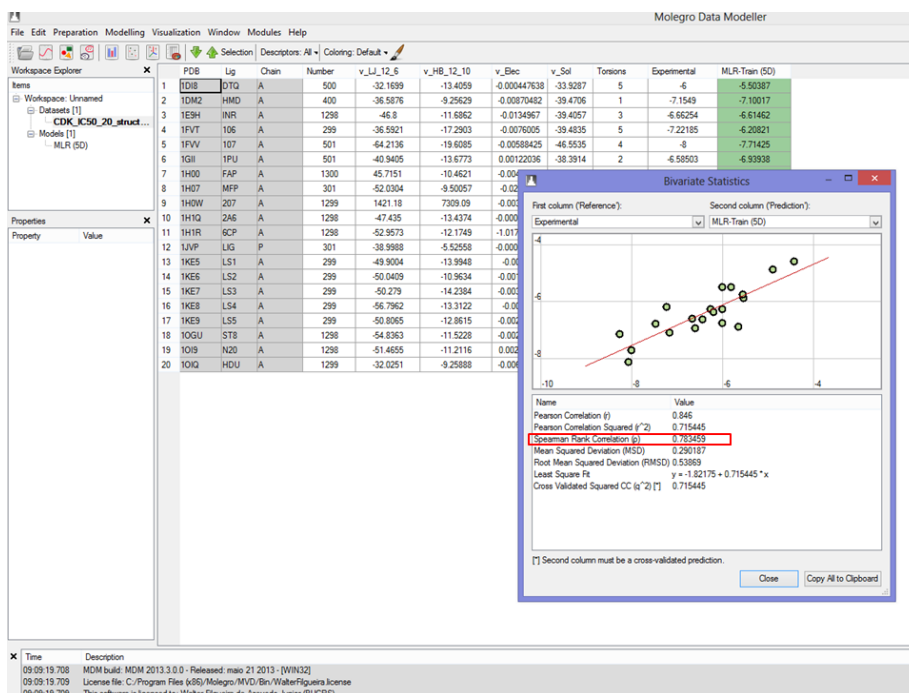


Figura 15. Tela do MDM mostrando a análise estatística da correlação entre a afinidade experimental e o valor previsto pelo modelo gerado por aprendizado de máquina.

No presente trabalho, usamos além do método de regressão linear, os método Lasso (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) (TIBSHIRANI, 1996), *Ridge* (TIKHONOV, 1963), *Elastic Net* (Zou & Hastie, 2005) e Perceptron de multi camadas (Li *et al.*, 2019). Estes métodos estão implementados no programa SAnDReS (XAVIER *et al.*, 2016) e fazem uso da biblioteca Python scikit-learn (PEDREGOSA *et al.*, 2011).

Uma prática importante na elaboração de modelos e aprendizado de máquina é a separação do conjunto de dados em dois subconjuntos. Um chamado de conjunto treino e outro de conjunto teste. O conjunto treino é usado para obtermos os pesos relativos da equação 2. Ou seja, os pesos são calibrados para as observações usadas no conjunto treino, normalmente usamos aproximadamente 70 % dos dados como conjunto treino. O conjunto teste com aproximadamente 30 % dos dados totais é usado para checar o poder de previsão do modelo gerado (XAVIER *et al.*, 2016). Veja, como os dados experimentais do conjunto teste não foram usados para treinar o modelo de aprendizado de máquina eles servem como uma checagem de realidade.

Normalmente espera-se que os coeficientes de correlação para os dados do conjunto teste sejam piores que para o conjunto treino.

6.11 SERVIDOR E PROGRAMAS USADOS NAS SIMULAÇÕES

As simulações de *docking* e *virtual screening* foram executadas num servidor Dell PowerEdge 840 com processador Intel® Xeon® Processor 3060 (4M Cache, 2.40 GHz, 1066 MHz FSB) 4GB de memória e 500 GB de hard disk com Linux Ubuntu. A modelagem de aprendizado de máquina foi executada num Desktop PC com 4GB de memória, 1 TB hard disk e um processador Intel® Core® i3-2120 @ 3.30 GHz processor com Windows 8.1. Usamos *Molegro Virtual Docker 6.0* e *SAnDReS 1.0.1*. O programa SAnDReS está disponível em <https://github.com/azevedolab/sandres/blob/master/sandres.zip>.

Para que possam ser executadas as simulações computacionais de docking com maior acurácia é necessária a estrutura tridimensional da proteína estudada complexada com um ligante. Os complexos proteína-ligante permitem a previsibilidade das cavidades, também chamadas sítios, ativas da proteína estudada. Os complexos do receptor canabinoide 2 já resolvidos estruturalmente por homologia serão usados para validação do protocolo de docking através do programa Sandres. De uma forma geral, essa validação é chamada de re-docking, e o seu sucesso pode ser avaliado pelo cálculo do desvio médio quadrático (Root- Mean Square Deviation (RMSD)). O valor de RMSD considerado ótimo para as simulações docking deve ser encontrado na faixa de 0-2 Å, podendo chegar a 3Å nos casos em que o ligante pode sofrer torções para se posicionar.

Nas simulações de docking molecular usaremos os programas Molegro VirtualDocker (MVD), AutoDock 4 e AutoDock Vina (41) através do programa Sandres. Os programas AutoDock 4 e MVD fazem uso de algoritmos evolucionários para as simulações de docking molecular.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 DADOS ESTRUTURAIS

Como destacado nos materiais e métodos, usamos a base de dados *Protein Data Bank* (PDB) (Berman *et al.*, 2000, 2002; Westbrook *et al.*, 2003) para recuperarmos a estrutura tridimensional do receptor CB2. As coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica do receptor CB2 foram depositadas com o código de acesso 5ZTY (Li *et al.*, 2019).

A estrutura do receptor CB2, bem como as estruturas do receptor CB1 (códigos de acesso PDB: 5TGZ, 5XRA, 5XR8, 5U09 e 6KQI) (HUA *et al.*, 2016; 2017; SHAO *et al.*, 2016; SHAO *et al.*, 2019) foram resolvidas graças a inserção de uma proteína de fusão. Esta proteína de fusão é a lisozima T4 no caso da estrutura do receptor CB2. A inserção ocorreu entre os resíduos Ser222-Ala235 do receptor CB2 gerando uma proteína modificada. A sequência inserida da lisozima tem 160 resíduos de aminoácidos e há cinco mutações que foram introduzidas na estrutura envolvendo os seguintes resíduos: Gly78Leu, Thr127Ala, Thr153Leu, Arg242Glu e Gly304Glu. Essas modificações visam o aumento da homogeneidade e termoestabilidade da proteína. Outras modificações foram a remoção de 20 resíduos de aminoácidos do N-terminal e uma faixa do C-terminal envolvendo resíduos 326-360. Essas modificações visam melhorar a qualidade do cristal do receptor CB2 (Li *et al.*, 2019).

Os receptores CB1 e CB2 são proteínas de membrana, estas apresentam uma dificuldade a mais na sua cristalização (KANG *et al.*, 2013; DELMAR *et al.*, 2015; ISHCENKO *et al.*, 2017). De uma forma resumida, para cristalizarmos uma macromolécula biológica precisamos trazê-la a um estado de supersaturação, a partir da adição de agentes precipitantes como sais, glicerol, polietileno glicol entre outros (JANCARIK & Kim, 1991). Proteínas transmembranares apresentam feixes de hélices que tendem a ter a parte mais hidrofóbica exposta ao solvente (CHAMBERLAIN *et al.*, 2003). Esta característica físico-química dificulta trazer a proteína a um estado de supersaturação que é favorável à formação dos primeiros núcleos cristalinos que levam à formação do cristal (DE AZEVEDO JR *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2013).

Muitas das proteínas que interagem com a membrana celular, apresentam regiões em hélice alfa (WHITE & VON HEIJNE, 2005). Para entendermos esta interação proteína-membrana, vamos olhar alguns detalhes da estrutura da hélice

alfa. Uma hélice alfa (figura 16A) tem as cadeias laterais apontando para fora da hélice (indicadas com setas). Esta hélice alfa pode ser representada como um cilindro (figura 16B). Nas figuras 16C e 16D temos a visão de cima de cada uma das representações da hélice alfa. As visões facilitam a identificação das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas das hélices alfa, como nas figuras 16C e 16D.

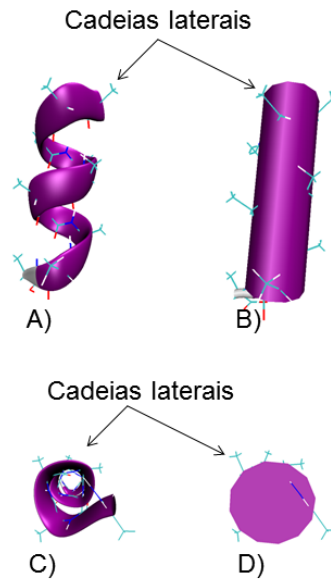


Figura 16. Hélices alfa. Visão de perfil A) e B). Visão do topo C) e D). Figura gerada pelo programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al, 1996).

Nas estruturas de feixes de hélices transmembranares, verifica-se que a parte da hélice que toca os lipídios é relativamente mais hidrofóbica que a parte que participa do contato hélice-hélice (VON HEIJNE, 2011). Nas figuras 17A e 17B temos feixes de quatro hélices indicando uma porção da estrutura que atravessa a bicamada fosfolipídica. No diagrama esquemático da figura 17B, temos um feixe de 4 hélices, onde vemos que a região entre as hélices é mais hidrofílica que a região em contato com a bicamada lipídica. A região das hélices em contato com as caudas hidrofóbicas da bicamada fosfolipídica está indicada por setas.

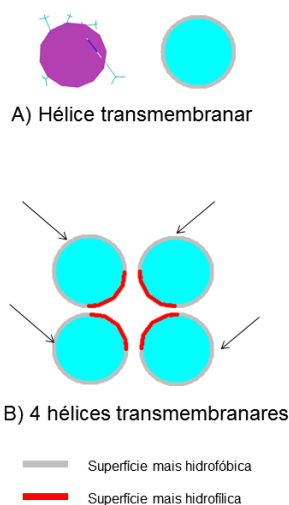


Figura 17 A) Visão de uma hélice e o posicionamento das cadeias laterais. B) Visão do topo de um feixe de quatro hélices. Figura gerada pelo programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al, 1996).

A inserção de uma proteína de fusão no receptor CB2, permite que haja uma diminuição do perfil hidrofóbico da proteína, o que facilita as condições de cristalização (Li et al., 2019). A figura 18 traz a estrutura cristalográfica do receptor CB2, com destaque para região da inserção da proteína de fusão (lisozima T4). A inserção da lisozima T4 ficou longe do bolsão de ligação, e espera-se que os efeitos sejam mínimos na interação do ligante com o receptor CB2.

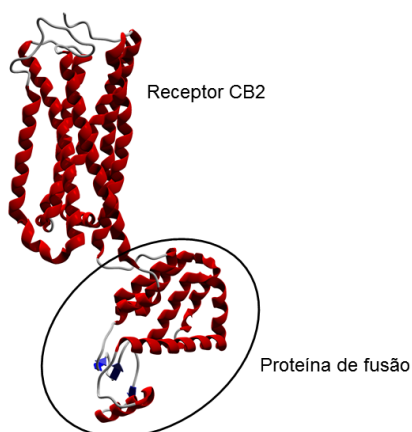


Figura 18. Estrutura cristalográfica do receptor CB2 com destaque para a proteína da fusão (lisozima T4). Figura gerada pelo programa MVD (Thomsen & Christensen, 2006).

A hélice alfa é uma estrutura secundária comumente encontrada em segmentos transmembranares de proteínas de membranas, como os receptores CB1 e CB2 (SHAO *et al.*, 2016; HUA *et al.*, 2016; 2017; SHAO *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). Normalmente temos a combinação de vários segmentos de hélice, formando feixes de hélices transmembranares. A partir da análise da estrutura do receptor CB2, podemos propor um modelo para interação da proteína com a membrana. No modelo da figura 19, temos que a parte hidrofóbica interage com a membrana celular.

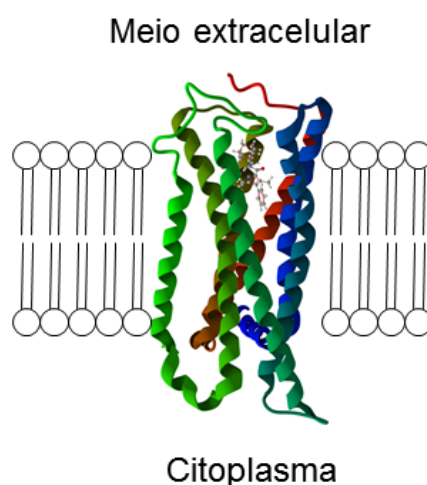


Figura 19. Modelo de interação do receptor CB2 com a bicamada fosfolipídica. Os fosfolipídios são representados por círculos com duas linhas. O círculo representa a cabeça polar e as duas linhas conectadas ao círculo indicam as caudas hidrofóbicas. Figura gerada pelo programa MVD (Thomsen & Christensen, 2006).

7.2 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES RECEPTOR CB2- ANTAGONISTA

A partir das coordenadas atômicas do receptor CB2, realizamos uma análise das interações intermoleculares com o antagonista AM10257 (*N*-(adamantan-1-yl)-1-(5-hidroxipentil)-4-metil-5-fenil-1H-pirazol-3-carboxamida) (código do ligante 9JU) (figura 20).

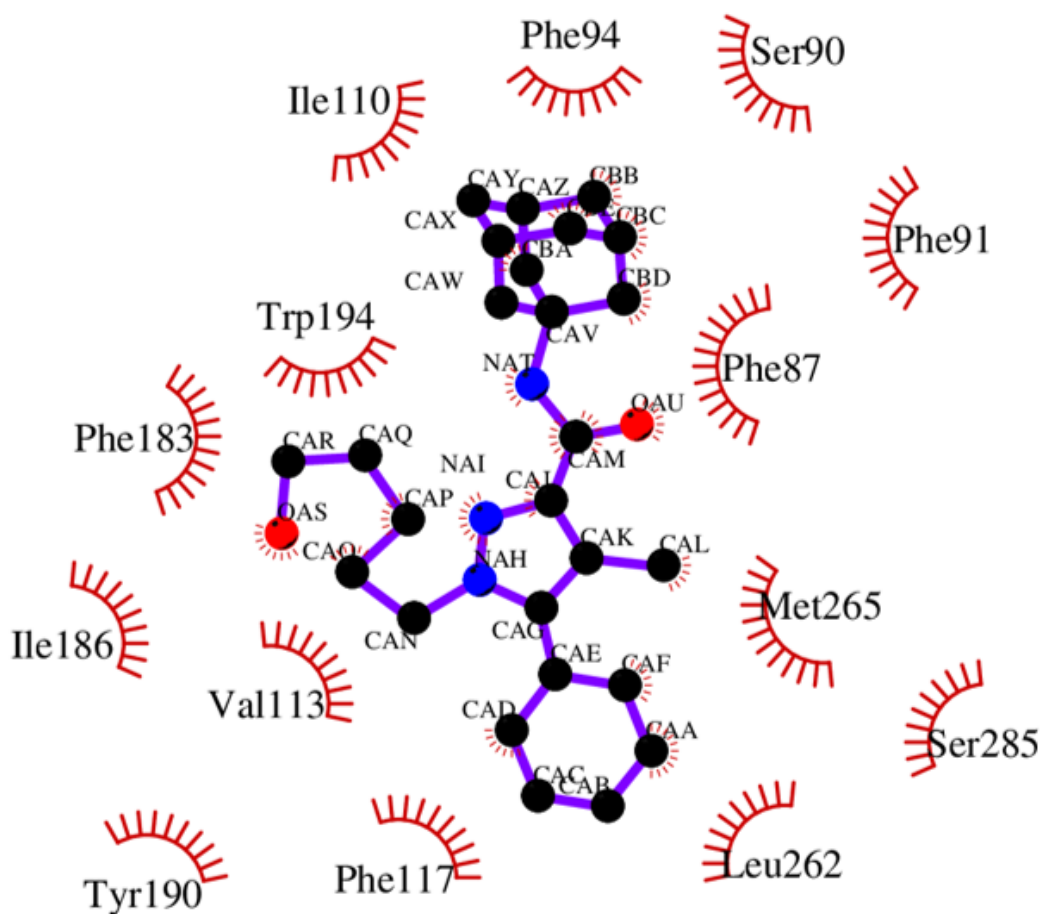


Figura 20. Interações intermoleculares do antagonista AM10257 (*N*-(adamantan-1-yl)-1-(5-hidroxipentil)-4-metil-5-fenil-1H-pirazole-3-carboxamida) (código do ligante: 9JU) com o receptor CB2. Os semiarcos em vermelho indicam resíduos de aminoácidos que participam de interações intermoleculares. Os círculos representam os átomos do antagonista AM10257 (9JU). As linhas roxas indicam ligações covalentes entre os átomos do antagonista. Figura gerada com LigPlot+ (LASKOWSKI & Swindells, 2011).

A partir da figura 20, vemos claramente que todas as interações intermoleculares do antagonista AM10257 (9JU) com o receptor CB2 envolvem interação de van der Waals, não há ligações de hidrogênio intermoleculares ou interações eletrostáticas fortes, apesar da presença de átomos capazes de participar de ligações de hidrogênio na estrutura do ligante. De uma forma geral, o bolsão de ligação na estrutura do receptor CB2 apresenta principalmente aminoácidos hidrofóbicos como leucina, isoleucina, valina e fenilalanina. Uma análise previamente realizada das interações intermoleculares do CB1 indicou a preponderância de interações envolvendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Russo & Azevedo,

2019, 2020) (códigos de acesso PDB: 5TGZ, 5U09, 5XR8, 5XRA). O alinhamento das sequências dos receptores CB1 e CB2 está mostrado na figura 21.

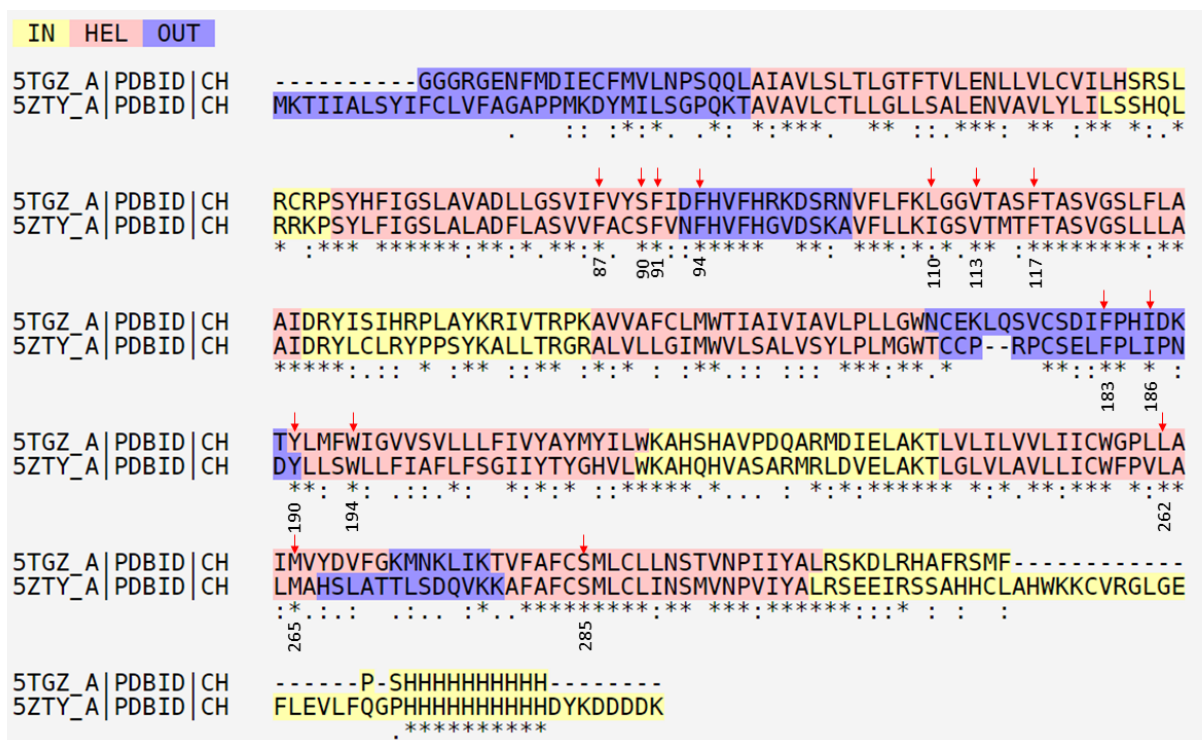


Figura 21. Alinhamento das sequências dos receptores CB1 (5TGZ) e CB2 (5ZTY). Este alinhamento foi realizado com o programa T-coffee (CHANG et al., 2012). As setas vermelhas indicam os resíduos de aminoácidos que participam de interações intermoleculares na estrutura do receptor CB2 com o antagonista AM10257. Na legenda, * representa resíduo conservado, : semelhante, . parcialmente semelhante. A cor amarela indica meio intracelular, roxo meio extracelular e salmão hélices transmembranares.

A análise do alinhamento das sequências dos receptores CB1 e CB2, indica que entre os 14 resíduos de aminoácidos que participam de interações intermoleculares na estrutura do receptor CB2, 13 resíduos são conservados, com uma única exceção, a Ile 110 do receptor CB2 é uma Leu no receptor CB1, o que ponto de vista físico-químico é quase uma identidade, devido à semelhança entre os dois aminoácidos.

Mesmo com a conservação dos principais resíduos de aminoácidos envolvidos em interações intermoleculares envolvendo a molécula AM10257 com os receptores CB1 e CB2, diferenças na estrutura do complexo CB1- AM10257 levam a uma ação

distinta no receptor CB1, o que faz a molécula AM10257 ter um carácter funcional dual, CB2 antagonismo vs CB1 agonismo (Li et al., 2019).

7.3 DOCKING MOLECULAR

Utilizamos o protocolo previamente descrito para o receptor CB1 (Russo & Azevedo, 2019, 2020) para as simulações de *docking*. O resultado com menor valor para função *Moldock Score* gerou um RMSD de 0,899 Å. Este resultado é considerado adequado, visto que é inferior a 2,0 Å (Xavier et al., 2016) (figura 22).

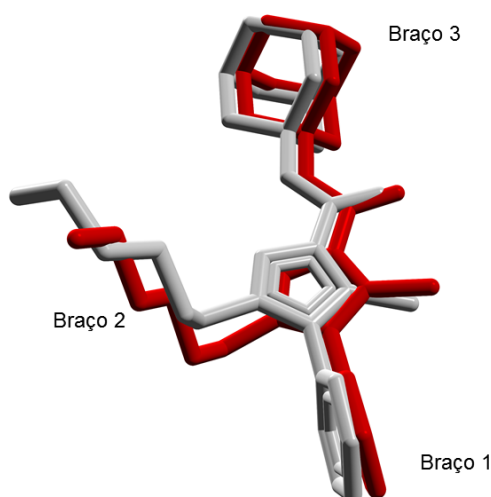


Figura 22. Resultado da simulação de redocking molecular. A estrutura em cinza claro representa a posição cristalográfica do antagonista AM10257 (9JU) e a vermelha a pose gerada na simulação de redocking. Figura gerada pelo programa MVD (Thomsen & Christensen, 2006).

Uma análise da figura 22 revela que os três braços da estrutura do antagonista do receptor CB2 AM10257 foram bem posicionados na pose, com maiores desvios na estrutura do braço mais leve (braço 2), sem a presença de sistemas de anéis. O restante da estrutura da molécula AM10257 apresenta excelente superposição entre a posição cristalográfica e a pose. Considerando-se que a estrutura da molécula AM10257 tem 8 ângulos de torção com flexibilidade durante a simulação de *redocking*, o presente protocolo apresenta um resultado aceitável e consideramos que o protocolo é adequado para as simulações de *virtual screening*.

Outro aspecto a ser destacado dos resultados de *redocking* é que o valor da função *Moldock Score* é de -152,449 unidades arbitrárias de energia (ua). A função *Moldock Score* não foi calibrada em nenhuma unidade física de energia, por isso não pode ser usada para uma avaliação direta da energia de ligação, mas pode ser usada para efetuarmos uma avaliação qualitativa dos resultados de *docking* e de *virtual screening*. Esperamos que valores negativos sejam obtidos para ligantes que verdadeiros da proteína alvo. O valor negativo obtido na presente simulação também é um indicativo de qualidade da simulação realizada com o MVD.

Como um teste adicional, calculamos o valor da função *Moldock Score* usando as coordenadas atômicas da molécula AM10257 na posição cristalográfica. O valor obtido é de -134,160 ua. Como podemos ver, o valor obtido da função *Moldock Score* é maior para estrutura cristalográfica. Isto poderia parecer uma discrepância dos resultados de *redocking*, mas não é. É comum observarmos que o valor calculado de funções escores são maiores para a posição cristalográfica do ligante, quando comparado com a da pose. Há diversos fatores para esse resultado (Xavier *et al.*, 2016). Um deles é devido ao empacotamento cristalográfico ao qual é submetida toda a estrutura resolvida por cristalografia. A figura 23 mostra o empacotamento cristalino da estrutura do receptor CB2 na cela unitária onde foi resolvida.

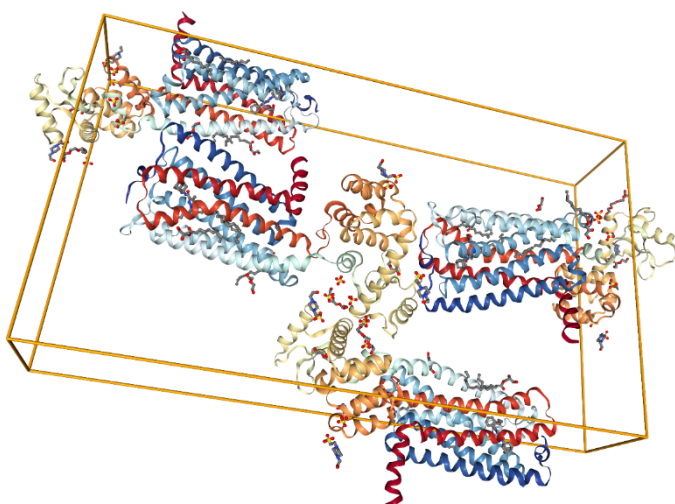


Figura 23. Empacotamento cristalino da estrutura do receptor CB2. A caixa desenhada indica uma cela unitária do cristal. Tipicamente há trilhões de celas unitárias formando o cristal macroscópico. Figura gerada pelo servidor do *protein data bank* (Berman *et al.*, 2000, 2002; Westbrook *et al.*, 2003).

Um cristal de proteína é o resultado de empacotamento de trilhões de moléculas e este contato entre diferentes subunidades do cristal causam interferências no posicionamento de cadeias laterais e na posição dos ligantes na estrutura da proteína (KIRYS *et al.*, 2012; PORTER *et al.*, 2014). Essa

interferência pode levar o ligante a uma localização próxima ao mínimo de energia, mas não exatamente neste mínimo. O principal resultado favorável que podemos extrair é que diferenças são esperadas entre o valor da função escore calculado para a posição cristalográfica e o da pose (Xavier *et al.*, 2016).

Um segundo aspecto a ser destacado para justificar a diferença dos valores da função *Moldock Score* calculados para as posições cristalográfica e computacional (pose) da molécula AM10257, refere-se à qualidade da informação cristalográfica propriamente dita. A estrutura do receptor CB2 foi resolvida a 2,8 Å, considerada moderada (ALEXANDRESCU *et al.*, 2001; Canduri & DE AZEVEDO, 2008). Para resolução cristalográfica, quanto menor este valor mais precisão temos para as coordenadas atômicas da estrutura. Normalmente nesta faixa de resolução temos como delinear a cadeia principal da proteína e com relativo esforço o posicionamento das cadeias laterais. Muitas vezes não de toda estrutura (DELATORRE & DE AZEVEDO, 2001).

Uma análise do mapa de densidade eletrônica na região próxima da estrutura antagonista AM10257 está mostrada na figura 24. Nesta figura o gradeado azul indica a densidade eletrônica, ou seja, onde devemos encontrar os átomos da estrutura. Especificamente na molécula AM10257 (ligante em cinza no centro) vemos que o gradeado azul (densidade eletrônica) é falho em diversas partes da estrutura. Mais notadamente no braço do ligante sem anéis (braço 2), posicionado à esquerda na figura 24. Esta baixa qualidade da densidade eletrônica aliada ao empacotamento cristalino, leva a essas diferenças entre o valor da função escore calculado para a posição cristalográfica e a pose.

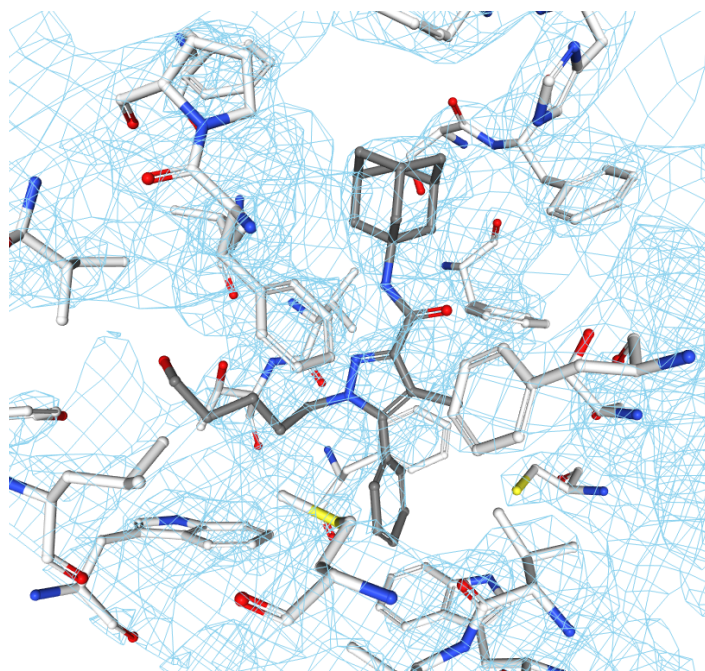


Figura 24. Mapa de densidade eletrônica da região em todo do antagonista AM10257 (9JU) com contorno $1,5 \sigma$. Em gradeado azul temos a densidade eletrônica da região da vizinhança da molécula AM10257. Os cilindros em cinza representam a estrutura do antagonista do receptor CB2 AM10257 o restante representa parte da proteína próxima a este. Figura gerada pelo servidor do protein data bank (Berman et al., 2000, 2002; Westbrook et al., 2003).

7.4 DADOS DE AFINIDADE E AS ESTRUTURAS DOS LIGANTES

Usamos o BindingDB (Liu et al., 2007) como fonte dos dados de afinidade de ligantes pelo receptor CB2. Há nessa base de dados 4328 ligantes com dados experimentais de constante de ligação (K_i) (busca realizada em 23 de janeiro de 2020). Como destacamos anteriormente, filtramos os dados de forma que tenhamos estruturas com o código de identificação do ligante gerado pelo BindingDB e que não apresentem erros na representação estrutural ao serem lidas pelo programa MVD (Thomsen & Christensen, 2006). Depois da filtragem, terminamos com 964 estruturas únicas de ligantes do receptor CB2.

Usamos o programa MDM (Thomsen & Christensen, 2006) para selecionar aleatoriamente dois subconjuntos das 964 estruturas. Um chamado de conjunto treino, com 699 (72,5 % dos dados) estruturas e outro denominado conjunto teste com 265 estruturas (28,5 % dos dados). O conjunto treino é a base para a construção dos modelos de aprendizagem de máquina (métodos de regressão) e o conjunto teste é

usado para validar o poder de previsão dos modelos gerados. Além da informação experimental de afinidade, o BindingDB disponibiliza as coordenadas atômicas dos ligantes no formato SDF.

7.5 SIMULAÇÃO DE VIRTUAL SCREENING

Usamos o programa MVD para identificarmos as coordenadas do centro do antagonista AM10257 (9JU). A figura 25 mostra o centro do antagonista AM10257 posicionado no bolsão de ligação do receptor CB2. As coordenadas do centro de massa do antagonista AM10257 são $x = 9,30 \text{ \AA}$; $y = 0,12 \text{ \AA}$; $z = -56,05 \text{ \AA}$.

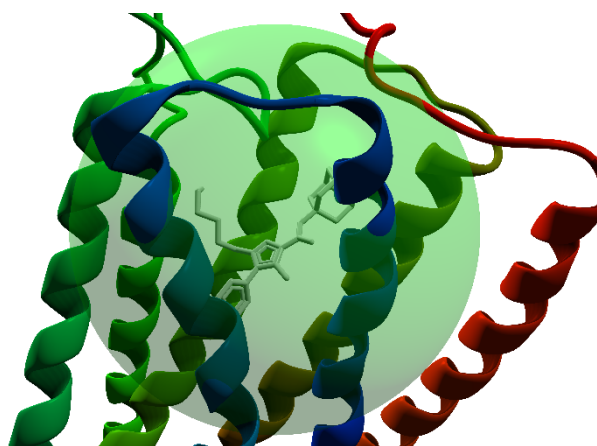


Figura 25. Centro de massa do antagonista AM10257 na estrutura do receptor CB2. Figura gerada pelo programa MVD (Thomsen & Christensen, 2006).

Das coordenadas atômicas originais do receptor CB2, deletamos as moléculas de água e co-fatores usados na cristalização bem como o antagonista AM10257 (9JU). Esta estrutura sem ligantes é que usamos para a simulação de *virtual screening*.

Como destacado, no *virtual screening* usamos o protocolo de *docking* com o algoritmo de otimização da colônia de formigas (*Ant Colony Optimization*, ACO) e a função escore *Moldock Score* do programa MVD. Usamos as 964 estruturas dos ligantes disponíveis do BindingDB. Para todas as poses geradas, calculamos os valores da função *Moldock Score* bem como dos termos energéticos usados para a

sua montagem. Usamos os seguintes termos energéticos calculados pelo MVD: energia intermolecular total (E-inter total), energia intramolecular calculada pela função *piecewise linear potential* (PLP) (KORB *et al.*, 2009) (E-intra (steric)), energia torcional do ligante (E-intra (tors)), energia intramolecular total (E-intra (tors; ligand)), energia intermolecular devido às ligações de hidrogênio (HBond) calculada pela função *piecewise linear potential* (PLP) (BITENCOURT-FERREIRA *et al.*, 2019a), energia intramolecular calculada pelo potencial de Lennard-Jones (E-intra (VdW)) (BITENCOURT-FERREIRA *et al.*, 2019b), energia eletrostática (Electro) (BITENCOURT-FERREIRA *et al.*, 2019c), energia eletrostática considerando interações intermoleculares com distâncias > 4,5 Å (Electro Long), energia intermolecular devido às ligações de hidrogênio sem considerar os ângulos de ligação (NoHBond90) e a energia intermolecular calculada pela função *piecewise linear potential* (PLP) (steric).

Calculamos também descritores moleculares da molécula AM10257 tais como: csp2 (número de carbonos hibridizáveis sp²), csp3 (número de carbonos hibridizáveis sp³), graus de liberdade do ligante (DOF) (*degrees of internal rotational freedom*), número de átomos diferentes de hidrogênio (*Heavy Atoms*), massa molecular (MW), número de átomos de nitrogênio (N), número de átomos de nitrogênio positivamente carregados (Nplus), número de grupos hidroxilas (OH), número de esters e tioesters (OS), número de ângulos de torção do ligante (*Torsions*), número de grupos carbonilas (*carbonyl*) e número de halogênios no ligante (*halogen*). Toda essa informação foi calculada com o programa MVD.

Para avaliar a correlação entre os valores experimentais de afinidade ($\log(K_i)$) e os valores calculados para energia de interação, calculamos os coeficientes de correlação de Spearman (ρ), correlação de Pearson ao quadrado (R^2), RMSE e p-values. Também realizamos essa análise estatística para verificar a correlação dos descritores moleculares e a afinidade experimental. A tabela 1 mostra a análise estatística dos dados.

Tabela 1. Análise estatística do poder de previsão de afinidade dos termos energéticos, funções escores e descritores moleculares.

Função	escore/termo energético/descritor	R²	r	RMSE
Csp2		0,045006	0,213742	18,2074
Csp3		0,050143	-0,231317	20,8708
N		0,030485	0,157279	9,42443
DOF		0,000825	-0,007736	25,3001
E-inter total		0,000513	-0,011592	244,036
E-intra (steric)		0,000107	-0,067052	21,6153
E-intra (tors)		0,004374	-0,061997	64,1489
E-intra (tors; ligand)		0,005517	-0,156665	55,4196
E-intra (vdw)		0,000603	-0,066441	81,3113
<i>MolDock Score</i>		1,1268.10 ⁻⁵	-0,026718	247,157
<i>Electro</i>		0,004010	0,499775	53,3322
<i>Electro Long</i>		0,000279	0,421936	53,0306
HBond		9,80451.10 ⁻⁵	-0,0214776	8,10802
<i>Heavy Atoms</i>		0,000259	0,018052	36,4678
LE1		1,24968.10 ⁻⁵	-0,027392	14,9745
LE3		2,1422.10 ⁻⁶	-0,019744	70,3744
MW		0,005641	0,096632	423,986
N		0,030485	0,157279	9,42443

NoHBond90	0,011683	-0,100694	6,5726
Nplus	1,99988.10 ⁻⁵	0,464273	7,30845
OH	0,000321	0,091932	7,91452
OS	0,002567	0,121276	8,01283
<i>Rerank Score</i>	2,96572.10 ⁻⁵	-0,0232897	1765,07
<i>Steric</i>	0,000523	-0,012692	243,266
<i>Torsions</i>	0,000825	-0,007736	25,3001
VdW	4,57702.10 ⁻⁵	-0,023835	2989,02
<i>Carbonyl</i>	0,009635	0,225771	7,87383
<i>Halogen</i>	0,014810	0,260638	8,07058

Entre as funções escores completas, calculamos além da *Moldock Score*, as funções: eficiência do ligante 1 e 3, (*Ligand Efficiency 1, 3*) (LE1, 3) e *Rerank Score* (Thomsen & Christensen, 2006). A função *Rerank Score* usa uma combinação ponderada dos termos energéticos usados no *Moldock Score* com adição de termo estérico calculado usando um potencial de Lennard-Jones com *piecewise linear potential* (PLP) (KORB *et al.*, 2009). A função LE1 é calculada a partir da função *Moldock Score* dividida pelo número de átomos diferente de hidrogênio presentes na estrutura do ligante. A LE3 é calculada da mesma forma usando a função *Rerank Score*. Uma análise estatística do poder de predição dessas funções escores indica um baixo desempenho para o conjunto de treino, com os coeficientes de correlação de Spearman (ρ) indo de -0,027392 a -0,01974, em módulo o valor mais alto foi observado para a função LE1. O melhor desempenho no *redocking* para função *Moldock Score* não foi conservado para predição de afinidade (figura 26), com um poder de previsão com correlação de -0,026718.

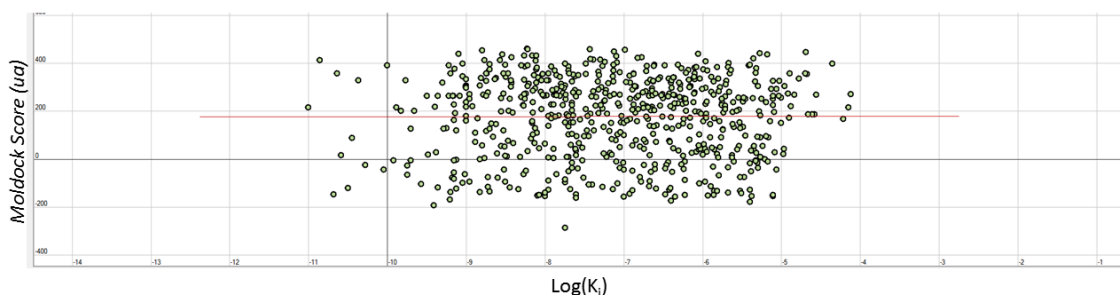


Figura 26. Gráfico de dispersão do valor experimental de $\log(K_i)$ contra o valor de energia previsto pela função Moldock Score em unidades arbitrárias (ua). Figura gerada pelo programa MDM (Thomsen & Christensen, 2006).

Uma análise de todos os termos da tabela 1 indica que os coeficientes de correlação de Spearman (ρ) variam entre -0,231317 a 0,499775, sendo o valor mais alto observado para o termo energético eletrostático (Electro), mas este termo tem um alto valor de RMSE, visto que ele está calibrado para kcal/mol e o RMSE foi calculado para o $\log(K_i)$.

7.6 APRENDIZADO DE MÁQUINA

Para a elaboração do modelo de aprendizado de máquina, usamos os valores calculados para os descritores moleculares e os termos energéticos calculados para todos os ligantes do nosso conjunto de dados. Analisando-se o poder de predição dos 28 parâmetros listados na tabela 1, vemos que temos seis destes que apresentam os maiores valores do coeficiente de correlação de Pearson ao quadrado, são eles: Csp2, Csp3, N, NoHBond90, *carbonyl* e *halogen*. O gráfico de dispersão para Csp3 e $\log(K_i)$ está mostrado na figura 27.

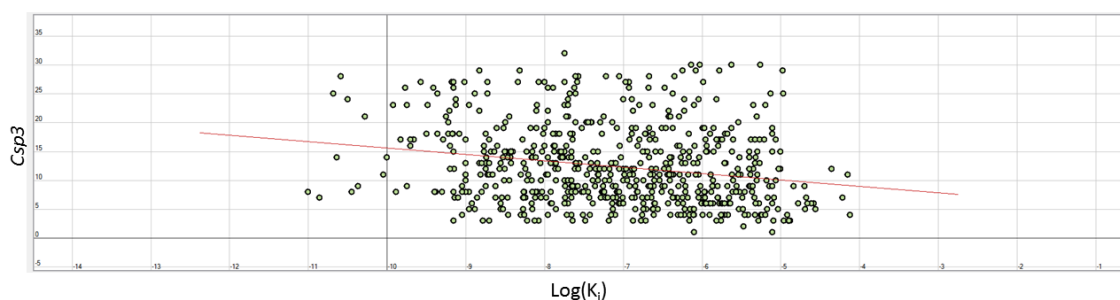


Figura 27. Gráfico de dispersão do valor experimental de $\log(K_i)$ contra o número de carbonos hibridizáveis sp^2 (C_{sp2}). Figura gerada pelo programa MDM (Thomsen & Christensen, 2006).

A relação entre C_{sp3} e $\log(K_i)$ é decrescente, como indica o coeficiente de correlação e Spearman, -0,231317. Considerando-se todos os parâmetros analisados da tabela 1. Dos seis parâmetros com melhor desempenho de R^2 , cinco são descritores moleculares (C_{sp2} , C_{sp3} , N , *carbonyl* e *halogen*) e um é um termo energético que determina a energia intermolecular devido às ligações de hidrogênio sem considerar os ângulos de ligação ($NoHBond90$). Usaremos esses parâmetros como variáveis independentes de um polinômio de regressão como indicado pela equação abaixo,

$$PBA = \alpha_0 + \alpha_1 C_{sp2} + \alpha_2 C_{sp3} + \alpha_3 N + \alpha_4 NoHBond90 + \alpha_5 Carbonyl + \alpha_6 halogen$$

onde PBA é afinidade de ligação prevista (*predicted binding affinity*, PBA), α_0 a constante de regressão e os outros α 's os respectivos pesos das variáveis independentes, também chamadas de variáveis explanatórias ou aspectos (*features*) no jargão de aprendizado de máquina. A variável dependente PBA é também chamada de alvo ou variável resposta.

A partir dos métodos de aprendizados de máquina previamente citados, buscamos um modelo computacional para a predição de afinidade com maiores coeficientes de correlação e menores valores de RMSE, valores experimentais relatados na tabela 2.

Tabela 2. Análise estatística do poder de previsão de afinidade dos modelos de aprendizagem de máquina para o conjunto treino.

Método de Regressão	R^2	r	RMSE
AD Regressor	0,104732	0,305659	1,27759
Bayesian Ridge	0,104660	0,304503	1,27784

Elastic Net	0,092484	0,282018	1,32032
Elastic Net com CV	0,101611	0,299808	1,27977
Huber Regressor	0,104373	0,305879	1,27846
Lars	0,104924	0,306379	1,27730
Lasso	0,050143	0,234023	1,34210
Lasso com CV	0,101539	0,299521	1,27982
LassoLars	0,050143	0,234023	1,34210
Regressão Linear	0,104924	0,306379	1,27730
Linear SVR	0,104463	0,305104	1,27764
MLP Regressor	0,911006	0,956061	0,40312
Nu SVR	0,103841	0,304742	1,27809
Busca Ortogonal Congruente	0,104924	0,306154	1,27730
Regressor Passivo Agressivo	0,028460	0,184457	1,41464
Ridge	0,104919	0,306214	1,27731
Ridge com CV	0,103045	0,301862	1,27890
SGD Regressor	0,075692	0,272908	4,12611
SVR	0,102110	0,303718	1,28260
Theil Sem Regressor	0,073118	0,264043	1,30891

Uma análise da variação do coeficiente de correlação de Spearman indica uma variação entre 0,184457 e 0,956061, sendo o melhor modelo aquele obtido com método de perceptron multicamadas (usamos 200 camadas escondidas neste modelo). O gráfico de dispersão entre os valores previstos e calculados pelo modelo de MLP Regressor está mostrado na figura 28. O modelo gerado por perceptron multicamadas tem um desempenho bem acima dos outros métodos também quando consideramos a análise do R^2 e RMSE. Os p-values para os coeficientes de Spearman e Pearson ao quadrado estão abaixo de 0,001 (p-value < 0,001), o que indica a boa concordância com os dados experimentais.

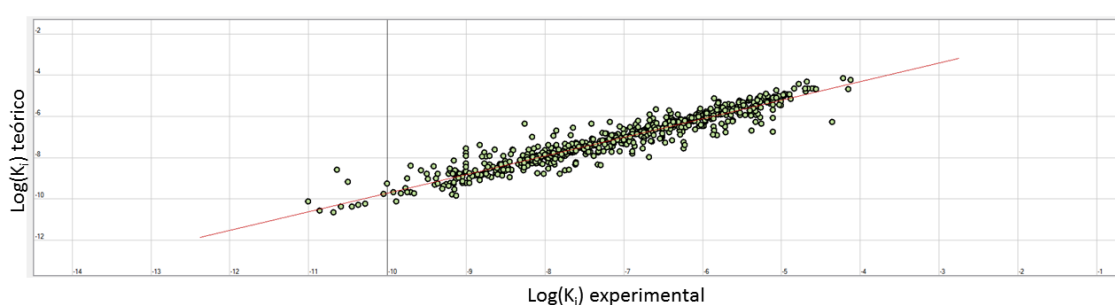


Figura 28. Gráfico de dispersão dos valores experimentais e teóricos de $\log(K_i)$. Os valores teóricos de $\log(K_i)$ foram calculados com o programa SANDRoS (Xavier et al., 2016) usando o método MLP Regressor. Figura gerada pelo programa MDM (Thomsen & Christensen, 2006).

Apesar do desempenho bem superior do modelo gerado por perceptron multicamadas, a análise estatística do desempenho dos modelos com os dados do conjunto treino é apenas um parâmetro. A análise definitiva é o poder de previsão usando os modelos obtidos com o conjunto treino aplicado aos dados do conjunto teste. A tabela 3 traz a análise estatística do desempenho dos modelos com os dados do conjunto teste.

Uma análise dos resultados da tabela 3 indica que os valores de R^2 variam entre 0,001733 e 0,099938 com o melhor desempenho para o método *Bayesian Ridge*. Este método também apresenta o melhor desempenho quando analisado o RMSE (1,14444), com p-value < 0,001. A figura 29 mostra o gráfico de dispersão para o modelo gerado com o método *Bayesian Ridge*. Surpreendentemente o método perceptron multicamadas teve o segundo pior desempenho com o parâmetro R^2 e o

pior desempenho quando avaliamos o RMSE, que indica o quão próximos estão os valores previstos dos experimentais.

Tabela 3. Análise estatística do poder de previsão de afinidade dos modelos de aprendizagem de máquina para o conjunto teste.

Método de Regressão	R²	r	RMSE
AD Regressor	0,093784	0,281342	1,14854
Bayesian Ridge	0,099938	0,290316	1,14444
Elastic Net	0,097998	0,290420	1,17133
Elastic Net com CV	0,090013	0,281059	1,15270
Huber Regressor	0,096747	0,286209	1,14780
Lars	0,095430	0,283106	1,14844
Lasso	0,042108	0,193443	1,20165
Lasso com CV	0,089738	0,280495	1,15286
LassoLars	0,042108	0,193443	1,20165
Regressão Linear	0,095430	0,283106	1,14844
Linear SVR	0,092580	0,280534	1,14947
MLP Regressor	0,012335	-0,056438	17,1504
Nu SVR	0,093647	0,282549	1,14992
Busca Ortogonal Congruente	0,095484	0,283345	1,14840
Regressor Passivo Agressivo	0,001733	0,078188	1,43675

Ridge	0,096045	0,283527	1,14787
Ridge com CV	0,096542	0,287740	1,14943
SGD Regressor	0,057413	0,229317	3,95312
SVR	0,088506	0,268973	1,15886
Theil Sem Regressor	0,093664	0,318139	1,16174

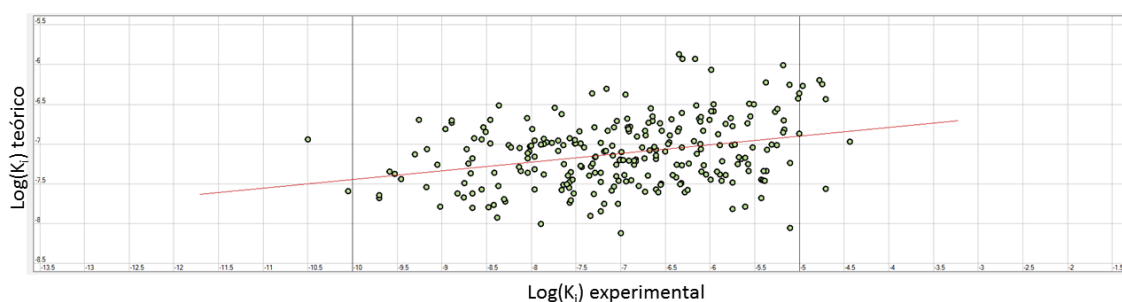


Figura 29. Gráfico de dispersão dos valores experimentais e teóricos de $\log(K_i)$. Os valores teóricos de $\log(K_i)$ foram calculados com o programa SANDRoS (Xavier et al., 2016) usando o método Bayesian Ridge. Figura gerada pelo programa MDM (Thomsen & Christensen, 2006).

A equação de regressão do melhor modelo é mostrada a seguir,

$$PBA = -7,38927 + 0,0213912.Csp2 - 0,0318048.Csp3 + 0,135681.N - 0,0300591.NoHBond90 + 0,0200971.Carbonyl + 0,0132686.halogen$$

O melhor poder previsão do modelo gerado por aprendizado de máquina, quando comparado com funções escores clássicas como o *Moldock Score* e *Rerank Score* tem sido observado consistentemente para diversos sistemas proteína-ligante

distintos e com diferentes funções escores clássicas (PINTRO & AZEVEDO, 2017; HECK *et al.*, 2017; DE ÁVILA *et al.*, 2017; BITENCOURT-FERREIRA & DE AZEVEDO, 2018; LEVIN *et al.*, 2018; DE ÁVILA & DE AZEVEDO, 2018; WÓJCIKOWSKI *et al.*, 2019; BITENCOURT-FERREIRA *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2019; Li & Peng *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2020).

Diante do sucesso de dessa abordagem para previsão de afinidade de ligação e apoiado em dados experimentais de afinidade e cristalográficos nosso laboratório propôs o conceito de espaço de funções escores (HECK *et al.*, 2017). Para entendermos esse conceito, consideremos o espaço de proteínas, formado pelas estruturas de todas as proteínas possíveis (SMITH, 1970). Em seguida visualizemos o espaço químico formado por pequenas moléculas orgânicas com massa molecular e 500 Da (BOHACEK *et al.*, 1996; DOBSON, 2004; KIRKPATRICK & Ellis, 2004; LIPINSKI & HOPKINS, 2004; SHOICHET, 2004; STOCKWELL, 2004). Se escolhermos um elemento do espaço de proteínas, como mostrado na figura 30, por exemplo o receptor CB2 do espaço de proteínas, podemos agora considerar um subconjunto do espaço químico, formado por ligantes do receptor CB2. O espaço de funções escores é um espaço formado por infinitas funções matemáticas que baseadas nas coordenadas atômicas do complexo proteína-ligante pode prever sua afinidade de ligação.

Assim, os métodos de aprendizado de máquina são formas computacionais de vasculharmos o espaço de funções escores e acharmos uma função adequada para o sistema proteico de interesse.

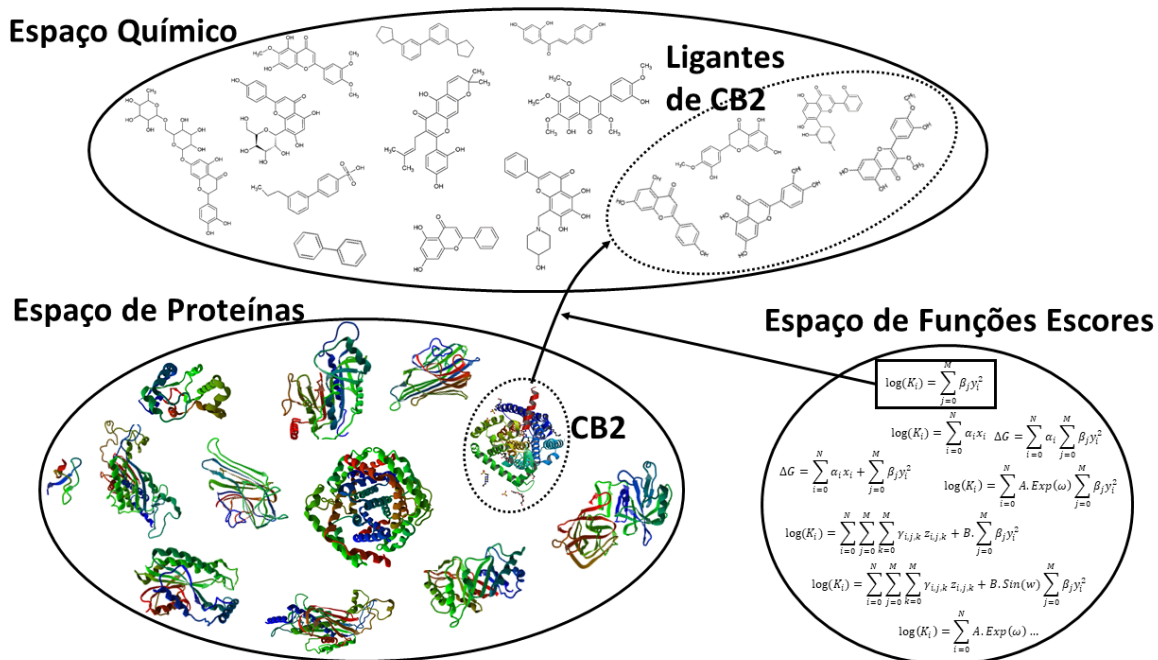


Figura 30. Espaço de funções escores. No diagrama vemos a relação entre um elemento do espaço de proteínas com um subconjunto do espaço químico. O subconjunto do espaço químico representa todos os ligantes de uma dada proteína. O espaço de funções escores traz um conjunto infinito de funções onde temos pelo menos uma adequada para previsão da afinidade de um elemento do espaço de proteínas por um subconjunto do espaço químico.

8. CONCLUSÃO

No presente trabalho aplicamos técnicas computacionais para elaborarmos um modelo teórico para prever a afinidade de ligação pelo receptor CB2. A modulação do CB2 tem o potencial terapêutico em doenças inflamatórias, neurodegenerativas e osteomusculares - sabemos que a ligação do antagonista AM10257 do CB1 e do CB2, como mostrado no redocking (Figura 22), é responsável por prevenir a osteoporose induzida pela ovariectomia em camundongos.

O desenvolvimento de modelos computacionais para prever a afinidade de potencial antagonistas apresenta interesse pois podem acelerar as descobertas de novos antagonistas para o CB2 com potencial terapêutico. Neste trabalho construímos um modelo de aprendizado de máquina com poder de previsão superior a funções escores clássicas usadas para previsão de afinidade proteína-ligante. O objetivo dessa função escore é então não apenas facilitar novas abordagens para simulações de docking e virtual screening como também tornar os resultados advindos desses processos mais confiáveis, específicos e reprodutíveis.

Além disso, usamos a abstração do espaço de funções escores para servir de fundamentação para a nossa nova abordagem computacional. A partir do uso de uma função escore calibrada para o sistema receptor CB2, temos a possibilidade de combinação de *docking* molecular para buscarmos novas moléculas que possam modular a ação do receptor CB2 com grande potencial terapêutico em doenças osteomusculares. Além disso, a abordagem computacional em si novamente validada neste trabalho pode ser usada para qualquer sistema proteico além do receptor CB2, o que nos permite explorarmos o espaço de funções escores para desenvolvermos uma nova geração de modelos computacionais para investigação de fármacos com abordagens de aprendizado de máquina, cada nova função específica para uso com determinada proteína de interesse. Estes resultados e essa nova abordagem permite que em trabalhos futuros o desenvolvimento de fármacos se torne mais seguro e fácil.

8.1. TRABALHOS FUTUROS

A partir do modelo computacional, aqui apresentando, pretendemos usá-lo para varrer bibliotecas de pequenas moléculas para identificar novos possíveis antagonistas do receptor CB2. Outro aspecto a ser explorado é a adequação do

modelo aqui proposto no estudo de ligantes para o receptor CB1. Além disso, iremos testar outras variáveis independentes no modelo computacional com objetivo de gerarmos modelos de aprendizado de máquina com poder de previsão superior ao aqui desenvolvido. A possibilidade de determinar novos ligantes para os receptores de canabinoide, em especial, o receptor canabinoide tipo 2 abre portas para a tentativa de manipular sua expressão visando tratamento da osteoporose ou outras desordens ósseas metabólicas. A idéia de utilizar esses modelos otimizados para triar compostos que possam eventualmente ser extrapolados para testes em bancada com modelos celulares ou animais visando a avaliar sua real ação nas células ósseas e seus benefícios.

REFERÊNCIAS

AHN, Kay; JOHNSON, Douglas S; CRAVATT, Benjamin F. **Fatty acid amide hydrolase as a potential therapeutic target for the treatment of pain and CNS disorders**. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 4, n. 7, p. 763-784, 2009.

ALEXANDRESCU Andrej; SNYDEY, Doug R.; ABILDGAARD, Frits. **NMR of hydrogen bonding in cold-shock protein A and an analysis of the influence of crystallographic resolution on comparisons of hydrogen bond lengths**. *Protein Science*, v. 10, n.9, pg.1856–1868, 2001.

DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira; LECLERC, Sophie; MEIJER, Laurent, HAVLICEK Libor; STRNAD Miroslav; KIM, Sung-Ho. **Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine**. *European Journal of Biochemistry*. v.243, n.1-2, pg. 518–526, 1997.

DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira; DIAS, Raquel. **Computational methods for calculation of ligand-binding affinity**. *Current Drug Targets*, v.9, n.12, pg.1031–1039, 2008.

DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira; DIAS, Raquel. **Evaluation of ligand-binding affinity using polynomial empirical scoring functions**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. v.16, n. 20, pg. 9378–9382, 2008

DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira; **Structure-based virtual screening**. *Current Drug Targets*, v. 11, n. 3, pg. 261–263, 2010

BAB, Itai *et al.* Endocannabinoids and the regulation of bone metabolism. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 20, n. 1, 17 abr. 2008. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01675.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2826.2008.01675.x>. Acesso em: 11 nov. 2019.

BAB, Itai; OFEK, Orr. Targeting the CB2 cannabinoid receptor in osteoporosis. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 135-138, 2011.

BELLIDO, Teresita. Osteocyte apoptosis induce bone resorption and impairs the skeletal response to weightlessness. **International Bone and Mineral Society**, Estados Unidos da América, v. 4, ed. 9, p. 252-256, Setembro 2007.

BELLINI, Giulia *et al.* PKC β II-mediated cross-talk of TRPV1/CB2 modulates the glucocorticoid-induced osteoclast overactivity. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 115, p. 267-274, Jan 2017.

BERGER, Claudie *et al.* Peak Bone Mass From Longitudinal Data:: Implications for the Prevalence, Pathophysiology, and Diagnosis of Osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 9, ed. 25, p. 1948–1957, 8 nov. 2016. DOI 10.1002/jbmr.95. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5101070/>. Acesso em: 10 nov. 2019.

BERMAN, Helen M et al. **The Protein Data Bank**. Nucleic Acids Research. 2000; 28: 235–242.

BERMAN, Helen M et al. **The Protein Data Bank**. Acta Crystallographica Section D, v. 58, pg. 899–907, 2002.

BERMAN, Helen M et al. **The Protein Data Bank**. Nucleic Acids Research, v. 28, n. 1, p. 235-242, 1 Jan 2000

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; AZEVEDO JR, Walter Filgueira de. **Development of a machine-learning model to predict Gibbs free energy of binding for protein-ligand complexes**. Biophysical Chemistry, v. 240, pg. 63–69, 2018.

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; AZEVEDO JR, Walter Filgueira de. **Homology Modeling of Protein Targets with MODELLER**. Methods in Molecular Biology , v. 2053, pg. 231–249, 2019a.

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; AZEVEDO JR, Walter Filgueira de. **How Docking Programs Work**. Methods in Molecular Biology, v. 2053, pg. 35–50, 2019b.

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; AZEVEDO JR, Walter Filgueira de. **Molegro Virtual Docker for Docking**. Methods in Molecular Biology, v. 2053, pg.149–167, 2019c.

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; AZEVEDO JR, Walter Filgueira de. **SAnDRoS: A Computational Tool for Docking**. Methods in Molecular Biology, v. 2053, pg. 51–65, 2019d.

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; AZEVEDO JR, Walter Filgueira de. **Machine Learning to Predict Binding Affinity**. Methods in Molecular Biology. v. 2053, pg. 251–273, 2019e.

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; DA SILVA, Amauri Duarte; AZEVEDO, Walter Filgueira. **Application of Machine Learning Techniques to Predict Binding Affinity for Drug Targets. A Study of Cyclin-Dependent Kinase 2.** Current Medicinal Chemistry. doi: 10.2174/2213275912666191102162959

BITENCOURT-FERREIRA G; VEIT-ACOSTA, Martina; AZEVEDO, Walter Filgueira. **Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes.** Methods in Molecular Biology, v. 2053, pg. 93–107, 2019a.

BITENCOURT-FERREIRA G; VEIT-ACOSTA, Martina; AZEVEDO, Walter Filgueira. **Van der Waals Potential in Protein Complexes.** Methods in Molecular Biology, v. 2053, pg. 79–91, 2019b.

BITENCOURT-FERREIRA G; VEIT-ACOSTA, Martina; AZEVEDO, Walter Filgueira. **Electrostatic Energy in Protein-Ligand Complexes.** Methods in Molecular Biology, v. 2053, pg. 67–77, 2019c.

BOHACEK Regine S.; MCMARTIN, Colin; GUIDA Wayne C. **The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective,** v. 16, n.1, pg. 3-50, 1996.

BONO, Christopher M; EINHORN, Thomas A. Overview of osteoporosis:: pathophysiology and determinants of bone strength.. **European Spine Journal,** [s. l.], v. 12, n. 2, p. s90-s96, 12 ago. 2003. DOI 10.1007/s00586-003-0603-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591823/>. Acesso em: 15 dez. 2019.

BREDA, Ardalá; BASSO, Luiz A.; SANTOS Diógenes S.; AZEVEDO, Walter Filgueira de. **Virtual Screening of Drugs: Score Functions, Docking, and Drug Design.** Current Computer Aided-Drug Design, v. 4, n. 4, pg. 265–272, 2008.

BURGE, Russel *et al.* Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005–2025. **Journal of Bone and Mineral Research,** [s. l.], v. 22, ed. 3, p. 465-475, 2007.

BHUTANI,, Garima; GUPTA, Mahesh Chander. Emerging therapies for the treatment of osteoporosis. **Journal of Mid-life Health,** [s. l.], v. 4, n. 3, Jul-Set 2013. DOI 10.4103/0976-7800.118991. Disponível em: www.jmidlifehealth.org. Acesso em: 11 nov. 2019.

CANDURI, Fernanda; AZEVEDO, Walter Filgueira de. **Protein crystallography in drug discovery.** Current Drug Targets, v. 9, n. 12, pg. 1048–1053, 2008.

CARTER, Percy H *et al.* The Hydrophobic Residues Phenylalanine 184 and Leucine 187 in the Type-1 Parathyroid Hormone (PTH) Receptor Functionally Interact with the Amino-terminal Portion of PTH-(1–34). **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 45, p. 31955-31960, 1999. DOI 10.1074/jbc.274.45.31955. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/274/45/31955.long>. Acesso em: 11 nov. 2019.

CASTELLANO, Daniel *et al.* The Role of RANK-Ligand Inhibition in Cancer:: The Story of Denosumab. **The Oncologist**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 136-145, 2011. DOI 10.1634/theoncologist.2010-0154. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228090/pdf/onc136.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2019.

CAVASOTTO, Claudio N; PHATAK, Sharangdhar S. **Homology modeling in drug discovery: current trends and applications**. Drug Discovery Today, v. 14, n. 13-14, p. 676-683, Jul 2009.

CHAMBERLAIN, Aaron K.; FAHAM, Salem; YOHANNAN, Sarah; BOWIE, James U. **Construction of helix-bundle membrane proteins**. Advances in Protein Chemistry, v. 63, pg. 19–46, 2003.

CHANG, Cheng; EKINS, Sean; BAHADDURI, Praveen. **Pharmacophore-based discovery of ligands for drug transporters**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58, n. 12-13, p. 1431-1450, 30 Nov 2006.

CHANG, Jia-Ming; DI TOMMASO, Paolo; TALY, Jean-François; NOTREDAME, Cedric. **Accurate multiple sequence alignment of transmembrane proteins with PSI-Coffee**. BMC Bioinformatics, v. 13, n. 4, pg. S1, 2012.

COMAN, Roxanna *et al.* **The contribution of naturally occurring polymorphisms in altering the biochemical and structural characteristics of HIV-1 subtype C protease**. Biochemistry, v. 47, n.2, pg. 731-743, 2008.

CONSOLE-BRAM, Linda; MARCU, Jahan; ABODD, Mary E. **Cannabinoid Receptors: Nomenclature and Pharmacological Principles**. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 38, n. 1, p. 4-15, 2 Jul 2002.

COSMAN, Felicia *et al.* Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 375, p. 1532-1543, Out 2016. DOI 10.1056/NEJMoa1607948. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1607948>. Acesso em: 11 nov. 2019.

CURREY, John D. **Bones: Structure and Mechanics**. Estados Unidos da América: Princeton University Press, Julho 2006. 456 p. ISBN 9780691128047.

DESJARLAIS, Renee L.; DIXON, J. Scott. **A shape- and chemistry-based docking method and its use in the design of HIV-1 protease inhibitors**, v. 8, pg. 231–242, 1994.

DA SILVA, Amauri Duarte; BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Taba: A Tool to Analyze the Binding Affinity**. Journal Computer Chemistry, v. 41, n. 1, pg. 69-73, 2020.

DE ÁVILA, Maurício Boff; AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Development of machine learning models to predict inhibition of 3-dehydroquinase dehydratase**. Chem Biol Drug Des. 2018; 92: 1468–1474.

DE ÁVILA, Maurício Boff; XAVIER, Mariana Morrone; PINTRO, Val Oliveira; DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Supervised machine learning techniques to predict binding affinity. A study for cyclin-dependent kinase 2**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 494, pg. 305–310, 2017.

DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira et al. **Determining the structural basis for specificity of ligands using crystallographic screening**. Cell Biochemistry and Biophysics, v. 44, n. 3, pg. 405–411, 2006.

DELATORREA, Plinio; DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Simulation of electron density maps for two-dimensional crystal structures using Mathematica**. Journal of Applied Crystallography, v. 34, n. 5, pg. 658–660, 2001.

DELMAR, Jared A.; BOLLA, Janny Reddy; SU, Chih-Chia; YU, Edward. **Crystallization of membrane proteins by vapor diffusion**. Methods in Enzymology, v. 557, pg. 363–392, 2015.

DHOPESHWARKAR, Amey; MACKIE, Ken. **CB2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target—What Does the Future Hold?**. Molecular Pharmacology, v. 86, n. 4, p. 430-437, Oct 2014.

DI MARZO, Vincenzo; DE PETROCELLIS, Luciano. **Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?**. Philosophical Transactions of the Royal Society B, v. 367, n. 1607, p. 3216-3228, 2012.

DI MARZO, Vincenzo; PISCITELLI, Fabiana. **The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids**. *Neurotherapeutics*, v. 12, n. 4, p. 692-698, 14 Ago 2015.

DOBSON, Christopher M. **Chemical space and biology**. *Nature*, v. 432, n. 7019, pg. 824–828., 2004

ELPHICK, Maurice R; EGERTOVÁ, Michaela. **The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 356, n. 1407, p. 381-408, 2001.

ELPHICK, Maurice; EGERTOVÁ, Michaela . **The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Londres*, v. 367, n. 1607, p. 3201-3215, 2012.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. European Medicines Agency recommends limiting long-term use of calcitonin medicines: Intranasal formulation for osteoporosis treatment to be withdrawn; new restriction to indication for injectable use in Paget's disease.. **European Medines Agency**, Londres, p. 1-2, 20 jul. 2020.

FADEL, Valmir et al. **Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus***. *Toxicon*, v. 46, n. 7, pg. 759–767, 2005.

GALIEGUE, Sylvainne; MARCHAND, Jean; SOPHIE, Mary. **Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations**. *European Journal of Biochemistry*, v. 232, p. 54-61, 1995.

GARCIA, Arnau Busquets; SORIA-GOMEZ, Edgar; BELLOCCHIO, Luigi. **Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas**. *F1000 Faculty Rev*, v. 5, n. 990, 24 Mai 2016.

GOESSLING, Wolfram *et al.* Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. **Cell**, [s. l.], v. 136, n. 6, p. 1136–1147, Mar 2009.

GUGLIELMI, Giuseppe *et al.* Integrated Imaging Ap-proach to Osteoporosis:: State-of-the-Art Review and Update. **RadioGraphics**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 1343-1364, Set/Out 2011.

HALL, John. **Textbook of Medical Physiology**. 12. ed. Filadélfia: Elsevier, 2011. 957-960 p. ISBN 978-08089-2400-5.

HEBERLÉ, Graziela; DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations**. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 9, pg. 1339–1352, 2011.

HECK, Gabriela S. **Supervised Machine Learning Methods Applied to Predict Ligand-Binding Affinity**. *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 23, pg. 2459–2470, 2017.

HOFFMANN, Brice; STOVEN, Veronique; JACOB, Laurent. **Virtual screening of GPCRs: An in silico chemogenomics approach**. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 363, 6 Set 2008

HOW Much Calcium Do You Need?. *In: Calcium and Vitamin D*. [S. l.]: National Osteoporosis Foundation, 2018. Disponível em: <https://www.nof.org/patients/treatment/calciumvitamin-d/>. Acesso em: 10 nov. 2019.

HSIEH, Gin C et al. **Central and peripheral sites of action for CB2 receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats**. *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n. 2, p. 428-440, Jan 2011.

HUA Tian et al. **Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1**. *Cell*, v. 167, n. 3, pg. 750–762, 2016.

HUA, Tian et al. **Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB1**. *Nature*, v. 547, n. 7664, pg. 468–471, 2017.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. **VMD: Visual Molecular Dynamics**. *The Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 14, n. 1, pg. 33–38, 1996.

IDRIS, Aymen *et al.* Regulation of bone mass, osteoclast function, and ovariectomy-induced bone loss by the type 2 cannabinoid receptor. **Endocrinology**, [s. l.], v. 149, n. 11, p. 5619-5626, Jul 2008. DOI doi: 10.1210/en.2008-0150. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635663>. Acesso em: 10 nov. 2019.

IDRIS, Aymen *et al.* Cannabinoid Receptor Type 1 Protects against Age-Related Osteoporosis by Regulating Osteoblast and Adipocyte Differentiation in Marrow Stromal Cells. **Cell: Metabolism**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 139-147, 2009. DOI 10.1016/j.cmet.2009.07.006. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-metabolism/pdf/S1550-4131\(09\)00202-2.pdf](https://www.cell.com/cell-metabolism/pdf/S1550-4131(09)00202-2.pdf). Acesso em: 10 nov. 2019.

ISHCHENKO, Andrii; ABOLA, Enrique E.; CHEREZOV, Vadim. **Crystallization of Membrane Proteins: An Overview**. *Methods in Molecular Biology*, v. 1607, pg. 117–141, 2017.

JANCARIK, Jarmila; KIM, Sung-Hou. **Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins**. *Journal of Applied Crystallography*, v. 24, pg. 409–411, 1991.

JIANG, Yebin *et al.* Recombinant Human Parathyroid Hormone (1–34) [Teriparatide] Improves Both Cortical and Cancellous Bone Structure. **Journal of Bone and Mineral Research**, [s. l.], 2 dez. 2009. DOI 10.1359/jbmr.2003.18.11.1932. Disponível em: <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.11.1932>. Acesso em: 10 nov. 2019.

JILKA, Robert L. *et al.* Increased Osteoclast Development After Estrogen Loss: Mediation by Interleukin-6. **Science**, [s. l.], v. 257, n. 5066, p. 88-91, 1992.
KAMIYA, Nobuhiro *et al.* BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. **Development**, [s. l.], v. 135, n. 22, p. 3801-3811, Nov 2008.

KANG, Hae Joo; LEE, Chiara; DREW, David. **Breaking the barriers in membrane protein crystallography**. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, n. 3, pg. 636–644, 2013.

KHILNANI, Gurudas ; KHILNANI, Ajeet Kumar. **Inverse agonism and its therapeutic significance**. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 43, n. 5, p. 492-501, Set/Out 2011.

KIRKPATRICK, Peter; ELLIS, Clare. **Chemical Space**. *Nature*, v. 432, n.823, 2004.

KIRYS, Tatsiana *et al.* **Correlation analysis of the side-chains conformational distribution in bound and unbound proteins**. *BMC Bioinformatics*.v. 13, pg. 236, 2012.

KLING, Juliana M; CLARKE, Bart L; SANDHU, Nicole P. **Osteoporosis Prevention, Screening, and Treatment: A Review**. *Journal of Women's Health*, v. 23, n. 7, p. 563-572, 2014.

KOCH, Marco. **Cannabinoid Receptor Signaling in Central Regulation of Feeding Behavior: A Mini-Review**. *Frontiers in Neuroscience*, v. 11, n. 293, 24 Mai 2017.

KORB, Oliver; STÜTZLE, Thomas; EXNER, Thomas E. **Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS**. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n. 1, pg. 84–96, 2009.

LASKOWSKI, Roman; SWINDELLS, Mark. **LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery**. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 51, n. 10, pg. 2778–2786, 2011.

LEVIN, Nayara M.B.; PINTRO, Val Oliveira; BITENCOURT-FERREIRA G, MATTOS Bruna B.; SILVÉRIO, Ariadne de Castro, DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Development of CDK-targeted scoring functions for prediction of binding affinity**. *Biophysical Chemistry*, v. 235, pg. 1–8, 2018.

LI, Hongjian et al. **Classical scoring functions for docking are unable to exploit large volumes of structural and interaction data**. *Bioinformatics*, v. 35, n. 20, pg. 3989–3995, 2019.

LI, Jin, FU, Ailing; ZHANG, Le. **An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking**. *Interdisciplinary Science Reviews*, v. 11, n. 2, pg. 320–328, 2019.

LI, Xiaoting et al. **Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2**. *Cell*, v. 176, n. 3, pg. 459–467, 2019.

LIU, Tinquan et al. **BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities**. *Nucleic Acids Research*, v. 35, pg. D198–D201, 2007.

LIPINSKI, Christopher; HOPKINS, Andrew. **Navigating chemical space for biology and medicine**. *Nature*, v. 432, n. 7019, pg. 855–861, 2004.

LORENZETTI, Valentina et al. **The Neurobiology of Cannabis Use Disorders: A Call for Evidence**. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 10, p. 86, 10 Mai 2016.

LU, Hu-Chen; MACKIE, Ken. **An introduction to the endogenous cannabinoid system**. *Biological Psychiatry*, v. 79, n. 7, p. 516–525, 2016.

MANOLAGAS, Stavros C. *et al.* The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. **Nature: Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 699–712, Dez 2013.

MALFITANO, Anna Maria et al. **What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2)**. *Seminars in Immunology*, 7 Abr 2014.

MARESZ, Katarzyna et al. **Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli**. *Journal of Neurochemistry*, v. 95, p. 437- 445, 2005.

MARINO, Silvia; IDRIS, Aymen I. **Emerging therapeutic targets in cancer induced bone disease: A focus on the peripheral type 2 cannabinoid receptor**. *Pharmacological Research*, v. 119, p. 391-403, Mai 2017.

MENDES, Yasmine Bitencourt Emílio *et al.* Analysis of skeletal maturation in patients aged 13 to 20 years by means of hand wrist radiographs. **Dental Press Journal of Orthodontics**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 74-79, Jan/Fev 2010.

MIGLIACCIO, Silvia *et al.* N. Glucocorticoid-induced osteoporosis:: An osteoblastic disease. **Aging Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 5-10, Jun 2007.

MILLÁN, Marta Martín. The Role of Estrogen Receptor in Bone Cells. **Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 105-112, 7 jul. 2015.

MORA, Stefano *et al.* Establishment of peak bone mass. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, [s. l.], v. 32, p. 39-63, 2003.

MORALES, Paula; HERNANDEZ-FOLGADO, Laura; GOYA, Pilar. **Cannabinoid receptor 2 (CB2) agonists and antagonists: a patent update**. *Exper Opinon on Therapeutic Patents*, 25 Mai 2016.

MOREIRA, Linda Denise Fernandes *et al.* Physical exercise and osteoporosis:: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 514-522, 2014.

MOREIRA, Carolina A *et al.* Effects of abaloparatide-SC (BA058) on bone histology and histomorphometry:: The ACTIVE phase 3 trial. **Bone**, [s. l.], v. 97, p. 314-319, Abril 2017.

MOULIN, Dwight et al. **Pharmacological management of chronic neuropathic pain: Revised consensus statement from the Canadian Pain Society**. *Journal of Canadian Pain Society*, v. 19, n. 6, p. 328-335, 6 Nov/Dez 2014.

NAGY, Vanja; PENNINGER, Josef M. The RANKL-RANK Story. **Gerontology**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 534-542, 14 fev. 2015. DOI 10.1159/000371845. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000371845>. Acesso em: 10 nov. 2019.

NUTI, Ranuccio *et al.* Guidelines for the management of osteoporosis and fragility fractures. **Internal and Emergency Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 85, p. 85-102, 2019.

OGAWA, Shintaro; KUNUGI, Hiroshi. **Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase and Monoacylglycerol Lipase: New Targets for Future Antidepressants**. *Current Neuropharmacology*, v. 13, n. 6, p. 760-775, Dez 2015.

PARK, Psh. **Ensemble of G Protein-Coupled Receptor Active States**. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 8, p. 1146-1154.

PEDREGOSA, Fabian *et al.* **Scikit learn: Machine Learning in Python**. *The Journal of Machine Learning Research*, v. 12, pg. 2825–2830, 2011.

PERTWEE, Roger *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. **Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂**. *Pharmacological Review*, v. 62, n. 4, p. 588-631, 6 Dez 2010.

PINTRO, Val Oliveira; DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Optimized Virtual Screening Workflow. Towards Target-Based Polynomial Scoring Functions for HIV-1 Protease**. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 20, n. 9, pg. 820–827, 2017.

PORTER, Joanne L. **Crystallization of diene lactone hydrolase in two space groups: structural changes caused by crystal packing**. *Acta Crystallographic Section F Structural Biology Communications*, v. 70, pg. 884–889, 2014.

QASEEM, Amir *et al.* Treatment of Low Bone Density or Osteoporosis to Prevent Fractures in Men and Women:: A Clinical Practice Guideline Update from the American College of Physicians. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 166, n. 11, p. 818-839, 5 dez. 2017. DOI 10.7326/M15-1361. Disponível em: Downloaded From: <http://annals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/journals/aim/0/> on 05/12/2017. Acesso em: 11 nov. 2019.

RADOMINSKIA, Sebastião Cezar *et al.* Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 57, ed. s2, p. s452-s466, 2017.

RAGGATT, Liza *et al.* Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 33, p. 25103-25108, 2010.

REDDY, Ch Surendhar et al. **Homology modeling of membrane proteins: A critical assessment.** *Computational Biology Chemistry*, v. 30, n. 2, p. 120-126, Abr 2006.

REDDY, Doodipala Samba; GOLUB, Victoria M. **The Pharmacological Basis of Cannabis Therapy for Epilepsy.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 357, n. 1, p. 45-55, Abr 2016.

ROSENBERG, Evan C et al. **Cannabinoids and Epilepsy.** *Neurotherapeutics*, v. 12, n. 4, p. 747-768.

ROSSI, Francesca *et al.* The Endocannabinoid/Endovanilloid System in Bone:: From Osteoporosis to Osteosarcoma. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, p. 1919, 18 abr. 2019. DOI 10.3390/ijms20081919. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/8/1919>. Acesso em: 11 nov. 2019.

RUSSO, Silvana; DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Advances in the Understanding of the Cannabinoid Receptor 1 - Focusing on the Inverse Agonists Interactions.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 26, n.10, pg. 1908–1919, 2019.

RUSSO Silvana; DE AZEVEDO JR., Walter Filgueira. **Computational Analysis of Dipyrone Metabolite 4-Aminoantipyrine as a Cannabinoid Receptor 1 Agonist.** *Current Medicinal Chemistry*. doi: 10.2174/0929867326666190906155339

RUSSOW, Gabrielle *et al.* Anabolic Therapies in Osteoporosis and Bone Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 1, Dez 2018. DOI 10.3390/ijms20010083. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20010083>. Acesso em: 10 nov. 2019.

SÁNCHEZ, Roberto; SALI, Andrej. **Advances in comparative protein-structure modelling.** *Current Opinion in Structural Biology*, v. 7, n. 2, p. 206-214.

SADHU, Sunita K; HAMPSON, Geeta. The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. **Journal of Clinical Pathology**, Estados Unidos da América, n. 64, ed. 12, p. 1042-1050, 6 ago. 2011. DOI 10.1136/jcp.2010.077842. Disponível em: <https://jcp.bmj.com/>. Acesso em: 10 set. 2019.

SCHNATZ, Peter F. *et al.* Osteoporosis screening and treatment guidelines: are they being followed?. **Menopause**: : The Journal of The North American Menopause Society, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 1072/1078, 2011. DOI 10.1097/gme.0b013e318215101a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21753740>. Acesso em: 10 nov. 2019.

SCHNEIDER, Gisbert; BARIHGHAUS, Karl-Heinz. **Molecular Design. Concepts and Applications**. WILEY-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 2008.

SEEMAN, Ego; DELMAS, Pierre D. **Bone Quality**: The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *The New England Journal of Medicine*, 2006. Figura.

SHAO, Zhenhua et al. **High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor**. *Nature*, v. 540, n. 7634, pg. 602–606, 2016.

SHAO, Zhenhua et al. **Structure of an allosteric modulator bound to the CB1 cannabinoid receptor**. *Nature Chemical Biology*, v. 15, n. 12, pg. 199–1205, 2019.

SHANE, Elizabeth; KHOSLA, Sundeep; BURR, David. **Osteonecrosis of the Jaw and Atypical Femoral Fractures**. *Osteoporosis*, 2013. Fotos. Disponível em: *Osteoporosis*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00081-9>. Acesso em: 15 nov. 2019.

SHOICHET, Brian K. **Virtual screening of chemical libraries**. *Nature*, v. 432, n. 7019, pg. 862–865, 2004.

SHETTY, Sahana et al. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 846-852, 2016.

SMITH, John Maynard. **Natural selection and the concept of a protein space**. *Nature*, v. 225, n. 5232, pg. 563–564, 1970.

SMITH RD, Clark JJ, Ahmed A, Orban ZJ, Dunbar JB Jr, Carlson HA. **Updates to Binding MOAD (Mother of All Databases): Polypharmacology Tools and Their Utility in Drug Repurposing**. *Journal of Molecular Biology*, v. 431, n. 13, pg. 2423-2433, 2019.

SOPHOCLEOUS, Antonia et al. The type 2 cannabinoid receptor (CB2) protects against age-related osteoporosis by affecting bone formation and CB2 agonists exhibit anabolic activity in vivo. **Bone**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. s219, Jun 2009. DOI 10.1016/j.bone.2009.03.059. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S875632820900595X?via%3Di> hub. Acesso em: 5 nov. 2019.

SÖZEN, Tümay; ÖZİŞİK, Lale; BAŞARAN, Nursel Çalık. **An overview and management of osteoporosis**. *European Journal of Rheumatology*, v. 4, p. 46-56, Dez 2016.

STOCKWELL, Brent R. **Exploring biology with small organic molecules.** Nature, v. 432, n. 7019, pg. 846–854, 2004.

STROUSE, Thomas B. Cannabinoids in Medical Practice. Cannabis and Cannabinoid Research, v. 1, n. 1, p. 38-43, 14 Jan 2016. TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading.** Journal of Computational Chemistry, v. 30, p. 455-461, 30 Jan 2010.

TIBSHIRANI Robert. **Regression shrinkage and selection via the lasso.** Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), v.58, n.1, p267-288, 1996.

TIKHONOV, Andrei Nikolaevich. **On the regularization of ill-posed problems.** Dokl. Akad. Nauk SSSR, v. 153, pg. 49–52, 1963.

THOMSEN R, Christensen MH. **MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking.** Journal of Medical Chemistry, v. 49, n. 11, pg. 3315–3321, 2006.

UCHÔA, Hugo Brandão et al. **Parmodel: a web server for automated comparative modeling of proteins.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 325, n. 4. pg. 1481–1486, 2004.

VON HEIJNE, Gunnar. **Membrane proteins: from bench to bits.** Biochemical Society Transactions, v. 39, n. 3, pg. 747–750, 2011.

WANG Lin et al. **Structural Basis for Neutralization and Protection by a Zika Virus-Specific Human Antibody.** Cell.Reports, v. 26, n. 12, pg. 3360–3368, 2019.

WANG, Renxiao et al. **The PDBbind database: methodologies and updates.** J Medicinal Chemistry, v. 48, n.12, pg. 4111–4119, 2005.

WATSON, Helen. **Biological Membranes. Essays in Biochemistry.** Portland, v. 59, p. 43-69, 15 Nov 2015.

WESTBROOK, John et al. **The Protein Data Bank and structural genomics.** Nucleic Acids Research, v. 31, pg. 489–491, 2003

WHITE, Stephen H.; VON HEIJNE, Gunnar. **Transmembrane helices before, during, and after insertion.** *Current Opinion in Structural Biology*, v. 15, n. 4, pg. 378–386, 2005.

WÓJCIKOWSKI, Maciej et al. **Building Machine-Learning Scoring Functions for Structure-Based Prediction of Intermolecular Binding Affinity.** *Methods in Molecular Biology*, v. 2053, pg. 1–12, 2019.

XAVIER, Mariana Morrone et al. **SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions.** *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 19, n/10, pg. 801–812, 2016.

ZAR, Jerrold H. **Significance testing of the Spearman rank correlation coefficient.** *Journal of the American Statistical Association*, v. 67, pg. 578–580, 1972.

YOU, Haitao et al. **Functional characterization and analgesic effects of mixed cannabinoid receptor/T-type channel ligands.** *Molecular Pain*, v. 7, n. 89, Nov 2011.

ZOU H, Hastie T. **Regularization and variable selection via the elastic net.** *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.*, 2005; 67(2): 301–220.

ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO

Artigo submetido ao periódico “Current Medicinal Chemistry” de responsabilidade da Bentham Science Publishers, Inc. Publicado em maio 2020, PMID: 32410551, DOI: 10.2174/0929867327666200515101820

Título: **“Development of Machine Learning-Based Scoring Functions with SAnDReS”**.

Fator de Impacto: 3.894

Site do periódico: <https://benthamscience.com/journals/current-medicinal-chemistry/>



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br