

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
VERIDIANA GUENIFER BORGES

**ESTUDOS *IN SILICO* DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE
ALGUNS FÁRMACOS RELACIONADOS COM A OBESIDADE E
POTENCIAIS RECEPTORES-ALVO**

São Carlos

2021

VERIDIANA GUENIFER BORGES

**ESTUDOS *IN SILICO* DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE
ALGUNS FÁRMACOS RELACIONADOS COM A OBESIDADE E
POTENCIAIS RECEPTORES-ALVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Eyre Gabriel

São Carlos

2021

Guenifer Borges, Veridiana
Estudos *in silico* da formação de complexos de alguns fármacos relacionados com a obesidade e potenciais receptores-alvo / Veridiana Guenifer Borges -- 2021.
54f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Jane Eyre Gabriel
Banca Examinadora: Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo,
Ignez Caracelli Bibliografia

1. Melatonina. 2. Docagem molecular. 3. Receptor alfa-2A
adrenérgico. I. Guenifer Borges, Veridiana. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325

VERIDIANA GUENIFER BORGES

**ESTUDOS *IN SILICO* DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE
ALGUNS FÁRMACOS RELACIONADOS COM A OBESIDADE E
POTENCIAIS RECEPTORES-ALVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

LOCAL: ONLINE

DATA: 09/11/2021

HORÁRIO: 14:00h

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

Profa. Dra. Ignez Caracelli
Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

São Carlos

2021

Dedicatória

Aos meus pais, Luiz e Conceição, pelo amor, paciência e por serem um pilar em minha vida.

Ao meu tio José, pelos conselhos e amizade.

Ao meu companheiro Lucas, pela amizade, conselhos e força.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Jane Eyre Gabriel, pela orientação, disposição, incentivo e exemplo.
Agradeço pelo apoio, dedicação, paciência e amizade.

À Profa. Dra. Ignez Caracelli, pelo exemplo e colaboração.

Ao Grupo de Estudos em Biologia Computacional e Bioinformática “Bio-in-Bytes”.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, os quais são exemplos de dedicação e me ensinaram a ser uma pessoa mais perseverante.

À minha família, por acreditarem em meu potencial e por todo o suporte.

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde mundial crescente em todas as faixas etárias nas mais diversas localizações geográficas e em todos os níveis socioeconômicos, que afeta inúmeras funções fisiológicas, aumentando os riscos do desenvolvimento de *diabetes melitus*, doenças cardiovasculares, diversos tipos de tumores, distúrbios musculoesqueléticos, e impactando negativamente a saúde mental humana. Algumas drogas anorexígenas ou redutoras de apetite vêm sendo administradas para promover a redução do índice de massa corporal e o controle da obesidade. Sob este contexto, há um grande interesse em investigar a formação de novos complexos ligantes-receptores associados a possíveis efeitos positivos sobre a melhora do estado obeso. Assim, o objetivo geral do presente estudo foi investigar por análises de docagem molecular, a formação de complexos dos ligantes mazindol, sibutramina e melatonina, fármacos sabidamente relacionados com o controle e o tratamento da obesidade, e de seus potenciais receptores-alvo correlatos. As diferentes etapas estabelecidas no procedimento experimental deste estudo foram agrupadas em três eixos principais: a) seleção e busca das estruturas 3D dos fármacos ligantes a partir do banco de dados DrugBank; b) seleção e obtenção das estruturas 3D de potenciais proteínas receptoras-alvo correlatas empregando as ferramentas computacionais STRING, protein BLAST, e o banco de dados de proteínas PDB; e c) ensaios de docagem molecular para caracterização dos complexos dos ligantes de interesse e das proteínas receptoras-alvo selecionadas utilizando o servidor AutoDock4.0. Entre todos os fármacos testados no presente estudo, foram identificados alto escore de confiabilidade e similaridade significativa apenas entre o receptor de melatonina do tipo 1B e a sequência proteica do receptor alfa-2A adrenérgico. Sendo assim, as análises de docagem molecular foram realizadas a partir da formação do complexo do ligante melatonina e de duas estruturas cristalográficas referentes ao receptor alfa-2A adrenérgico acoplado a um antagonista (ID PDB 6kux) e a um agonista parcial (ID PDB 6kuy) disponíveis no banco de dados PDB. Resultados *in silico* demonstraram valores de energia livre de ligação de -6,79 e -6,98 kcal/mol para os receptores adrenérgicos 6kux e 6kuy, respectivamente. Ainda, a ocorrência de interações intermoleculares não covalentes do tipo ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas foi revelada durante a formação dos complexos melatonina-receptores alfa-2A adrenérgicos de interesse. Descobertas experimentais preliminares descritas na literatura têm revelado uma possível interação do neurohormônio melatonina e receptores adrenérgicos com potenciais efeitos hipotensivos oculares em coelhos. Desta forma, as descobertas descritas no presente estudo parecem sugerir a ocorrência de um complexo melatonina-receptor alfa-2A adrenérgico, demonstrando valores de energia satisfatórios e estabilidade estrutural por interações intermoleculares não covalentes nas análises de docagem molecular. Entretanto, baseado no caráter meramente preditivo dos dados preliminares apresentados no presente estudo, destaca-se a necessidade de estabelecer futuros procedimentos para assegurar a validação experimental do complexo melatonina-receptor alfa 2A adrenérgico, bem como para testar a viabilidade biológica desta interação ligante-receptor de interesse e seus potenciais efeitos positivos sobre a melhora do estado obeso.

Palavras-chave: energia livre de ligação, docagem molecular, interações, melatonina, receptor alfa-2A adrenérgico.

ABSTRACT

Obesity is a global health problem in the most diverse geographic locations at all socioeconomic levels that affects several physiological functions and increases the risk of cardiovascular diseases, tumors, musculoskeletal and mental disorders. Some anorectic or appetite-reducing drugs have been administered to promote the reduction of body mass index and to control the obesity. Within this context, a major challenge has been to identify the formation of new complexes ligand-receptor associated with possible positive effects on the improvement of the obese state. Thus, the present study aimed to investigate *in silico* the formation of complexes of the ligands mazindol, sibutramine and melatonin, drugs related to control and prevention of the obesity, and their potential receptors targeted by molecular docking analyses. The different steps established in this experimental procedure were grouped into three main axes: a) search and selection of 3D structures of the drugs of interest from database DrugBank; b) search and selection of 3D structures of potential protein sequences of receptor-targeted using STRING, protein BLAST, and database PDB; and c) characterization of the formation of the complexes between ligands of interest and receptor-targeted using AutoDock4.0 server by molecular docking analyses. Among all drugs tested in the present study, high reliability score and significant similarity were only identified between type 1B melatonin and alpha-2A adrenergic receptors. Thus, molecular docking assays were carried out using ligand melatonin and crystallographic structures of the alpha-2A adrenergic receptor coupled to an antagonist (ID PDB 6kux) and a partial agonist (ID PDB 6kuy) available in the database PDB. *In silico* results demonstrated values of binding energy of -6.79 and -6.98 kcal/mol for 6kux and 6kuy adrenergic receptors, respectively. Furthermore, the presence of non-covalent intermolecular interactions, such as hydrogen bonds and hydrophobic interactions, were revealed in the formation of complexes between melatonin and both alpha-2A adrenergic receptors of interest. Preliminary experimental findings described in the literature have revealed a possible interaction of the neurohormone melatonin to adrenergic receptors, indicating its ocular hypotensive effects in rabbits. The findings predicted in the present study suggest the formation of complexes between melatonin and alpha-2A adrenergic receptor by molecular docking analyses, showing satisfactory energy values and structural stability by non-covalent intermolecular interactions. Based on the preliminary data predicted in this study, additional procedures must be established to ensure the experimental validation of the complex melatonin-alpha 2A adrenergic receptor, as well as to test the biological viability of this interaction ligand-receptor of interest and its positive effects on the improvement of the obese state.

Keywords: binding energy, molecular docking, interactions, melatonin, alpha-2A adrenergic receptor.

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura molecular do cloridrato de sibutramina monoidratado	14
Figura 2 - Estrutura molecular do mazindol	17
Figura 3 - Estrutura molecular da melatonina	18
Figura 4 - Esquema ilustrativo dos benefícios da suplementação da melatonina e modulação decorrente de sua suplementação sobre a melhora do estado obeso....	20
Figura 5 - Representação esquemática de duas abordagens principais envolvidas nas análises de docagem molecular	22
Figura 6 - Etapas gerais envolvidas nas análises de docagem molecular	23
Figura 7 - Rede global gerada pela ferramenta computacional STRING para a sequência do receptor de melatonina do tipo 1A	33
Figura 8 - Rede global gerada pela ferramenta computacional STRING para a sequência do receptor de melatonina do tipo 1B	34
Figura 9 - Rede global gerada pela ferramenta computacional STRING para a sequência do receptor de dopamina sódio-dependente.....	35
Figura 10 - Rede global gerada pela ferramenta computacional STRING para a sequência do receptor de serotonina sódio-dependente.....	36
Figura 11 - Representação gráfica da formação do complexo ligante melatonina e receptores alfa-2A adrenérgicos	39
Figura 12 - Representação gráfica bidimensional dos tipos de interações pós-docagem do complexo alfa-2A adrenérgico 6KUX e ligante melatonina.....	41
Figura 13 - Representação gráfica bidimensional dos tipos de interações pós-docagem do complexo alfa-2A adrenérgico 6KUY e ligante melatonina.....	42

Lista de tabelas

Tabela 1 - Proteínas correlatas ao receptor de melatonina do tipo 1A testadas por análises da ferramenta STRING	33
Tabela 2 - Proteínas correlatas ao receptor de melatonina do tipo 1B testadas por análises da ferramenta STRING	34
Tabela 3 - Proteínas correlatas ao transportador de dopamina sódio-dependente, testadas por análises da ferramenta STRING.....	35
Tabela 3 - Proteínas correlatas ao transportador de serotonina sódio-dependente, testadas por análises da ferramenta STRING.....	36

Lista de quadros

Quadro 1 - Proteínas receptoras sabidamente reconhecidas pelos fármacos ligantes de interesse e selecionadas para espécie humana.....	28
--	----

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Aspectos morfofisiológicos da obesidade e suas implicações à saúde pública	12
1.2	Principais fármacos e seus efeitos sobre o controle da obesidade	13
1.2.1	Sibutramina	14
1.2.2	Mazindol	16
1.2.3	Melatonina	18
1.3	As ferramentas de docagem molecular na identificação de novas potenciais moléculas-alvo	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	26
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1	Busca e seleção dos fármacos ligantes de interesse nos bancos de dados DrugBank e PubChem	26
3.2	Seleção de potenciais proteínas-alvo correlatas aos receptores específicos dos fármacos ligantes de interesse e obtenção de suas estruturas cristalográficas no banco de dados PDB	29
3.3	Estudo in silico da formação do complexo melatonina e receptor alfa-2A adrenérgico por docagem molecular	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos morfofisiológicos da obesidade e suas implicações à saúde pública

A obesidade é um problema de saúde mundial crescente em todas as faixas etárias nas mais diversas localizações geográficas em todos os níveis socioeconômicos, sendo seus efeitos profundamente negativos sobre a qualidade de vida, promovendo diminuição nas taxas de produtividade do trabalho e elevação nos custos de cuidados com a saúde (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019). Esse amplo impacto está relacionado com sua capacidade de afetar diversas funções fisiológicas e aumentar os riscos do desenvolvimento de *diabetes melitus*, doenças cardiovasculares, diversos tipos de câncer, distúrbios musculoesqueléticos e impactar negativamente a saúde mental humana (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019).

Pelo menos 2,8 milhões de mortes são registradas a cada ano como resultado do excesso de peso ou da obesidade no mundo (GUPTA, 2020). No Brasil, este cenário também se apresenta alarmantemente grave, pois segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, aproximadamente um em cada quatro brasileiros adultos estavam acima do peso corporal ideal no ano de 2019 (DA SILVA et al., 2021). Conseqüentemente, frente a esta perspectiva faz-se necessário estabelecer novas estratégias para a busca por tratamentos adicionais alternativos contra a obesidade a fim de minimizar seus impactos negativos sobre a saúde pública.

A obesidade é uma doença multifatorial complexa, tendo em vista que fatores socioeconômicos, genéticos e comportamentais (principalmente a elevada ingestão calórica) contribuem para o desenvolvimento da obesidade (DOS SANTOS; DA SILVA; MODESTO, 2019). Apesar da causa fundamental da obesidade ser o desequilíbrio energético positivo provocado pelo consumo elevado de calorias, este desequilíbrio pode ser influenciado por fatores socioculturais, características genéticas, alterações epigenéticas, microbiota, problemas psicológicos, alterações no sono, rotina de trabalho, ausência de atividades físicas, uso de medicamentos, idade, sexo, alterações cerebrais, mudanças no sistema alimentar global, entre outros (BLÜHER, 2019). Dessa maneira, o tratamento deve ser multidisciplinar e há diversas ferramentas terapêuticas, onde as principais são o tratamento dietético, o acompanhamento psicológico, o aumento da atividade física e o tratamento

medicamentoso (DOS SANTOS; DA SILVA; MODESTO, 2019). A cirurgia bariátrica é classificada como uma ferramenta eficiente, mas nem todos os pacientes estão aptos para uma cirurgia de grande porte (PAYAB et al., 2021).

Assim, a busca por novos alvos moleculares e drogas mais eficientes é justificada pelas limitações inerentes das drogas atualmente utilizadas e das altas taxas de crescimento dessa comorbidade. De acordo com Lucchetta (2017), a farmacoterapia antiobesidade tem se tornado alvo de grandes debates científicos e políticos devido à falta de estudos robustos como resultado de um número amostral reduzido, baixa qualidade metodológica e/ou elevada heterogeneidade, bem como a existência de conflitos de interesse, pois estatisticamente a existência de financiamento nas pesquisas tende a colaborar para um viés positivo nos efeitos do fármaco. Todas estas informações sugerem uma crescente necessidade de conduzir novos estudos sobre este tema.

1.2 Principais fármacos e seus efeitos sobre o controle da obesidade

Segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica de Vigilância Sanitária (ABESO), cinco medicamentos eram registrados para o tratamento da obesidade em 2010: sibutramina, mazindol, anfepramona (dietilpropina), femproporex e orlistat (RADOMINSKI, 2010). De forma simplificada, os medicamentos contra a obesidade podem atuar na redução da ingestão energética, no desvio de substâncias ou de macronutrientes durante o metabolismo normal ou na elevação do gasto energético (MANCINI; HALPERN, 2002). Especialmente, anfepramona, femproporex, sibutramina e mazindol são fármacos caracterizados como anorexígenos, atuando principalmente na redução da ingestão energética (DE OLIVEIRA MARQUES; QUINTILIO, 2021). Já o orlistat causa a diminuição da absorção de lipídeos, impossibilitando que um terço dos triglicérides da alimentação sejam absorvidos pelo intestino delgado (DE OLIVEIRA MARQUES; QUINTILIO, 2021), ou seja, atuando sobre o desvio de macronutrientes durante o metabolismo.

A utilização de medicamentos para promover a redução de índice de massa corporal é seguida de riscos e benefícios que devem ser avaliados e ponderados de acordo com o perfil de cada paciente, principalmente as drogas anorexígenas ou redutoras de apetite, as quais atuam sobre o Sistema Nervoso Central, pois estão associadas a diversos efeitos colaterais sobre as funções mentais e comportamentais

(DE OLIVEIRA MARQUES; QUINTILIO, 2021). No entanto, o uso de medicamentos ainda é um importante auxílio no controle da obesidade, principalmente para indivíduos obesos com grandes dificuldades na perda de peso, visto que essa comorbidade é um fator de risco importante para o desenvolvimento de diversas patologias graves.

1.2.1 Sibutramina

A sibutramina (cloridrato de sibutramina monoidratado) (Figura 1) é um inibidor da receptação da noradrenalina, serotonina e dopamina, de acordo com informações contidas no banco de dados DrugBank (WISHART et al., 2018). Classificado como um medicamento anorexígeno β -fenetilamínico que apresenta ação termogênica em diferentes animais, a sibutramina estimula o consumo de oxigênio e eleva a estimulação de noradrenalina pelo tecido adiposo marrom, estimulando a termogênese (MANCINI; HALPERN, 2002).

Segundo o banco de dados DrugBank (WISHART et al., 2018), trata-se de um medicamento administrado por via oral que promove a sensação de saciedade e diminuição do apetite. Esse medicamento e outros anorexígenos que atuam no Sistema Nervoso Central não são indicados para pacientes com doenças relacionadas a esse sistema e em portadores de doenças cardiovasculares (DE OLIVEIRA MARQUES; QUINTILIO, 2021). Seus efeitos colaterais são boca seca, anorexia, insônia, prisão de ventre e dor de cabeça, de acordo com informações disponíveis no DrugBank (WISHART et al., 2018).

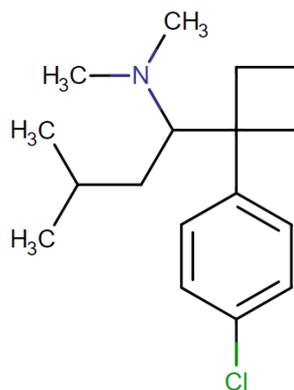


Figura 1. Estrutura molecular do cloridrato de sibutramina monoidratado. Fonte: Imagem extraída do provedor DrugBank (<https://go.drugbank.com/>, WISHART et al., 2018).

Uma pesquisa randomizada realizada em sete centros clínicos com 1.463 pacientes obesos durante 24 semanas avaliou diferentes dosagens de sibutramina (de 5mg a 30mg) e sua eficácia na perda de peso (BRAY et al., 1999). Apenas 683 pacientes completaram este estudo e estatisticamente ($p < 0,05$) foi verificado uma maior perda de peso nos grupos com diferentes dosagens de sibutramina do que no grupo placebo, sendo observadas as seguintes porcentagens de perda de peso corporal: placebo, 1,2%; 1 mg, 2,7%; 5 mg, 3,9%; 10 mg, 6,1%; 15 mg, 7,4%; 20 mg, 8,8%; e 30 mg, 9,4%), onde ambos os grupos receberam orientações dietéticas (BRAY et al., 1999).

Um levantamento de artigos científicos, objetivando avaliar a eficácia e a segurança do uso de sibutramina, foi descrito por Tziomalos et al. (2009). Nessa revisão sistemática foram avaliados mais de 85 artigos científicos publicados no PubMed e no Medline até janeiro de 2009, sendo destacados resultados positivos ao emprego da sibutramina em pacientes obesos e com sobrepeso, tais como: a redução do IMC (índice de massa corporal), diminuição da circunferência da cintura e efeitos positivos no perfil lipídico (TZIOMALOS et al., 2009). Ainda, de acordo com tais autores, com base nos artigos revisados, os grupos que utilizaram este fármaco apresentaram maior redução de peso do que grupo placebo que receberam apenas orientações dietéticas. A droga também foi associada a bons resultados na manutenção do peso após intervenção dietética, e sendo assim, sua administração associada a um estilo de vida mais saudável é considerada eficaz para redução do peso (TZIOMALOS et al., 2009). Entretanto, de acordo com tais autores, há necessidade de realização de novos estudos por um período de duração mais extenso para determinar as indicações precisas do medicamento quanto às questões associadas com mortalidade cardiovascular.

Em outro estudo conduzido por 13 meses empregando o delineamento experimental duplo-cego placebo controlado do tipo *cross over* com 73 adolescentes obesos sem outras comorbidade, constatou que 46% dos indivíduos do grupo placebo e que receberam orientações dietéticas perderam 10% do peso inicial, este grupo perdeu em média 1,61 kg de peso total (FRANCO; COMINATO; DAMIANI, 2014). Entretanto, este estudo constatou que 75% dos adolescentes obesos que receberam 10mg de sibutramina diariamente com orientações dietéticas perderam 10% do peso inicial (sendo a perda de peso total em média deste grupo igual a 4,47 kg) sem a

constatação de efeitos colaterais significativos ($p < 0,001$) (FRANCO; COMINATO; DAMIANI, 2014).

Segundo Campos et al. (2014), em um estudo de revisão empregando os bancos de dados LILACS e MEDLINE, o qual avaliou treze artigos do período de 2005 a 2014, 85% dos autores concordaram que a sibutramina possui resultados no controle da obesidade, entretanto 77% dos autores discutiram sobre o aumento da pressão arterial e 38% relataram outras complicações cardiovasculares associadas ao tratamento da obesidade empregando este fármaco. Desta maneira, fica evidenciada a necessidade de avaliação do perfil do paciente e acompanhamento médico para utilização do fármaco sibutramina, visto que o uso indiscriminado pode gerar graves riscos à saúde.

Um estudo mais recente avaliou a eficácia e a segurança da sibutramina em 69.810 pacientes de um programa de cuidados de saúde primários PRIMAVERA, onde 92,5% dos indivíduos obtiveram uma redução maior ou igual a 5% do peso corporal (DEDOV et al., 2018). Ainda, ao longo dos períodos de três, seis e doze meses de tratamento foi observada a redução de peso corporal de 9,5%, 15,1% e 19,7%, respectivamente, sem elevação de riscos à saúde em pacientes sem doença cardiovascular subjacente e baixa taxa de efeitos adversos (DEDOV et al., 2018). Sendo assim, estudos adicionais são necessários a fim de investigar os potenciais efeitos colaterais adversos da droga sibutramina sobre a saúde e bem-estar de pacientes obesos.

1.2.2 Mazindol

O mazindol é um medicamento simpaticomimético, classificado como um anorexígeno não derivado da β -fenetilamina que também estimula a termogênese no tecido adiposo marrom em experimentos com animais (MANCINI; HALPERN, 2002). Segundo o banco de dados DrugBank (WISHART et al., 2018), trata-se de um fármaco tricíclico menos tóxico que a anfetamina com ação catecolaminérgica, o qual age inibindo a receptação de serotonina, noradrenalina e dopamina (Figura 2). Insônia, nervosismo, boca seca, cefaleia, arrepios, náuseas, palpitações, fraqueza, vertigem, constipação e fraqueza são algumas das reações adversas provocadas por este fármaco mais comumente observadas em pacientes obesos (DE JESUS COSTA; DUARTE, 2017).

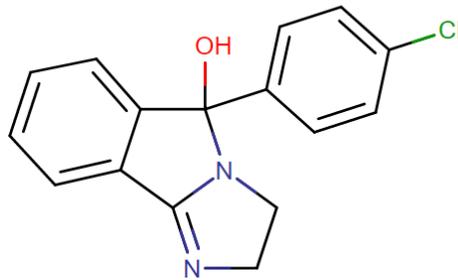


Figura 2. Estrutura molecular do mazindol. Fonte: Imagem extraída do provedor DrugBank (<https://go.drugbank.com/>, WISHART et al., 2018).

Avaliações clínicas já foram realizadas em indivíduos com doenças cardíacas estáveis para verificação da segurança deste fármaco. Um estudo avaliou a eficácia de 1 mg do mazindol em 21 pacientes obesos estáveis com doenças cardíacas sintomáticas por 12 semanas (um segundo grupo com 19 pacientes recebeu placebo) (BRADLEY; BLUM; SCHEIB, 1974). Como conclusão, o mazindol foi considerado bem tolerado e seu uso contínuo resultou na perda significativa de peso corporal ($p < 0,01$) (aproximadamente 4,4 kg) nestes pacientes (BRADLEY; BLUM; SCHEIB, 1974). Um outro estudo avaliou o uso de 2 mg de mazindol administrado 60 minutos antes do almoço por mulheres com obesidade refratária (SMITH; INNES; MUNRO, 1975). Os resultados observados não foram eficazes na perda de peso, onde 23 pacientes do grupo placebo obtiveram uma perda média de -0,3 kg e 19 mulheres do grupo mazindol perderam em média -1,4 kg, com rápida recuperação de peso após as 12 semanas de tratamento, sendo que ambos os grupos receberam orientações dietéticas durante a intervenção terapêutica (SMITH; INNES; MUNRO, 1975). Segundo ENZI et al., (1976), o mazindol apresentou bons resultados contra a obesidade refratária, pois sua utilização colaborou para a permanência dos indivíduos em uma dieta hipocalórica, quando administrado na fase tardia da dieta (fase com índice mais baixo de adesão a orientações dietéticas), sendo observado que pacientes que utilizaram o medicamento por períodos mais longos obtiveram uma perda de peso maior em comparação aos grupos controles (ENZI et al., 1976).

Um ensaio clínico duplo-cego avaliando 37 pacientes diabéticos obesos que receberam uma dose de 2 mg/dia por 12 semanas (mazindol vs placebo) associado a uma dieta de 1.000 kcal/dia demonstrou que o grupo tratado com mazindol perdeu em média 13,5 kg e o grupo placebo 4,2 kg ($p < 0,001$), destacando o efeito positivo de sua ação anorexígena sem propriedades específicas no metabolismo (SLAMA et al.,

1978). Segundo Lucchetta (2017), o mazindol é um fármaco que apresentou ação efetiva na perda de peso a curto prazo em humanos em comparação ao grupo placebo, mas a interrupção do seu uso para estes fins frequentemente torna-se necessária devido a seus severos efeitos colaterais, indicando a necessidade de realizar estudos adicionais mais robustos acerca dos efeitos do mazindol como fármaco no controle e tratamento da obesidade.

1.2.3 Melatonina

De acordo com informações disponíveis no DrugBank (WISHART et al., 2018), a melatonina (Figura 3), cuja nomenclatura formal é N-acetil-5-metoxitriptamina, é um hormônio endógeno que regula os ciclos sono-vigília, sendo indicado para o tratamento de diversos distúrbios do sono e está envolvida na regulação do humor, aprendizagem, memória, atividade imunológica, fertilidade, reprodução, entre outros. Recentemente, foi demonstrado que a melatonina atua no tecido adiposo marrom e aumenta sua capacidade termogênica, embora o seu papel na via metabólica termogênica ainda não tenha sido totalmente esclarecido (DE SOUZA et al., 2019).

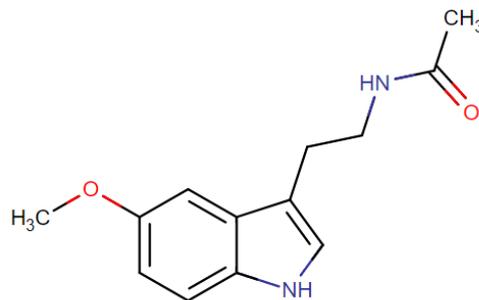


Figura 3. Estrutura molecular da melatonina. Fonte: Imagem extraída do provedor DrugBank (<https://go.drugbank.com/>, WISHART et al., 2018).

Recentemente, os efeitos da melatonina na redução do peso corporal e no equilíbrio energético vêm sendo testados em roedores devido aos inúmeros benefícios proporcionados por essa molécula como uma possível abordagem terapêutica no combate à obesidade e às suas patologias associadas. A melatonina limita a obesidade em roedores Zücker diabéticos sem alterações de outros fatores, tais como: a ingestão de alimentos e a taxa de atividade física (FERNÁNDEZ VÁZQUEZ; REITER; AGIL, 2018). Esse fato é decorrente do aumento do tecido adiposo marrom e da massa mitocondrial, juntamente com a restauração da expressão das proteínas

termogenina (UCP1) e difosfato de guanosina (GDP) aos níveis observados em ratos magros promovidos pela suplementação de melatonina (FERNÁNDEZ VÁZQUEZ; REITER; AGIL, 2018). Além disso, a melatonina exerce ações protetoras sobre a disfunção mitocondrial por possuir efeitos antiinflamatórios e antioxidantes contra lesões mediadas por mitocôndrias na hipertensão e na obesidade, além de possuir efeitos positivos sobre a pressão sanguínea, adiposidade e peso corporal (PRADO et al., 2018).

Um estudo conduzido com ratos pinealectomizados (PINX) e pinealectomizados tratados com melatonina (PINX/Mel) demonstrou uma importante correlação entre a ação da melatonina sobre a maquinaria molecular do tecido adiposo marrom pela alteração na expressão de importantes genes (DE SOUZA et al., 2019). No estudo citado os animais PINX apresentaram uma menor expressão dos genes das proteínas iodotironina desidrodinase tipo II (Dio2), lipase hormônio-sensível (Lhs), termogenina (UCP1), coativador 1 α do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (Pgc1 α) e o ativador de morte celular (Cidea), além de apresentarem uma diminuição na expressão e na atividade enzimática dos complexos mitocondriais I, II e IV (DE SOUZA et al., 2019). De acordo com o autor do artigo citado, a presença de melatonina é importante para o metabolismo diário do tecido adiposo multilocular e para suas variações sazonais, crucial para a homeostase do organismo. A suplementação de melatonina em humanos nas dosagens variando de 1 a 20 mg/dia por períodos de 3 semanas a 12 meses apresentou resultados positivos na homeostase glicêmica, na modulação da atividade do tecido adiposo amarelo, no metabolismo lipídico, na atividade mitocondrial, no aumento do volume e da atividade do tecido adiposo marrom (GENARIO et al., 2021). A Figura 4 ilustra os principais benefícios da suplementação de melatonina em indivíduos com sobrepeso ou obesidade, destacando a diminuição do estresse oxidativo, a redução de biomarcadores inflamatórios (diminuição da inflamação), a redução da adipogênese, o aumento da lipólise, maior sensibilidade à insulina, melhora no perfil lipídico, na pressão arterial e na atividade mitocondrial (GENARIO et al., 2021). A Figura 4 também ilustra a melhoria da morfologia e da função do tecido adiposo decorrente da modulação da atividade do tecido adiposo unilocular. Em síntese, a suplementação de melatonina gera uma melhoria na morfologia e na função do tecido adiposo e pode ser caracterizada como um medicamento que apresenta inúmeros benefícios à saúde,

sem efeitos colaterais e com atuação positiva sobre as principais comorbidades associadas à obesidade (GENARIO et al., 2021).

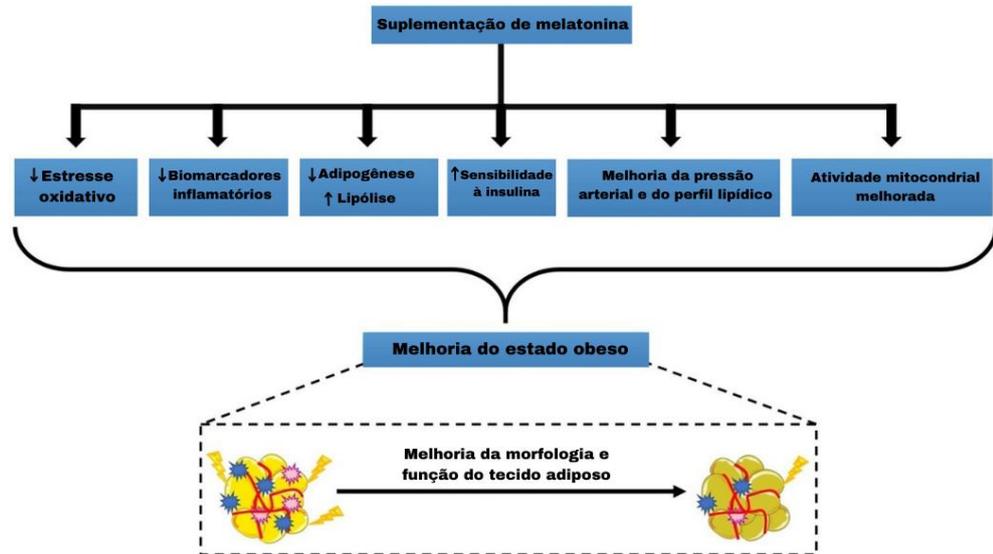


Figura 4. Esquema ilustrativo dos benefícios da suplementação da melatonina e modulação decorrente de sua suplementação sobre a melhora do estado obeso. Fonte: Adaptado de Genario et al. (2021).

Ademais, segundo Xu et al. (2017), diversos artigos apontam os benefícios da melatonina na redução do peso em decorrência de seus efeitos sobre a microbiota intestinal. Esse estudo avaliou a ação da melatonina em camundongos submetidos a uma alimentação teste rica em gordura por pirosequenciamento de RNA ribossomal rRNA 16S, sendo constatado que este medicamento provocou a diminuição da diversidade da microbiota intestinal, promovendo unidades taxonômicas mais similares a de roedores que foram submetidos a uma alimentação normal balanceada, as quais estão associadas a uma mucosa intestinal mais saudável (Xu et al., 2017). Nos roedores submetidos à alimentação teste, a melatonina promoveu a redução do peso, a diminuição da esteatose hepática e a redução da inflamação de baixo grau, bem como uma melhora na resistência à insulina (Xu et al., 2017). Portanto, a melatonina pode ser usada como um agente probiótico para reverter a disbiose da microbiota intestinal induzida por uma alimentação rica em gordura em camundongos, e sendo assim, avaliar sua atuação sobre a microbiota intestinal pode ajudar na melhor compreensão dos mecanismos que regem os vários efeitos benéficos desse neurohormônio (Xu et al., 2017).

1.3 As ferramentas de docagem molecular na identificação de novas potenciais moléculas-alvo

A docagem molecular (também conhecida como acoplamento, ancoragem ou “docking” molecular) caracteriza-se como uma metodologia que visa inferir as interações de encaixes com maior afinidade entre um receptor-alvo e um ligante de interesse, muito utilizada para identificação de novos fármacos (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). Geralmente, este procedimento experimental costuma ser empregado na predição do acoplamento de uma pequena molécula a um receptor proteico, entretanto, pode ser ainda utilizada para predizer o modo de ligação entre duas macromoléculas, por exemplo, nas análises de docagem de proteína-proteína (PRIETO-MARTÍNEZ; ARCINIEGA; MEDINA-FRANCO, 2018).

O principal objetivo desta ferramenta é inferir corretamente a localização do ligante nas interações com uma proteína receptora, caracterizando sua postura nas diferentes conformações do ligante em um arranjo espacial e suas interações moleculares físico-químicas, bem como calculando estimativas da afinidade destas ligações (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). A mecânica molecular é a base para a maioria dos programas de docagem, recurso que descreve um sistema poliatômico por meio da física clássica (PRIETO-MARTÍNEZ; ARCINIEGA; MEDINA-FRANCO, 2018).

Os programas responsáveis por estas predições possuem algoritmos que visam gerar e avaliar as conformações dos ligantes considerando efeitos entálpicos e entrópicos para estimar a interação nativa do receptor-alvo e ligante (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). Entretanto, como este procedimento metodológico é complexo, os resultados fornecidos por essas ferramentas são aproximações sujeitas a erros (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). Dessa maneira, como o modelo gerado com o menor valor mínimo global associado pode não corresponder ao modo de ligação nativo, é recomendável utilizar mais de um programa de docagem e a aplicação dessa metodologia deve ser complementada pelo uso de outros métodos computacionais e experimentais (PRIETO-MARTÍNEZ; ARCINIEGA; MEDINA-FRANCO, 2018).

Diferentes estratégias são utilizadas por esta metodologia e a adição de flexibilidade à proteína-receptora e ao ligante acresce exponencialmente complexidade aos algoritmos (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Portanto, existem programas que consideram a proteína receptora e o ligante como corpos rígidos (Figura 5 A); enquanto outros consideram a proteína rígida e o ligante flexível (onde graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante são explorados) e por último, há algoritmos mais intrincados que consideram a proteína receptora totalmente ou parcialmente flexível e todos os graus de liberdade do ligante são investigados (Figura 5 B) (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

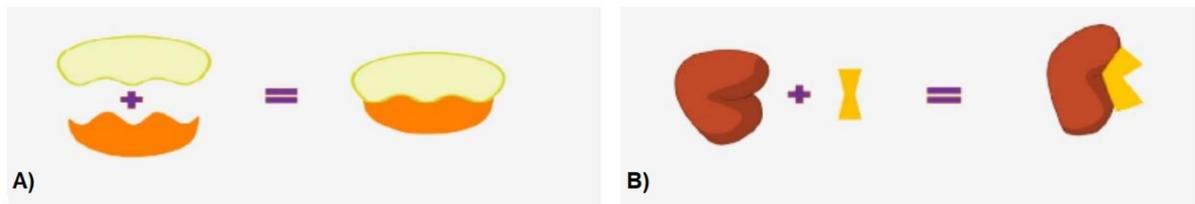


Figura 5. Representação esquemática de duas abordagens principais envolvidas nas análises de docagem molecular: A) Proteína receptora e ligante como corpos rígidos e B) Ajustes induzidos pela adição de flexibilidade. Fonte: Adaptado de Prieto-Martínez; Arciniega; Medina-Franco (2018).

Os passos principais envolvidos na metodologia de docagem molecular estão resumidamente apresentados na Figura 6. O primeiro passo envolve a busca pela estrutura tridimensional do ligante e da proteína receptora de interesse, os quais podem ser obtidos a partir de bancos de dados de domínio público. O segundo passo envolve a preparação e a edição da estrutura tridimensional dos alvos proteicos para remoção de moléculas externas complexadas a estes receptores, ou seja, para a obtenção da estrutura tridimensional das proteínas de interesse livre de substratos externos. Por fim, uma última etapa compreende de fato a interação do ligante à proteína receptora a partir de diferentes servidores disponíveis que viabilizam as análises de docagem molecular, gerando dados referentes ao tipo de interação observada e aos valores estimados de energia global de ligação.

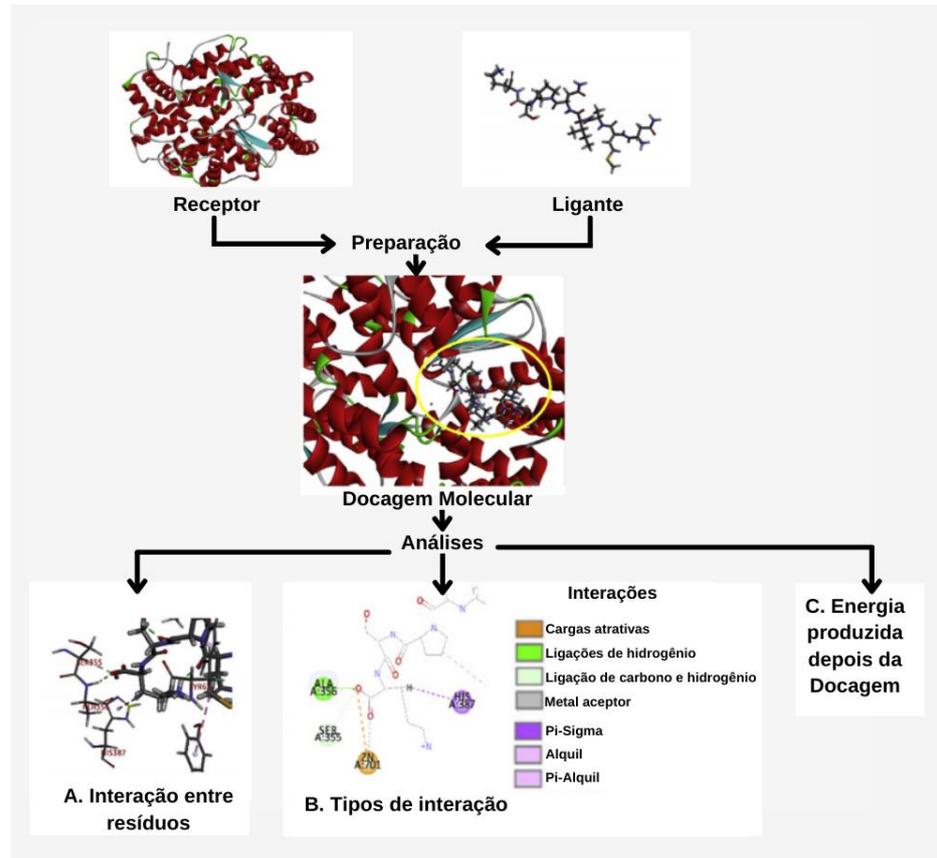


Figura 6. Etapas gerais envolvidas nas análises de docagem molecular. Fonte: Adaptado de Tu et al. (2018).

Em síntese, essa metodologia é útil ao desenvolvimento de drogas com base na estrutura, na triagem virtual e no aprimoramento de compostos, apresentando um excelente potencial para proporcionar uma orientação valiosa para o desenvolvimento e a otimização de medicamentos (PRIETO-MARTÍNEZ; ARCINIEGA; MEDINA-FRANCO, 2018). A busca e a produção de novas drogas é um processo longo e árduo, o qual envolve grandes investimentos, com o objetivo final de identificar um composto ativo efetivo, com baixa toxicidade, alta biodisponibilidade e síntese não dispendiosa (SETHI et al., 2019). Assim, a docagem molecular é uma ferramenta de baixo custo que possibilita a triagem de milhões de moléculas por dia em bancos de dados, acelerando a identificação de potenciais moléculas-alvo, e por conseguinte, reduzindo o tempo gasto na etapa inicial da produção de novos fármacos (SETHI et al., 2019).

A docagem molecular é uma ferramenta popular, a qual foi impulsionada pelo crescimento da cristalografia de raios-X de alto rendimento, por novos métodos de ressonância magnética nuclear (DE RUYCK et al., 2016), pelo desenvolvimento de diversos algoritmos (PRIETO-MARTÍNEZ; ARCINIEGA; MEDINA-FRANCO, 2018) e técnicas de modelagem de proteínas por homologia (CAVASOTTO; PHATAK, 2009).

Ainda, novas abordagens têm utilizado a docagem molecular para elucidação de estruturas quaternárias (docagem proteína-proteína) e mecanismos enzimáticos não canônicos (aminoácidos que não são codificados por organismos) (DE RUYCK et al., 2016). Por consequência, a docagem molecular é uma metodologia promissora, com grande potencial em estudos farmacêuticos e possivelmente, com o desenvolvimento de novos algoritmos, poderá ser mais eficiente e robusta. Ademais, outra aplicação importante dessa tecnologia é a predição de eventos de iniciação molecular causados por um complexo orgânico ou inorgânico em uma via metabólica relacionada com efeitos adversos (JEONG; KIM; CHOI, 2019). Um evento de iniciação molecular pode ser caracterizado pela interação inicial entre uma molécula ou uma biomolécula relacionada a uma via metabólica (ALLEN et al., 2014). Dessa maneira, produtos químicos ambientais podem ser analisados e associados a distúrbios endócrinos, e nesse contexto, a toxicidade reprodutiva é um exemplo (JEONG; KIM; CHOI, 2019).

O triazofós (TAP) é um inseticida organofosforado utilizado na cultura cafeeira no Brasil (SOARES; CARVALHO, 2018), e um estudo que utilizou a técnica de docagem molecular apontou que o inseticida possui alta afinidade por algumas proteínas com importantes atuações endócrinas (YANG et al., 2019). De acordo com os resultados *in silico*, o triazofós pode interferir em funções endócrinas da adrenal, interagir com receptores de glicocorticoides e receptores tireoidianos (YANG et al., 2019). Um de seus derivados, o dietilfosfato apresentou potencial capacidade para interromper a ligação e o transporte dos hormônios tireoidianos (YANG et al., 2019). Esse estudo é um exemplo interessante da utilização da técnica de docagem molecular para a busca e predições de eventos de iniciação molecular causados por um produto químico ambiental.

Recentemente, alguns estudos já têm enfatizado o potencial desta metodologia na prática. Razak et al. (2021) avaliaram o potencial do derivado indólico MMINA como agente quimioprotetor contra danos a órgãos induzidos pela cisplatina, uma eficiente droga anticâncer. Análises de biomarcadores enzimáticos e moleculares associados a estudos histológicos comprovaram o efeito protetor do MMINA em ratos (RAZAK et al., 2021). Porém, a associação de estudos de docagem molecular permitiu a descrição dos alvos moleculares da MMINA contra os danos causados pela droga anticâncer, gerando maior compreensão dos mecanismos de ação do derivado indólico (RAZAK et al., 2021).

O contexto pandêmico ocasionado pelo SARS-CoV-2 é um exemplo de necessidade imediata de identificar potenciais fármacos a serem empregados no seu combate e tratamento, fato que justifica o uso de todos os recursos disponíveis para a descoberta de um medicamento eficaz contra a COVID-19. Estudos exclusivamente de predição por docagem molecular possibilitaram uma análise rápida de potenciais drogas como possíveis agentes antivirais, tais como: a cloroquina, a azitromicina, a hidroxicloroquina, o arbidol, o remdesivir, o favipiravir e componentes de *Nigella sativa* (BOUCHENTOUF; MISSOUM, 2020). Em um estudo mais recente, uma triagem virtual foi realizada abrangendo medicamentos aprovados pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration, Estados Unidos da América) contra três proteínas virais do SARS-CoV2, essa busca foi realizada pelos programas de docagem molecular AutoDock Vina, Glide e rDock, sendo identificados seis potenciais inibidores promissores para estudos clínicos futuros, o rolapitant, a ondansetrona, o labetalol, ácido levomefólico, natamicina e o leucal (HOSSEINI et al., 2021). Entretanto, algumas das drogas acima citadas, tais como: hidroxicloroquina, azitromicina, cloroquina, já vem sendo amplamente divulgadas como sendo ineficazes ao tratamento contra a SARS-CoV-2 (CHACÓN ACEVEDO et al., 2020).

Desta forma, faz-se necessário destacar que a identificação positiva de tais potenciais fármacos ao tratamento de inúmeras disfunções patológicas por análises de docagem molecular assume um caráter exclusivamente preditivo, uma vez que uma determinada droga anteriormente predita como tendo alta interação com proteínas receptoras de interesse por tais análises pode ou não ser confirmada eficaz e eficiente nos estudos clínicos experimentais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar *in silico* a formação de complexos dos ligantes mazindol, sibutramina e melatonina, fármacos relacionados com a obesidade, e seus potenciais receptores-alvo por análises de docagem molecular.

2.1 Objetivos específicos

Entre os objetivos específicos propostos neste estudo, destacam-se:

- a) Buscar e selecionar potenciais fármacos com efeitos contra obesidade a partir da leitura de literatura científica especializada;
- b) Buscar a estrutura tridimensional dos fármacos melatonina, sibutramina e mazindol selecionados para tais análises;
- c) Selecionar potenciais proteínas receptoras-alvo correlatas aos receptores específicos dos fármacos ligantes de interesse por análises de no programa STRING;
- d) Identificar sequências de outras proteínas receptoras com alta similaridade entre os receptores-alvo validados e sabidamente ativados pelos fármacos selecionados a partir de ferramentas do programa protein-BLAST;
- e) Buscar e editar estruturas cristalográficas 3D das potenciais proteínas receptoras-alvo para análises de interação molecular a partir dos fármacos selecionados;
- f) Investigar a interação destes fármacos com potenciais receptores-alvo por ferramentas de docagem molecular disponíveis no servidor AutoDock4.0.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As diferentes etapas estabelecidas no procedimento experimental deste estudo foram didaticamente agrupadas em três eixos principais: a) seleção e busca das estruturas 3D dos fármacos ligantes salvos em extensão PDB; b) seleção e obtenção das estruturas 3D de potenciais proteínas receptoras-alvo correlatas salvos em extensão PDB; e c) ensaios de docagem molecular para estudos *in silico* da formação de complexos dos fármacos de interesse e de suas potenciais proteínas receptoras-alvo.

3.1 Busca e seleção dos fármacos ligantes de interesse nos bancos de dados DrugBank e PubChem

A seleção dos fármacos empregados como moléculas ligantes neste estudo foi realizada a partir dos bancos de dados de informações farmacológicas sobre substâncias e compostos químicos, tais como: DrugBank (WISHART et al., 2018)

e PubChem (KIM et al., 2016). O banco de dados DrugBank é um recurso que fornece informações detalhadas sobre fármacos, tais como: seus mecanismos de ação, suas indicações de prescrição, seus receptores moleculares, estrutura e classificação química das drogas (WISHART et al., 2018). Alternativamente, o PubChem é um banco de dados de domínio público da National Library of Medicine (NLM), pertencente ao National Institutes of Health (NIH) localizado nos Estados Unidos, que coleta e divulga gratuitamente informações químicas de mais de 750 fontes, possibilitando o acesso a diversas informações sobre inúmeros compostos químicos e dados relacionados (KIM et al., 2021).

A escolha das drogas testadas neste estudo foi definida seguindo o seguinte critério: mazindol e sibutramina são fármacos rotineiramente empregados no tratamento de pacientes obesos (MANCINI; HALPER, 2002), enquanto a melatonina também exerce potenciais efeitos fisiológicos sobre a melhora no perfil obeso (GENARIO et al., 2021).

A partir do Drugbank foram obtidas informações gerais sobre os fármacos ligantes, tais como: uma breve descrição de suas características gerais e estruturas químicas, indicações para prescrição e seus mecanismos de ação, aspectos gerais de farmacodinâmica e identificação dos receptores celulares verificados para a espécie humana *Homo sapiens*. Os receptores verificados e reconhecidos para cada um dos fármacos estudados, bem como suas ações biológicas são apresentados no Quadro 1. A partir do banco de dados DrugBank foram identificados dois receptores (receptores de melatonina do tipo 1A e do tipo 1B) sabidamente reconhecidos pela melatonina; e três receptores (transportador de noradrenalina sódio-dependente, transportador de serotonina sódio-dependente e transportador de dopamina sódio-dependente) reconhecidos para ambos os fármacos sibutramina e mazindol (Quadro 1).

Quanto à ação biológica desempenhada pelos fármacos selecionados, sabe-se que a melatonina exerce um efeito agonista sobre os receptores de melatonina dos tipos 1A e 1B, com ações reprodutivas e circadianas (Quadro 1). Em contrapartida, os fármacos sibutramina e mazindol atuam como inibidores sobre o transportador de serotonina sódio-dependente, atuando sobre a regulação da sinalização serotoninérgica por meio do transporte de moléculas de serotonina a partir da fenda sináptica, e retornando-a ao terminal pré-sináptico para sua reutilização (Quadro 1). Ainda, especificamente sibutramina e mazindol atuam sobre o transportador de

dopamina sódio-dependente, que recapta a dopamina nos terminais pré-sinápticos e tem participação importante na regulação da regressão dos vasos hialoides dependentes de luz na retina (Quadro 1).

Fármacos ligantes	Receptores reconhecidos por fármacos de interesse	Ação biológica
Melatonina ID DrugBank: DB01065	Receptor de melatonina do tipo 1A ID UniProt: P48039	A melatonina atua como agonista deste receptor de alta afinidade para este fármaco. Provável mediador das ações reprodutivas e circadianas da melatonina.
	Receptor de melatonina do tipo 1B ID UniProt: P49286	Idem ao receptor de melatonina do tipo 1A
Sibutramina ID DrugBank: DB01105 Mazindol ID DrugBank: DB00579	Transportador de noradrenalina sódio-dependente ID UniProt: P23975	A sibutramina e o mazindol são inibidores deste receptor, caracterizado como um transportador de amina. Seus efeitos atuam na etapa final da ação da noradrenalina por recaptação dependente de sódio com alta afinidade nos terminais pré-sinápticos.
	Transportador de serotonina sódio-dependente ID UniProt: P31645	A sibutramina e o mazindol são inibidores deste receptor, caracterizado como um transportador de serotonina, atuando sobre a regulação da sinalização serotoninérgica por meio do transporte de moléculas de serotonina a partir da fenda sináptica, retornando-a ao terminal pré-sináptico para sua reutilização. Responsável pela regulação e disponibilidade da serotonina para outros receptores serotoninérgicos, finaliza a ação da serotonina e a recicla.
	Transportador de dopamina sódio-dependente ID UniProt: Q01959	A sibutramina e o mazindol são inibidores deste receptor, caracterizado como um transportador de amina, o qual finaliza a ação da dopamina por sua recaptação dependente de sódio de alta afinidade nos terminais pré-sinápticos. Atua como regulador da regressão dos vasos hialoides dependentes de luz da retina.

Quadro 1. Proteínas receptoras sabidamente reconhecidas pelos fármacos ligantes de interesse e selecionadas para espécie humana. Fonte: Informações extraídas dos bancos de dados DrugBank (<https://go.drugbank.com/>, WISHART et al., 2018) e Uniprot (<https://www.uniprot.org/>, APWEILER et al., 2004).

Ainda, as estruturas 3D de cada um dos fármacos ligantes de interesse foram obtidas no banco de dados PubChem e salvas no formato SDF. Em seguida, esses arquivos SDF foram convertidos para o formato PDB através do programa Online SMILES Translator and Structure File Generator (WEININGER, 1988). Assim, ao final desta etapa foram adquiridas as sequências 3D dos fármacos ligantes de interesse em formato PDB a serem empregadas nas futuras análises de docagem molecular.

3.2 Seleção de potenciais proteínas-alvo correlatas aos receptores específicos dos fármacos ligantes de interesse e obtenção de suas estruturas cristalográficas no banco de dados PDB

As sequências de aminoácidos de cada proteína-receptora no formato FASTA apresentada na Tabela 1 foram selecionadas a partir do banco de dados UniProt (APWEILER et al., 2004), que fornece um compêndio completo e uma gama enorme de dados de sequência de proteínas conhecidas vinculadas a um resumo das informações funcionais verificadas experimentalmente ou previstas computacionalmente.

Ademais, as sequências de aminoácidos das proteínas receptoras específicas a cada um dos fármacos ligantes de interesse foram empregadas como sequência de entrada nestas análises computacionais para identificação de outras potenciais proteínas-alvo correlatas, inicialmente empregando a ferramenta computacional STRING (SZKLARCZYK et al., 2019). O banco de dados STRING objetiva coletar, pontuar e integrar todas as fontes publicamente disponíveis de informações de interação proteína-proteína e complementá-las com predições computacionais, gerando uma rede global abrangente e objetiva das interações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) de um vasto grupo de proteínas (SZKLARCZYK et al., 2019).

Desta forma, esta plataforma digital estabelece uma rede global para determinada sequência de entrada de proteína, fornecendo uma interface gráfica ilustrativa, demonstrando as interações e correlações entre a proteína de entrada de interesse e as demais proteínas-alvo sugeridas por este programa. Além disso, um importante parâmetro avaliativo, denominado *score* de confiabilidade, é predito a partir destas análises, com valores variando de 0 (mínima confiabilidade) a 0,99 (máxima confiabilidade). Em tais condições experimentais foi estabelecido que apenas as proteínas-alvo correlatas com valor de *score* de confiabilidade superior a 0,9 seriam selecionadas para proceder as futuras etapas do procedimento experimental (SILVA, 2018).

Os resultados gerados nas análises de STRING demonstraram correlação direta do receptor de melatonina do tipo 1A com diferentes proteínas-alvo, tais como: subunidades da proteína de ligação G- nucleotídeo guanina; receptor de melatonina do tipo 1A, pro-neuropeptídeo Y e pró-opiomelanocortina, apresentando valores de *score* de confiabilidade variando de 0,922 e 0,940 (Figura 7, Tabela 1). As proteínas

correlatas sugeridas pelas análises de STRING a partir do receptor de melatonina do tipo 1B foram similares às indicadas para o mesmo receptor do tipo 1A, com exceção do receptor alfa-2A adrenérgico com escore de confiabilidade de 0,920 (Figura 8, Tabela 2).

O transportador de dopamina sódio-dependente apresentou correlação direta com flotilina, caderina, tirosina monooxigenase e syntaxina em escore de confiabilidade de 0,99 a 0,902 (Figura 9, Tabela 3), enquanto o transportador de serotonina sódio-dependente demonstrou interação com diferentes receptores hidroxitriptaminas e catecol hidroxilase com escores de confiabilidade variando de 0,962 a 0,907 (Figura 10, Tabela 4). Entretanto, o receptor de noradrenalina sódio-dependente também analisado em tais condições experimentais, gerou correlação com outras potenciais proteínas-alvo que apresentarem escore de confiabilidade inferior a 0,9, e assim tais proteínas não foram selecionadas e foram excluídas das análises experimentais posteriores.

Em seguida, todas as sequências selecionadas nas análises de STRING apresentadas nas Tabelas 1 a 4 foram submetidas a um outro critério de seleção, empregando a ferramenta computacional protein BLAST, pBLAST (JOHNSON et al., 2008). A ferramenta de busca de alinhamento básico e local (“Basic Local Alignment Search Tool”, BLAST) visa identificar similaridades entre sequências de biomoléculas pela comparação direta de uma sequência de nucleotídeos ou de proteínas dita sequência de entrada contra um banco de dados, contendo informações biológicas de diversas outras sequências, fornecendo resultados relevantes quanto à confiabilidade desses alinhamentos (JOHNSON et al., 2008). Esta ferramenta foi utilizada para identificar alinhamentos significativos com alta similaridade entre os receptores validados para cada fármaco e suas proteínas-alvo correlatas fornecidas pelo banco de dados STRING e apresentadas nas Tabelas 1 a 4. As sequências de aminoácidos no formato FASTA dos receptores diretamente correlatos às proteínas sabidamente ativadas pelos fármacos de interesse foram obtidas no banco de dados Uniprot, e cada uma das sequências de aminoácidos foi inserida individualmente na caixa de entrada do algoritmo protein Blast (pBLAST, ferramenta BLAST que permite uma comparação direta de sequências de proteína contra demais outras proteínas, BLAST proteína-proteína).

Como resultado a partir destas análises são fornecidos parâmetros de saída, os quais classificam e avaliam o alinhamento gerado, descritos de forma sucinta

abaixo. Um parâmetro avaliativo gerado nas análises de protein BLAST é o valor estatístico chamado de valor de E (“E-value”), o qual representa o número de vezes que um alinhamento tão bom ou melhor do que o encontrado pelo BLAST poderia ocorrer ao acaso, dado o tamanho do banco de dados em que ocorreu a pesquisa (SOUZA; LIFSCHITZ, 2007). Dessa forma, quanto mais próximo de zero o valor esperado estiver, mais significativo este alinhamento será. Ademais, um outro parâmetro avaliativo importante gerado nestas análises de protein BLAST é o percentual de identidade, correspondente à porcentagem de aminoácidos ou de nucleotídeos idênticos entre a sequência de entrada inserida e as sequências alinhadas pelo BLAST (FASSLER; COOPER, 2008). Ao final dessas análises experimentais, a sequência do receptor alfa-2A adrenérgico (ID UniProt P08913) foi a única proteína-alvo selecionada entre todas as demais testadas (Tabelas 1 a 4), tendo em vista que tal proteína gerou um alinhamento significativo com a sequência de entrada do receptor de melatonina do tipo 1B em uma identidade de 28,64% e valor de E de $1e^{-14}$. Particularmente, alguns autores recomendam valores de E inferiores ou iguais a $1e^{-5}$ (0,00001) ou a $1e^{-10}$ (0,0000000001) (PROSDOCIMI et al., 2002). Nenhuma similaridade significativa foi observada nos alinhamentos comparativos gerados entre as demais proteínas testadas nas análises de protein BLAST e assim, estas sequências foram excluídas das análises experimentais posteriores.

Após a identificação do receptor alfa-2A adrenérgico com alto escore de confiabilidade nas análises de STRING e similaridade significativa ao receptor de melatonina do tipo 1B através da ferramenta protein BLAST, procedeu-se a seleção e a obtenção das estruturas cristalográficas do receptor de interesse a partir do banco de dados Protein Data Bank PDB. Este banco de dados disponibiliza gratuitamente informações relevantes acerca das estruturas 3D de um vasto espectro de moléculas biológicas, tais como: proteínas e ácidos nucleicos, tipicamente obtidas por cristalografia de raio-X, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e/ou microscopia crio-eletrônica (wwPDB CONSORTIUM, 2019). Duas estruturas cristalográficas do receptor alfa-2A adrenérgico disponíveis no banco PDB foram selecionadas para as análises de docagem molecular: a) estrutura cristalográfica (ID PDB 6kux) acoplada a um substrato antagonista RSC (ID PDB E3F) com resolução de 2,70 Å e b) estrutura cristalográfica (ID PDB 6kuy) acoplada a um substrato agonista parcial (ID PDB E39) com resolução de 3,20 Å. A remoção manual destes substratos antagonista e agonista foi efetuada através do programa UCSF

Chimera1.15 (HUANG et al., 2014), que possibilita a visualização, edição interativa e análises de estruturas moleculares 3D e seus dados relacionados. As estruturas cristalográficas editadas de cada receptor foram salvas no formato PDB para posteriores análises de docagem molecular.

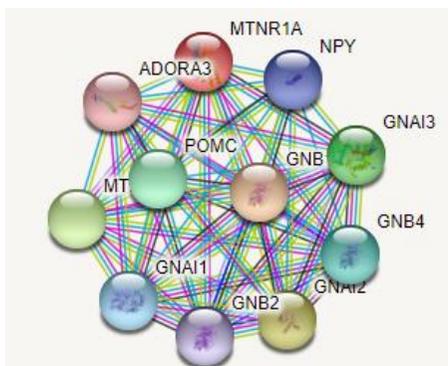


Figura 7. Rede global gerada pela ferramenta computacional STRING para a sequência do receptor de melatonina tipo 1A. Fonte: Dados gerados pelo autor através da ferramenta STRING (<https://string-db.org/>, SZKLARCZYK et al., 2019).

Proteínas- alvos fornecidos pela ferramenta STRING para o Receptor de melatonina do tipo 1A validado, ID UniProt: P48039.	Escore de confiabilidade
Proteína de ligação de nucleotídeo guanina G (I) / G (S) / G (T) subunidade beta-1, D UniProt: P62873	0,940
Proteína G (i) de ligação de nucleotídeo guanina subunidade alfa-2, ID UniProt: P04899	0,939
Receptor de melatonina tipo 1B, ID UniProt: P49286	0,937
Proteína G (i) de ligação ao nucleotídeo guanina subunidade alfa-3, ID UniProt: P08754	0,937
Pró-opiomelanocortina, ID UniProt: P01189	0,932
Subunidade beta-4 da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina, ID UniProt: Q9HAV0	0,928
Proteína G (i) de ligação ao nucleotídeo guanina subunidade alfa-1, ID UniProt: P63096	0,924
Pró-neuropeptídeo Y, ID UniProt: P01303.	0,923
Proteína de ligação de nucleotídeo guanina G (I) / G (S) / G (T) subunidade beta-2, ID UniProt: P62879	0,922
Proteína contendo domínio transmembrana TMIGD3, ID UniProt: P0DMS9	0,922

Tabela 1. Proteínas correlatas ao receptor de melatonina do tipo 1A, específico para o fármaco melatonina, testado por análises da ferramenta STRING. Fonte: Dados gerados pelo autor através da ferramenta STRING (<https://string-db.org/>, SZKLARCZYK et al., 2019).

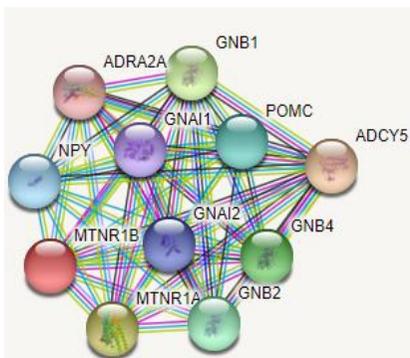


Figura 8. Rede global gerada pela ferramenta computacional STRING para a sequência do receptor de melatonina tipo 1B. Fonte: Dados gerados pelo autor através da ferramenta STRING (<https://string-db.org/>, SZKLARCZYK et al., 2019).

Proteínas- alvos fornecidos pela ferramenta STRING para o receptor de melatonina do tipo 1B validado, ID UniProt: P49286.	Escore de confiabilidade
Adenilato ciclase tipo 5, ID UniProt: O95622.	0,971
Receptor de melatonina tipo 1A, ID UniProt: P48039.	0,937
Proteína de ligação de nucleotídeo guanina G (I) / G (S) / G (T) subunidade beta-1, ID UniProt: P62873.	0,937
Subunidade beta-4 da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina, ID UniProt: P62873	0,929
Pró-opiomelanocortina, ID UniProt: P01189	0,928
Pró-neuropeptídeo Y, ID UniProt: P01303	0,923
Proteína G (i) de ligação de nucleotídeo de guanina subunidade alfa-2, ID UniProt: P04899	0,922
Proteína G (i) de ligação ao nucleotídeo guanina subunidade alfa-1, ID UniProt: P63096	0,922
Receptor alfa-2A adrenérgico, ID UniProt: P04899	0,920

Tabela 2. Proteínas correlatas ao receptor de melatonina do tipo 1B, específico para o fármaco melatonina, testado por análises da ferramenta STRING. Fonte: Dados gerados pelo autor através da ferramenta STRING (<https://string-db.org/>, SZKLARCZYK et al., 2019).

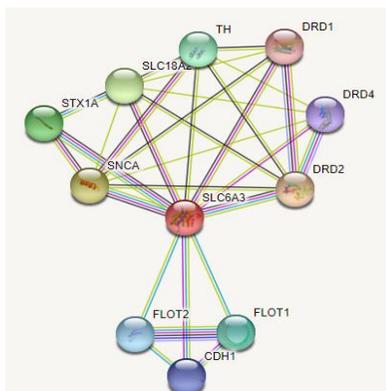


Figura 9. Rede global gerada pela ferramenta computacional STRING para a sequência do transportador de dopamina sódio-dependente. Fonte: Dados gerados pelo autor através da ferramenta STRING (<https://string-db.org/>, SZKLARCZYK et al., 2019).

Proteínas- alvos fornecidos pela ferramenta STRING para o transportador de dopamina sódio-dependente validado, ID UniProt: Q01959.	Escore de confiabilidade
Receptor de dopamina D (2), ID UniProt: P14416	0,990
Alfa-sinucleína, ID UniProt: P37840	0,983
Transportador de amina vesicular sináptica, ID UniProt: P37840	0,954
Sintaxina-1A, ID UniProt: Q16623	0,952
Tirosina 3-monooxigenase, ID UniProt: P07101	0,928
Flotilina-1, ID UniProt: O75955	0,919
Flotilina-2, ID UniProt: Q14254	0,903
Caderina-1, ID UniProt: P12830	0,902

Tabela 3. Proteínas correlatas ao transportador de dopamina sódio-dependente, receptor validado para os fármacos mazindol e sibutramina, testado por análises da ferramenta STRING. Fonte: Dados gerados pelo autor através da ferramenta STRING (<https://string-db.org/>, SZKLARCZYK et al., 2019).

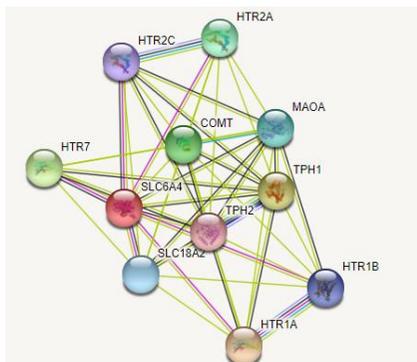


Figura 10. Rede global gerada pela ferramenta computacional STRING para a sequência do transportador de serotonina sódio-dependente. Fonte: Dados gerados pelo autor através da ferramenta STRING (<https://string-db.org/>), SZKLARCZYK et al., 2019).

Proteínas- alvos fornecidos pela ferramenta STRING para o transportador de serotonina sódio-dependente, ID UniProt:P31645.	Escore de confiabilidade
Receptor de 5-hidroxitriptamina 1A, ID UniProt: A0N5V3	0,962
Triptofano 5-hidroxilase 1, ID UniProt: P17752	0,913
Receptor de 5-hidroxitriptamina 7, ID UniProt: P34969	0,913
Catecol O-metiltransferase, ID UniProt: P21964	0,913
Receptor 5-hidroxitriptamina 2A, ID UniProt: P28223	0,907

Tabela 4. Proteínas correlatas ao transportador de serotonina sódio-dependente, receptor validado para os fármacos mazindol e sibutramina, testado por análises da ferramenta STRING. Fonte: Dados gerados pelo autor através da ferramenta STRING (<https://string-db.org/>), SZKLARCZYK et al., 2019).

3.3 Estudo *in silico* da formação do complexo melatonina e receptor alfa-2A adrenérgico por docagem molecular

As ferramentas AutoDock4.0 e o AutoDockTools1.5.7 foram utilizadas para a realização das análises de docagem molecular. A ferramenta AutoDock possibilita obter predições de interações entre macromoléculas e um pequeno ligante, promovendo uma extensa busca conformacional baseada na docagem do ligante a um conjunto de grades pré-calculadas da proteína-alvo a partir de seus sítios ativos de ligação, empregando campos de força em conjunto com funções de escore de energia livre e mapas de afinidade pré-calculados para cada tipo de átomo (MORRIS et al., 2009). Já o AutoDockTools fornece uma interface gráfica para configurar e executar as análises pelo Autodock (MORRIS et al., 2009).

De acordo com o banco de dados de proteínas Uniprot, o receptor alfa-2A adrenérgico contém três sítios ativos de ligação localizados nos seguintes aminoácidos: ácido aspártico Asp (aminoácido localizado na posição 128) associado com a ligação ao ligante e duas serinas Ser (aminoácidos localizados nas posições 215 e 219) relacionadas com a ligação do agonista do catecol e a ativação do receptor. O ácido aspártico é um aminoácido que possui o grupo radical carregado negativamente, pois possui um grupo carboxila, indicando o caráter ácido deste aminoácido, enquanto a serina possui o grupo radical polar não carregado capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água (NELSON; COX, 2014).

O estudo *in silico* da formação do complexo do ligante melatonina e do receptor alfa-2A adrenérgico envolveu etapas de preparação das estruturas 3D pelo programa AutoDock1.5.7 para gerar o input PDBQT, onde a cada uma das estruturas 3D salvas em formato PDB foram adicionados hidrogênios polares, cargas parciais Gasteiger, bem como hidrogênios não polares foram removidos. Posteriormente, a região da proteína onde deveria ocorrer a formação do complexo melatonina-receptores alfa-2A adrenérgicos 6kux ou 6kuy foi definida através da ferramenta AutoGrid disponível no programa AutoDock1.5.7. Nesta etapa uma caixa de grade ("GridBox") foi ajustada nas dimensões 50, 50 e 50 para os eixos X, Y e Z, respectivamente, usando um espaçamento de grade maior que o valor padrão de 0,375 Å. Tais ajustes são importantes para determinar o local de ligação em que a docagem deve ocorrer, e que então precisa necessariamente abrigar os resíduos dos sítios ativos da proteína receptora. No processo de docagem molecular o receptor

alfa-2A adrenérgico foi considerado rígido, e o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) foi empregado para busca e seleção das diferentes poses referentes a orientações e conformações do ligante dentro da cavidade delimitada na caixa de grade. A população utilizada para todas as simulações de docagem foi de 150, o número máximo de avaliações foi de 2.500.000 e o número máximo de gerações foi 27.000; bem como a taxa de mutação foi de 0,02 e a taxa de crossover: 0,8. Os demais parâmetros foram mantidos inalterados durante as análises de docagem molecular.

Das 100 diferentes poses ordenadas automaticamente nestas análises de docagem molecular, apenas as poses com os melhores ranqueamentos quanto à orientação e à conformação do ligante dentro da cavidade definida na caixa de grade foram selecionadas, demonstrando também os menores valores energéticos de ligação. Assim, as poses 87 e 70 foram as únicas selecionadas a partir da formação do complexo melatonina-receptor alfa-2A adrenérgico 6kux e 6kuy, respectivamente, e salvas em formato PDB para posterior visualização e análise das interfaces gráficas pós-docagens a partir do programa AutoDocktools1.5.7, bem como para reconhecimento das interações intermoleculares entre aminoácidos do receptor e átomos do ligante pelo programa disponível gratuitamente LIGPLOT (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995). Este servidor reproduz automaticamente diagramas esquemáticos de interações intermoleculares pós-docagens mediadas por ligações de hidrogênio e por interações hidrofóbicas. As ligações de hidrogênio são indicadas por linhas tracejadas entre os átomos estabilizados no complexo ligante-receptor, fornecendo as distâncias em angstrom (Å) entre tais pontos de conexão (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995). Enquanto as interações hidrofóbicas são representadas por um arco com raios irradiando do aminoácido da proteína em direção aos átomos do ligante com os quais entram em contato, enquanto os átomos contatados são também representados com raios irradiando de volta em direção ao aminoácido (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos cálculos gerados pós-docagem molecular, diferentes valores de energias gerados a partir da formação do complexo do ligante melatonina e dos receptores alfa-2A adrenérgicos 6kux e 6kuy foram estimados. Valores de energia

livre de ligação de -6,79 e -6,98 kcal/mol foram obtidos nas análises de pós-docagem para os receptores adrenérgicoa 6kux e 6kuy, respectivamente. Nestas análises de docagem molecular as constantes de inibição foram calculadas em 7,67 e 10,46 μ M para o complexo ligante-receptor adrenérgico 6kux e 6kuy, respectivamente. A eficiência do ligante e a energia torcional foram estimadas em -0,4/-0,41 e 1,19 kcal/mol, respectivamente, para ambos os receptores adrenérgicos testados. Os valores de energia intermolecular foram -8,17 e -7,99 kcal/mol, os dados de energia eletrostática foram -0,15 e -0,03 kcal/mol, enquanto as estimativas de energia de dessolvatação foram -8,02 e -7,95 kcal/mol para os receptores alfa-2A adrenérgicos 6kux e 6kuy, respectivamente. Já os valores de energia interna total e de não-ligação foram similares para ambos os receptores testados, sendo estimados em -0,35 e -0,44 kcal/mol, respectivamente.

A representação gráfica dos complexos formados entre o ligante melatonina e os receptores alfa-2A adrenérgicos 6kux e 6kuy foi gerada pela ferramenta UCSF Chimera1.15, onde observou-se o ligante posicionado dentro do espaço delimitado pela cavidade definida na caixa de grade em ambos os complexos, região onde estão localizados os aminoácidos correspondentes aos sítios ativos de ligação dos receptores-alvo (Figura 11A e B).

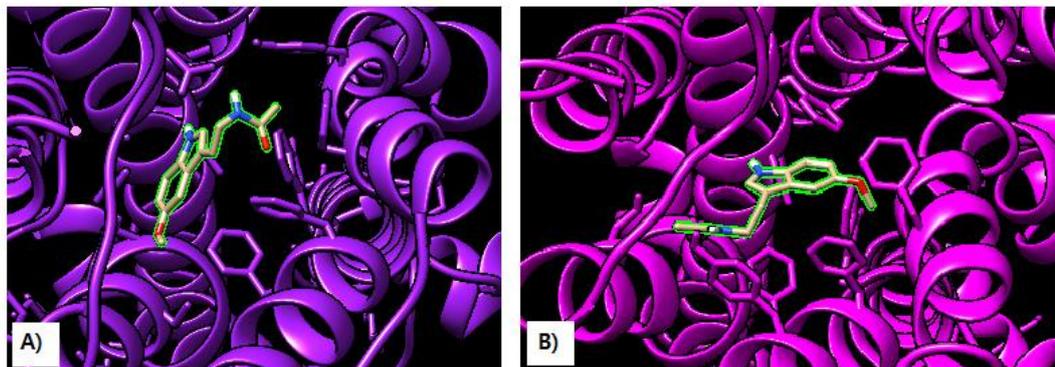


Figura 11. Representação gráfica da formação do complexo ligante melatonina e receptores alfa-2A adrenérgicos. A) Estrutura cristalográfica 6kux do receptor representada em roxo e ligante melatonina representado em verde. B) Estrutura cristalográfica 6kuy do receptor representada em magenta e ligante melatonina representado em verde. Fonte: imagem gerada pelo autor por meio da ferramenta UCSF Chimera1.15 (HUANG et al., 2014).

Interfaces gráficas bidimensionais geradas pelo programa LIGPLOT revelaram a ocorrência de interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas durante a formação dos complexos da melatonina aos receptores alfa-2A adrenérgicos, cujas estruturas cristalográficas encontravam-se originalmente acopladas a substratos antagonista 6kux e agonista parcial 6kuy

(Figuras 12 e 13). Duas interações intermoleculares não covalentes do tipo ligações de hidrogênio foram detectadas na formação do complexo ligante-receptor adrenérgico 6kux: a) um átomo de hidrogênio H ligado ao heteroátomo nitrogênio N do anel indol da melatonina interagiu com o oxigênio O presente em dupla ligação no grupo carboxila do aminoácido ácido aspártico na posição 113 (Asp113) do receptor-alvo em uma distância de 2,77 Å, e b) um átomo de hidrogênio H da hidroxila da cadeia lateral do aminoácido ácido aspártico Asp113 do receptor-alvo interagiu com o átomo de nitrogênio N não pertencente ao anel indol do ligante melatonina em uma distância de 3,0 Å (Figura 12). Em adição, 12 interações intermoleculares do tipo interações hidrofóbicas foram identificadas entre as cadeias laterais dos seguintes aminoácidos: fenilalanina Phe391, cisteína Cys201, serina Ser200, treonina Thr118, triptofano Trp387, tirosina Tyr394, serina Ser204, fenilalanina Phe412, fenilalanina Phe390, tirosina Tyr416, valina Val114 e cisteína Cys117 do receptor adrenérgico 6kux, sugerindo interações hidrofóbicas dos mesmos a diferentes átomos do ligante melatonina (Figura 12). As duas interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio observadas na formação deste complexo ligante melatonina-receptor alfa-2A adrenérgico 6kux estão diretamente associadas ao aminoácido ácido aspártico 113 (Asp113) (Figura 12), e que de acordo com informações disponíveis no banco de dados Uniprot, sabidamente corresponde a um dos sítios de ligação deste receptor, mas que não parece estar implicado na sua ativação.

Em adição, na formação do complexo melatonina-receptor alfa-2A adrenérgico 6kuy foram identificadas duas interações do tipo ligações de hidrogênio: a) o átomo de hidrogênio H ligado ao heteroátomo nitrogênio N do anel indol do ligante melatonina interagiu com o oxigênio O presente em dupla ligação no grupo carboxila do aminoácido ácido aspártico 113 (Asp113) do receptor-alvo em uma distância de 2,64 Å, e b) o átomo de oxigênio O do grupo amida da melatonina interagiu com o hidrogênio H ligado ao oxigênio da cadeia lateral do aminoácido serina localizado na posição 204 (Ser204) do receptor-alvo em uma distância de 3,12 Å (Figura 13). Além disso, 10 interações intermoleculares do tipo interações hidrofóbicas foram identificadas entre as cadeias laterais dos seguintes aminoácidos: fenilalanina Phe116, fenilalanina Phe391, triptofano Trp387, fenilalanina Phe412, fenilalanina Phe390, cisteína Cys201, valina Val197, tirosina Tyr394, serina Ser200 e valina Val114, o que parece sugerir estabilidade por interações hidrofóbicas destes aminoácidos do receptor alfa-2A adrenérgico 6kuy a diferentes átomos do ligante

melatonina (Figura 13). Particularmente, na formação deste complexo ligante-receptor foi observada a interação de átomos de hidrogênio em ambos os aminoácidos Asp113 e Ser204, caracterizados como um dos dois sítios ativos de ligação típicos do receptor alfa-2A adrenérgico. E especialmente, o aminoácido Ser 204 caracteriza-se como um local de ativação deste receptor pelo agonista catecol, de acordo com informações disponíveis no banco de dados Uniprot.

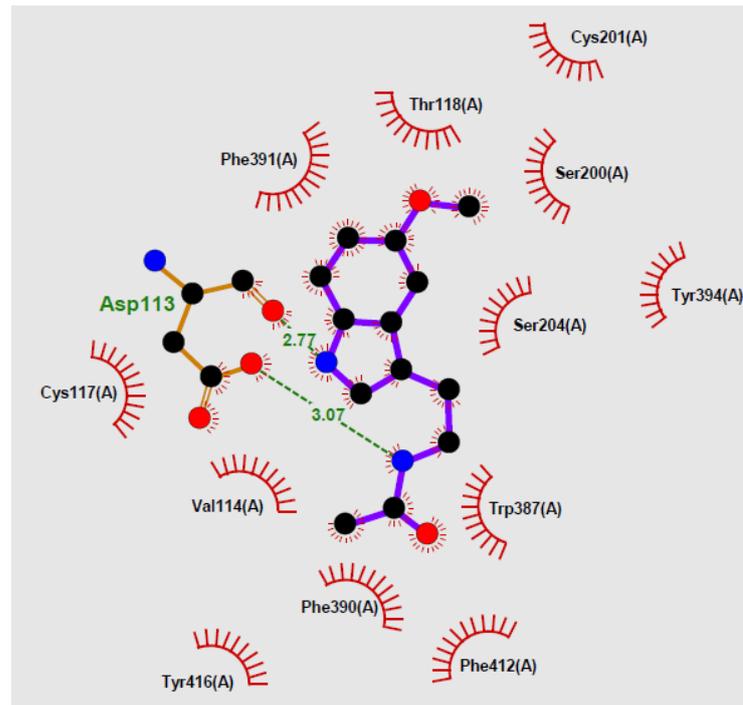


Figura 12. Representação gráfica bidimensional dos tipos de interações pós-docagem reveladas na formação do complexo do receptor alfa-2A adrenérgico 6kux e do ligante melatonina. Em destaque ao centro são evidenciadas as estruturas do ligante melatonina (com átomos de nitrogênio, oxigênio e carbono representados em esferas azuis, vermelhas e pretas, respectivamente, e conectados entre si por meio de linhas contínuas azuis) e do aminoácido ácido aspártico Asp113 da proteína receptora (com seus átomos de nitrogênio, oxigênio e carbono representados em esferas azuis, vermelhas e pretas, respectivamente, e conectados entre si por meio de linhas contínuas amarelas). As linhas tracejadas em verde evidenciam as interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio entre os átomos do ligante e os aminoácidos da proteína receptora com suas respectivas distâncias em Å. Os 12 arcos com raios (representados em vermelho) indicam os aminoácidos do receptor de interesse estabilizados a átomos do ligante melatonina, que também encontram-se sinalizados por raios vermelhos, indicando a ocorrência de interações intermoleculares hidrofóbicas entre eles durante a formação do complexo. Fonte: imagem gerada pela autor por meio da ferramenta LIGPLOT v.2.2.4 (WALLACE; LASKOWSKI, THORNTON, 1995).

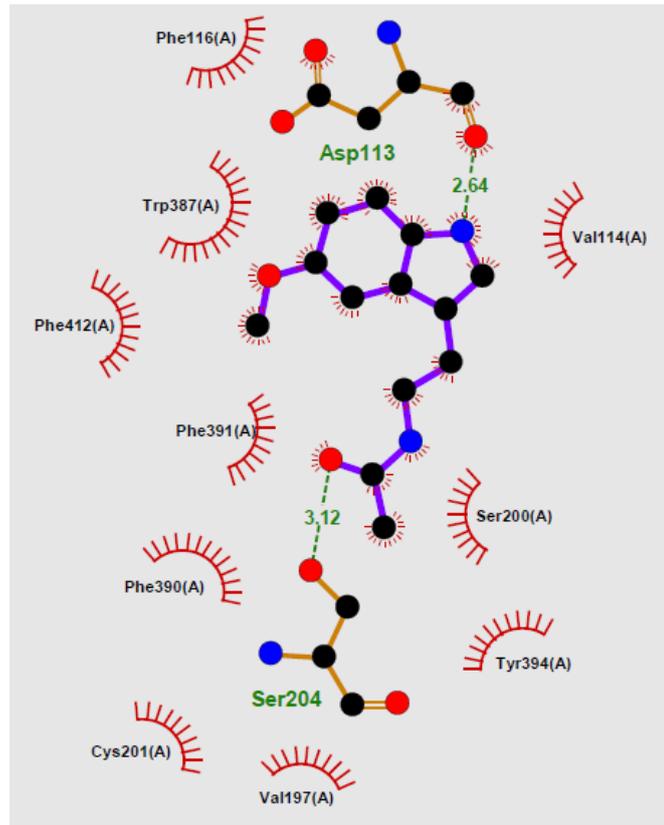


Figura 13. Representação gráfica bidimensional dos tipos de interações pós-docking reveladas na formação do complexo do receptor alfa-2A adrenérgico 6kuy e do ligante melatonina. Em destaque ao centro são evidenciadas as estruturas do ligante melatonina (com seus átomos de nitrogênio, oxigênio e carbono representados em esferas azuis, vermelhas e pretas, respectivamente, e conectados entre si por meio de linhas contínuas azuis), e os aminoácidos ácido aspártico Asp113 e serina Ser204 da proteína receptora (com seus átomos de nitrogênio, oxigênio e carbono representados em esferas azuis, vermelhas e pretas, respectivamente, e conectados entre si por meio de linhas contínuas amarelas). As linhas tracejadas em verde evidenciam as interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio entre os átomos do ligante e os aminoácidos da proteína receptora com suas respectivas distâncias em Å. Os 10 arcos com raios (representados em vermelho) indicam os aminoácidos do receptor de interesse estabilizados a átomos do ligante melatonina, que também encontram-se sinalizados por raios vermelhos, indicando a ocorrência de interações intermoleculares hidrofóbicas entre eles durante a formação do complexo. Fonte: imagem gerada pela autor por meio da ferramenta LIGPLOT v.2.2.4 (WALLACE; LASKOWSKI, THORNTON, 1995).

Nas análises *in silico* estabelecidas no presente estudo não foi observada a formação de complexos dos fármacos mazindol e sibutramina e de outras proteínas receptoras-alvo devido à não identificação de nenhuma sequência de uma outra potencial proteína-alvo nos alinhamentos múltiplos gerados com receptores sabidamente reconhecidos para ambos os medicamentos a partir dos bancos de dados empregados. Como dezenas de novas sequências e estruturas tridimensionais são continuamente depositadas em bancos de dados de informação biológica, tais como: UniProt, STRING, PDB, deve-se ressaltar que os resultados apresentados no presente estudo podem estar sujeitos a alterações em futuras análises, visto que

potenciais proteínas-alvo correlatas não identificadas neste momento poderão ser reveladas em estudos posteriores.

As descobertas descritas no presente estudo revelaram por docagem molecular a formação de complexo do neurohormônio melatonina e dos receptores alfa-2A adrenérgicos, apresentando menores estimativas de energia livre de ligação e ocorrência de interações intermoleculares não covalentes do tipo ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Figuras 12 e 13). A energia livre de ligação corresponde a soma de valores favoráveis e desfavoráveis para a formação do complexo proteína-ligante (GUIMARÃES, 2012). Segundo Russell (1994), uma característica das reações espontâneas é a tendência de os sistemas buscarem um estado de menor energia, ou seja, ocorre perda de energia para as suas vizinhanças. Dessa forma, valores mais negativos de energia livre de ligação são mais favoráveis, para o sucesso das interações entre um ligante e uma proteína receptora de interesse. Sob o contexto das interações entre proteína-ligante, as interações intermoleculares possuem um papel central. Segundo Guimarães (2012), o ganho entálpico proveniente das interações intermoleculares pode ser o efeito mais significativo para a especificidade e a afinidade para a formação do complexo proteína-ligante. Nesta perspectiva, as ligações de hidrogênio são interações intermoleculares fracas que ocorrem apenas entre moléculas que possuem um átomo de hidrogênio preso a átomos muito eletronegativos, tais como: oxigênio O, flúor F e nitrogênio N (ROZENBERG, 2002). Os elétrons são deslocados e ficam mais próximos dos átomos eletronegativos (aceptores), dessa forma, ocorre a formação de uma carga parcial positiva ($\delta+$) sobre o átomo de hidrogênio (doador) e uma carga parcial negativa sobre o átomo mais eletronegativo ($\delta-$) (DELATORRE, 2015). Já as interações hidrofóbicas ocorrem entre moléculas não polares, e caracterizam-se como um tipo de força entrópica, pois quando as moléculas hidrofóbicas estão em um meio aquoso, as moléculas de água do meio tendem a formar uma camada de solvatação ao redor das moléculas hidrofóbicas, elevando o grau de organização das moléculas de água e maximizando as ligações de hidrogênio (DELATORRE, 2015). Para reverter esse processo e elevar a entropia ocorrem as interações hidrofóbicas, as quais minimizam a organização do solvente (DELATORRE, 2015). Desta forma, tais interações hidrofóbicas também possuem um papel importante na formação do complexo proteína-ligante, visto que a maioria dos sítios ativos de ligação das proteínas

receptoras são compostos majoritariamente por grupos hidrofóbicos (GUIMARÃES, 2012).

Sabidamente, os receptores adrenérgicos pertencem à uma grande família de proteínas receptoras transmembranares ligados à proteína G, sendo alvos das catecolaminas (PIASCIK; PEREZ, 2001). Por apresentar ampla distribuição no tecido neuronal e não neuronal, são responsáveis por mediar respostas decorrentes da liberação de noradrenalina nos terminais nervosos pós-ganglionares, mas também em função da liberação de noradrenalina e adrenalina pela medula adrenal (CALZADA; DE ARTIÑANO, 2001). Ainda, Lima et al. (2007) enfatizam a importância destes receptores sobre a regulação do gasto energético e da lipólise, contribuindo diretamente sobre a obesidade e suas potenciais alterações metabólicas correlatas. Especialmente, os receptores alfa adrenérgicos medeiam a maioria das funções excitatórias, como vasoconstrição, contração da musculatura uterina, contração da uretra, dilatação da pupila, entre outros (CALZADA; DE ARTIÑANO, 2001). Entretanto, embora já esteja bem esclarecido que o receptor alfa-2A adrenérgico está envolvido na inibição da mobilização de ácidos graxos a partir do tecido adiposo (GARENC et al., 2002), alguns estudos têm destacado a associação de polimorfismos identificados no gene ADRA2A, que codifica esta proteína receptora, com o quadro típico de obesidade. Sob este contexto, Långberg et al. (2013) identificaram o polimorfismo SNP rs553668 no gene ADRA2A associado fortemente com obesidade, doenças cardiovasculares, hiperglicemia e hipertensão em uma população sueca, e tais descobertas também foram evidenciadas em uma população da Malásia (SHUNMUGAM; SAY, 2016).

Recentemente, a suplementação de melatonina tem sido proposta como um adjuvante alternativo no tratamento contra a obesidade devido a seus efeitos positivos sobre a lipólise e a glicemia, além de suas efetivas ações antioxidante e anti-inflamatória (GENARIO et al., 2021). Um aspecto particularmente importante a ser destacado refere-se ao fato que, diferentemente de outros medicamentos recomendados para o combate da obesidade, não há relatos na literatura de efeitos colaterais graves da suplementação com melatonina em pacientes obesos (GENARIO et al., 2021). Ainda, segundo estes mesmos autores, a suplementação de melatonina em pacientes obesos em dosagens variando de 1 a 20 mg/dia por um período de 3 semanas a 12 meses demonstrou ação importante da melatonina sobre a homeostase glicêmica, a modulação da atividade do tecido adiposo unilocular e do metabolismo

lipídico, da atividade mitocondrial, provocando ainda aumento no volume e na atividade do tecido adiposo marrom, embora os mecanismos moleculares de ação deste neurohormônio ainda não estejam completamente esclarecidos.

Interessantemente, dados experimentais preliminares descritos na literatura têm revelado uma possível interação do neurohormônio melatonina e receptores adrenérgicos. Crooke et al. (2013) confirmaram *in vitro* a ação indireta de derivados da melatonina sobre os receptores adrenérgicos de globos oculares, potencializando efeitos hipotensivos oculares em coelhos, e abrindo a possibilidade do emprego da melatonina como tratamento alternativo ao controle da doença ocular glaucoma. Assim, baseado nas evidências descritas no presente estudo, destacando a formação de um complexo melatonina-receptor alfa-2A adrenérgico estabilizado por interações intermoleculares e valores de energia de boa afinidade, pode-se futuramente vislumbrar o emprego da melatonina como uma possível implicação ao tratamento de outras patologias específicas, entre elas, o controle da obesidade.

De fato, Souza et al. (2019) enfatizam que a caracterização estrutural e das variações de energia de ligação de como um fármaco pode se ligar em um receptor proteico torna-se de suma importância na busca do entendimento de sua distribuição pelo corpo humano, na sua taxa de metabolismo e na sua excreção. Especialmente, quando comparados os resultados pós-docagens, os melhores valores de energia e interações intermoleculares estabilizadoras foram demonstrados na formação do complexo do ligante melatonina e do receptor alfa-2A adrenérgico 6kuy, cuja estrutura cristalográfica originalmente encontrava-se acoplada a um substrato agonista parcial, e que foi removido manualmente nas etapas de preparação desta estrutura aos estudos *in silico*. Associando os dados gerados nas análises de docagem molecular a descobertas descritas na literatura sobre os efeitos hipotensivos oculares da melatonina, pode-se especular aqui que a melatonina poderia estar exercendo um possível efeito agonista parcial sobre o receptor alfa-2A adrenérgico a partir destas evidências. Entretanto, faz-se necessário elaborar e conduzir estudos experimentais e teóricos adicionais para refutar ou confirmar tal hipótese.

Um medicamento para ser considerado eficaz, particularmente contra a obesidade, deve obedecer a alguns critérios, tais como: possuir efeito na redução do peso corporal, provocar melhora nas doenças dependentes do excesso de peso, ter efeitos colaterais toleráveis e/ou transitórios, não causar dependência, possuir mecanismo de ação conhecido, não possuir alto custo, apresentar eficácia e

segurança mantidas a longo prazo (MANCINI; HALPERN, 2002). Sendo assim, a melatonina poderia ser considerada um excelente medicamento alternativo ao tratamento da obesidade, por não apresentar efeitos colaterais graves, podendo ser administrada de forma segura em pacientes com problemas cardiovasculares e/ou doenças associadas ao sistema nervoso central. E, mesmo apesar de não apresentar uma ação anorexígena, como observado nos fármacos mazindol e sibutramina, o uso da melatonina como um coadjuvante no tratamento da obesidade pode no futuro ser considerado bastante promissor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As descobertas descritas no presente estudo sugerem a ocorrência de formação de complexos melatonina-receptores alfa-2A adrenérgicos por análises de docagem molecular, demonstrando valores de energia satisfatórios e estabilidade por interações intermoleculares não covalentes. Tendo em vista o caráter meramente preditivo dos resultados gerados neste estudo, é preciso destacar a necessidade de estabelecer futuros procedimentos e testes *in vitro*, tais como: cristalografia de raios-X e/ou ensaios enzimáticos, para assegurar a validação experimental das descobertas demonstradas nas análises *in silico* acerca da formação do complexo melatonina-receptor alfa 2A adrenérgico. De fato, investigações adicionais por redocagem (também conhecido por “redocking”) devem ser conduzidas para verificar se as ligações químicas observadas em estruturas testadas experimentalmente por cristalografia de raio-X e as descobertas descritas nos resultados pós-docagens reveladas no presente estudo apresentam semelhanças e similares estruturais. A redocagem parte do princípio que um ligante oriundo da estrutura experimental pode ser extraído e posteriormente reinserido por um servidor de docagem. Sendo assim, tal comparação direta entre os resultados experimentais e teóricos poderá fornecer subsídios relevantes para verificar e confirmar se o ligante melatonina estaria atuando como um potencial substrato agonista ou antagonista, quando em complexo com o receptor alfa-2A adrenérgico. Ainda, o desenvolvimento de futuras análises *in vitro* de incompatibilidade ou de interação farmacêutica do complexo melatonina-receptor alfa-2A adrenérgico também poderá fornecer relevantes respostas bioquímicas, fisiológicas e moleculares especificamente desencadeadas por células e tecidos especializados e diretamente associados ao controle e ao tratamento da melhora do

estado obeso. Desta forma, a partir dos dados preliminares preditos no presente estudo futuras perspectivas de elaboração e condução de procedimentos adicionais empregando diferentes ferramentas experimentais e teóricas devem ser estabelecidas a fim de postular e testar novas hipóteses, visando à melhor caracterização e elucidação das interações químicas envolvidas na formação do complexo melatonina e receptor alfa-2A adrenérgico.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, Timothy EH *et al.* Defining molecular initiating events in the adverse outcome pathway framework for risk assessment. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 12, p. 2100-2112, 2014.
- APWEILER, Rolf *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl_1, p. D115-D119, 2004.
- BLÜHER, Matthias. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288-298, 2019.
- BOUCHENTOUF, Salim; MISSOUM, Nouredine. Identification of Compounds from Nigella Sativa as New Potential Inhibitors of 2019 Novel Coronasvirus (Covid-19): Molecular Docking Study. **Biological and Medicinal Chemistry**, [s. l.], 2020
- BRADLEY, Matthew H.; BLUM, Norman J.; SCHEIB, Ronald J. Mazindol in obesity with known cardiac disease a clinical evaluation. **Journal of International Medical Research**, v. 2, n. 5, p. 347-349, 1974.
- BRAY, George A. *et al.* Sibutramine produces dose-related weight loss. **Obesity Research**, v. 7, n. 2, p. 189-198, 1999.
- CALZADA, Beatriz Civantos; DE ARTIÑANO, Amaya Aleixandre. Alpha-adrenoceptor subtypes. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 195-208, 2001.
- CAMPOS, LARISSA SOARES *et al.* Estudo dos efeitos da sibutramina. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 3, 2014.
- 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, 2009.
- CROOKE, Almudena *et al.* Melatonin and its analog 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine potentiate adrenergic receptor-mediated ocular hypotensive effects in rabbits: significance for combination therapy in glaucoma. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 346, n. 1, p. 138-145, 2013.
- CHACÓN ACEVEDO, Kelly *et al.* Eficacia y seguridad de la cloroquina, la hidroxicloroquina y la azitromicina en pacientes con COVID-19. Resumen de evidencia. **Revista Colombiana de Nefrología**, v. 7, p. 21-41, 2020.
- CHOOI, Yu Chung; DING, Cherlyn; MAGKOS, Faidon. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v. 92, p. 6-10, 2019.
- DA SILVA, Lilian Moura Costa *et al.* O emprego de vídeos curtos postados no youtube para falar de obesidade em um projeto de extensão. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 13, n. 2, 2021.

DEDOV, Ivan Ivanovich *et al.* Body weight reduction associated with the sibutramine treatment: overall results of the PRIMAVERA primary health care trial. **Obesity facts**, v. 11, n. 4, p. 335-343, 2018.

DE JESUS COSTA, Alciêne Maria; DUARTE, Stênio Fernando Pimentel. Principais medicamentos utilizados no tratamento da obesidade e vias de ação: uma revisão sistemática. **Id On Line Revista de Psicologia**, v. 11, n. 35, p. 199-209, 2017.

DELATORRE, Plinio. **Biofísica para Ciências Biológicas**. João Pessoa: UFPB, 2015. 106 p. ISBN 978-85-237-1010-1.

DE OLIVEIRA MARQUES, Danielle; QUINTILIO, Maria Salete Vaceli. Farmacologia da obesidade e riscos das drogas para emagrecer. **Revista Coleta Científica**, v. 5, n. 9, p. 38-49, 2021.

DE RUYCK, Jerome *et al.* Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Advances and Applications in Bioinformatics and chemistry: AABC**, v. 9, p. 1, 2016.

DE SOUZA, Caroline AP *et al.* Melatonin multiple effects on brown adipose tissue molecular machinery. **Journal of pineal research**, v. 66, n. 2, p. e12549, 2019.

DOS SANTOS, Kadu Pereira; DA SILVA, Guilherme Eduardo; MODESTO, Karina Ribeiro. Perigo dos medicamentos para emagrecer. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 2, n. 1, p. 37-45, 2019.

ENZI, G. *et al.* Short-term and long-term clinical evaluation of a non-amphetaminic anorexiant (mazindol) in the treatment of obesity. **Journal of International Medical Research**, v. 4, n. 5, p. 305-318, 1976.

FASSLER, J.; COOPER, P. BLAST glossary. 2011 Jul 14. **BLAST® Help [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)**, 2008.

FERNÁNDEZ VÁZQUEZ, Gumersindo; REITER, Russel J.; AGIL, Ahmad. Melatonin increases brown adipose tissue mass and function in Zucker diabetic fatty rats: implications for obesity control. **Journal of pineal research**, v. 64, n. 4, p. e12472, 2018.

FRANCO, Ruth Rocha; COMINATO, Louise; DAMIANI, Durval. O efeito da sibutramina na perda de peso de adolescentes obesos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, p. 243-250, 2014.

GARENC, Christophe *et al.* The alpha2-adrenergic receptor gene and body fat content and distribution: the HERITAGE Family Study. **Molecular medicine**, v. 8, n. 2, p. 88-94, 2002.

GENARIO, Rafael *et al.* Melatonin supplementation in the management of obesity and obesity-associated disorders: A review of physiological mechanisms and clinical applications. **Pharmacological Research**, v. 163, p. 105254, 2021.

GUEDES, Isabella A.; DE MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-87, 2014.

GUIMARÃES, Cristiano RW. As Múltiplas Contribuições para a Complexação Proteína-Ligante: Consequências em Drug Design. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 348-364, 2012.

GUPTA, Hima; GARG, Shweta. Obesity and overweight—their impact on individual and corporate health. **Journal of Public Health**, v. 28, n. 2, p. 211-218, 2020.

HOSSEINI, Maryam et al. Computational molecular docking and virtual screening revealed promising SARS-CoV-2 drugs. **Precision Clinical Medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 2021.

HUANG, Conrad C. et al. Enhancing UCSF Chimera through web services. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W478-W484, 2014.

JEONG, Jaeseong; KIM, Hunbeen; CHOI, Jinhee. In silico molecular docking and in vivo validation with *Caenorhabditis elegans* to discover molecular initiating events in adverse outcome pathway framework: case study on endocrine-disrupting chemicals with estrogen and androgen receptors. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 5, p. 1209, 2019.

JOHNSON, Mark et al. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W5-W9, 2008.

LÅNGBERG, Ewa-Carin et al. Genetic association of adrenergic receptor alpha 2A with obesity and type 2 diabetes. **Obesity**, v. 21, n. 8, p. 1720-1725, 2013.

LIMA, John J. et al. Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. **Metabolism**, v. 56, n. 6, p. 757-765, 2007.

LUCCHETTA, Rosa Camila et al. Diethylpropion and mazindol: An end to the discussion?. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, p. 203-206, 2017.

MANCINI, Marcio C.; HALPERN, Alfredo. Tratamento farmacológico da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 497-512, 2002.

MORRIS, Garrett M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. [S. l.]: Artmed Editora, 2018. 1312p

PAYAB, Moloud et al. Brown adipose tissue transplantation as a novel alternative to obesity treatment: A systematic review. **International Journal of Obesity**, v. 45, n. 1, p. 109-121, 2021.

PIASCIK, Michael T.; PEREZ, Dianne M. α 1-Adrenergic receptors: new insights and directions. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 2, p. 403-410, 2001.

PRADO, Natalia Jorgelina et al. Anti-inflammatory effects of melatonin in obesity and hypertension. **Current hypertension reports**, v. 20, n. 5, p. 1-12, 2018.

PROSDOCIMI, Francisco et al. Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 12-25, 2002.

PRIETO-MARTÍNEZ, Fernando D.; ARCINIEGA, Marcelino; MEDINA-FRANCO, José L. Molecular docking: current advances and challenges. **TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, v. 21, 2018.

RADOMINSKI, R. B. et al. Atualização das diretrizes para o tratamento farmacológico da obesidade e do sobrepeso. **Projeto Diretrizes. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) e Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM)**, p. 4-18, 2010

RAZAK, Suhail et al. Molecular docking, pharmacokinetic studies, and in vivo pharmacological study of indole derivative 2-(5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-yl)-N'-[(E)-(3-nitrophenyl) methylidene] acetohydrazide as a promising chemoprotective agent against cisplatin induced organ damage. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-23, 2021.

ROZENBERG, Izrael Mordka. **Química geral**. Editora Blucher, 2002.

RUSSEL, Jhon B. Química Geral; 2ª edição. **Editora Makron**, 1994.

SETHI, Aaftaab et al. Molecular docking in modern drug discovery: principles and recent applications. **Drug Discovery and Development-New Advances**, p. 1-21, 2019.

SHUNMUGAM, Vigneswari; SAY, Yee-How. Evaluation of association of ADRA2A rs553668 and ACE I/D gene polymorphisms with obesity traits in the Setapak population, Malaysia. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 2, 2016.

SILVA, Flávio Diniz. Docking molecular para determinação de fármacos com maior afinidade aos alvos candidatos para o tratamento de adenocarcinoma gástrico. Faculdade Promove, 2018.

SLAMA, G. et al. Double blind clinical trial of mazindol on weight loss blood glucose, plasma insulin and serum lipids in overweight diabetic patients. **Diabete & metabolisme**, v. 4, n. 3, p. 193-199, 1978.

SMITH, R. G.; INNES, J. A.; MUNRO, J. F. Double-blind evaluation of mazindol in refractory obesity. **British medical journal**, v. 3, n. 5978, p. 284, 1975.

SOARES, Andrea de Fátima Torres; CARVALHO, Geraldo Andrade. Physiological selectivity of insecticides to eggs and larvae of predator *Chrysoperla externa* (HAGEN)(Neuroptera: Chrysopidae). **Coffee Science**, v. 13, p. 292-303, 2018.

SOUZA, Aguinaldo Robinson de et al. Elucidação da quiralidade induzida na molécula dansilglicina na complexação com a proteína albumina do soro humano (HSA). **Química nova**, v. 42, p. 135-142, 2019.

SOUZA, D.; LIFSCHITZ, Sergio. Avaliação do E-value para execução do BLAST sobre base de dados fragmentadas. **Monografia. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro**, p. 1-5, 2007.

SZKLARCZYK, Damian et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D607-D613, 2019.

TU, Maolin et al. Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 7-17, 2018.

TZIOMALOS, Konstantinos; KRASSAS, Gerasimos E.; TZOTZAS, Themistoklis. The use of sibutramine in the management of obesity and related disorders: an update. **Vascular health and risk management**, v. 5, p. 441, 2009.

KIM, Sunghwan et al. PubChem substance and compound databases. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1202-D1213, 2016.

KIM, Sunghwan et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. D1388-D1395, 2021.

WALLACE, Andrew C.; LASKOWSKI, Roman A.; THORNTON, Janet M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering, design and selection**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

WEININGER, David. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 28, n. 1, p. 31-36, 1988.

WISHART, David S. et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D1074-D1082, 2018.

wwPDB CONSORTIUM. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D520-D528, 2019.

XU, Pengfei et al. Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. **Journal of pineal research**, v. 62, n. 4, p. e12399, 2017.

YANG, Fang-Wei et al. Assessment of the endocrine-disrupting effects of organophosphorus pesticide triazophos and its metabolites on endocrine hormones

biosynthesis, transport and receptor binding in silico. **Food and Chemical Toxicology**, v. 133, p. 110759, 2019.