

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MARIANA SABO FERNANDES

**ESTUDOS DE PLANEJAMENTO DE ECDIESTERÓIDES COM AÇÃO
ANALGÉSICA POTENCIAL: DOCKING MOLECULAR E DE FARMACÓFORO**

**Uruguaiana
2018**

MARIANA SABO FERNANDES

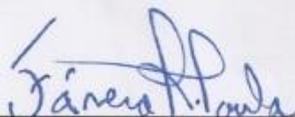
**ESTUDOS DE PLANEJAMENTO DE ECDIESTERÓIDES COM AÇÃO
ANALGÉSICA POTENCIAL: DOCKING MOLECULAR E DE FARMACÓFORO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a aprovação na disciplina de trabalho de conclusão de curso.

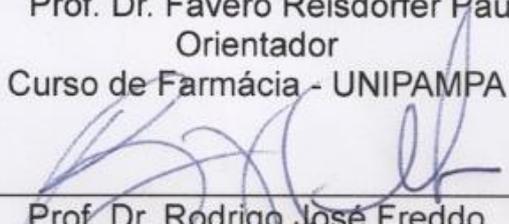
Orientador: Fávero Reisdorfer Paula

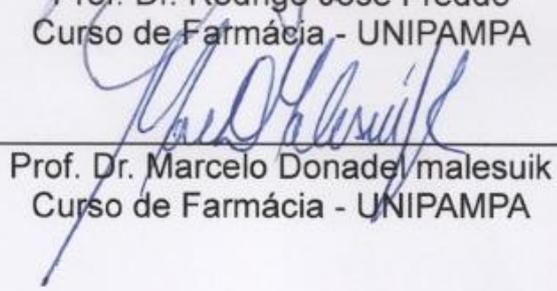
Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 06 / 07 / 2018

Banca examinadora:



Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula
Orientador
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof. Dr. Rodrigo José Freddo
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

Prof. Dr. Marcelo Donadei Malesuik
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

Dedico este trabalho à minha irmã, Marília Sabo Fernandes, por todo apoio incondicional dedicado a mim ao longo deste curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e demais familiares pelo estímulo e apoio – emocional e financeiro – que foram determinantes para a finalização desta longa caminhada chamada “faculdade de Farmácia”. Agradeço, especialmente à minha mãe, por todas as caronas nos dias de chuva (e nos dias que eu estava atrasada também). Família: eu amo vocês, e faltam palavras para expressar o sentimento de gratidão.

Agradeço a todos os meus colegas, que hoje são amigos e companheiros de profissão, por todas as horas de estudos e debates que passamos juntos, em especial a Karine e o Jean, estudar com vocês sempre foi um privilégio (mesmo quando restavam 30min antes da prova). Agradeço a Carol, não só pelas aventuras de moto, mas por todo o companheirismo ao longo dessa caminhada, minha “irmã” que a faculdade me deu.

Agradeço aos meus professores pelos ensinamentos, vocês são demais! Em especial aos professores de bioquímica e farmacologia: Daiana, Freddo e Luis Flávio, vocês me deram a certeza de que estou no curso que me completa e que me fará realizada profissionalmente. Agradeço a minha professora Raqueli, que mesmo atuando por pouco tempo na universidade, deixou um legado de alunos mais humanitários com os seus ensinamentos.

Agradeço a minha banca, Marcelo e Freddo, por aceitarem meu convite e dedicarem seu tempo a mim e a este trabalho.

Agradeço ao meu orientador Fávero pela dedicação desde o primeiro contato, na disciplina de química farmacêutica. Obrigada por ser esse professor maravilhoso que não mede esforços para se fazer entender nas tuas aulas. Tua didática é incrível e deveria ser empregada como modelo. Tenha certeza que todo aluno que passa pela QF carregará uma forte e boa lembrança das tuas aulas. Saiba que é só na QF que tudo faz sentido na nossa vida acadêmica. É a pecinha que faltava neste grande e complicado quebra-cabeças.

Agradeço ao meu colega de laboratório Hemerson pelo convite pra fazer parte do seu estudo, o qual foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Também agradeço aos amigos, tantos os que já passaram como aqueles que ainda estão presentes na minha vida, que por algum momento foram determinantes para a conclusão deste curso.

“A gratidão desbloqueia a abundância da vida. Ela torna o que temos em suficiente, e mais: ela torna a negação em aceitação, caos em ordem, confusão em clareza. Ela pode transformar uma refeição em um banquete, uma casa em um lar, um estranho em um amigo. A gratidão dá sentido ao nosso passado, traz paz para o hoje e felicidade para o amanhã.”

Melody Beattie

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura da 20-hidroxicdisona	20
FIGURA 2: Estruturas das 60 moléculas derivadas do composto 20E	25
FIGURA 3: Interação entre o receptor Mu e os compostos 20E e molécula 49, e o principal resíduo de aminoácido envolvido.....	31
FIGURA 4: Interação entre o receptor Delta e os compostos 20E e molécula, e o principal resíduo de aminoácido envolvido.....	31
FIGURA 5: Interação entre o receptor Kappa e os compostos 20E e molécula 41, e o principal resíduo de aminoácido envolvido.....	32
FIGURA 6: Esqueleto molecular do farmacóforo e suas distâncias intramoleculares	33
FIGURA 7: Sobreposição da molécula 49 no farmacóforo	33
FIGURA 8: Sobreposição da molécula 6 no farmacóforo	34
FIGURA 9: Sobreposição da molécula 41 no farmacóforo	34
FIGURA 10: Sobreposição do composto 20E no farmacóforo.....	35
FIGURA 11: Estrutura do composto 20E e seus derivados 49, 6 e 41	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Interações farmacológicas centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados do 20E envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Mu (4dkl – BFO).	28
TABELA 2: Interações farmacológicas centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados do 20E envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Delta (4ej4 – EJ4).....	28
TABELA 3: Interações farmacológicas centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados do 20E envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Kappa (4djh – OLC).....	29
TABELA 4: Compostos derivados do 20E e os principais resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Mu.....	29
TABELA 5: Compostos derivados do 20E e os principais resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Delta.....	30
TABELA 6: Compostos derivados do 20E e os principais resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Kappa.....	30

RESUMO

Os ecdisteróides são hormônios esteroidais presentes em quase todas as classes de artrópodes e filos invertebrados. São análogos aos fitoecdisteróides, presentes nas plantas. Devido a sua similaridade estrutural com compostos esteroides humanos, muitos destes apresentam atividade hormonal ou antinociceptiva. A ecdisona é a precursora do composto 20-hidroxiecdisona (20E) que, por sua vez, é um importante hormônio esteróide que controla o desenvolvimento embrionário do filo *Arthropoda*. Estudos relatam atividade antinociceptiva de extrato de plantas contendo ecdisteróides. Em virtude a este efeito foi proposto o planejamento e desenho de 60 compostos derivados do 20E e a aplicação de estudos de modelagem molecular através de docking molecular nos receptores opióides, e o estudo de farmacóforo. Estes estudos ocorreram para fins de obtenção de modelos que permitam desenvolver compostos derivados do 20E com atividade antinociceptiva potencial. O software Spartan'08 para Windows e métodos de cálculo de mecânica quântica AM1 e DFT/B3LYP com base de dados 6.31G* foram utilizados para desenho, otimização de geometria e análise conformacional dos compostos. Os estudos de docking foram realizados com o emprego de software iGemdock 2.1. Os receptores opióides μ (Mu - PDB ID: 4DKL), δ (Delta - PDB ID: 4EJ4), κ (Kappa - PDB ID: 4DJH) foram baixados do Protein Data Bank (PDB). Uma avaliação prévia do docking molecular permitiu a seleção de 12 compostos derivados do 20E que possam estar atuando com maior afinidade nos receptores opióides. A partir disto, observa-se que as principais interações dos derivados do 20E no receptor Mu ocorrem com os resíduos ASP – 147, HIS – 297, LYS – 303, TYR – 148, LYS – 233. No receptor Delta nos resíduos ASP – 128, TYR – 308, TYR – 129, TRP – 274, TYR – 308, e no receptor Kappa nos resíduos THR – 171, ALA – 175, PHE – 169 e LYS – 174. Estes dados estão em concordância com a literatura, que aponta a interação destes resíduos de aminoácidos com o composto 20-hidroxiecdisona no receptor Mu. O modelo farmacóforo apresentou sítios de interação hidrofóbica em região espacial específica que permitiram seu uso na seleção de prováveis compostos bioativos.

Palavras chave: 20-hidroxiecdisona, docking molecular, farmacóforo, ecdisteróides, receptores opióides.

ABSTRACT

The ecdysteroids are steroidal hormones present in almost all classes of arthropods and invertebrate phyla. They are analogous to phytoecdysteroids present in plants. Because of their structural similarity to human steroid compounds, many of these have hormonal or antinociceptive activity. Ecdysone is the precursor of the 20-hydroxyecdysone (20E) compound which, in turn, is an important steroid hormone that controls the embryonic development of the Arthropoda phylum. Studies report antinociceptive activity of plant extracts containing ecdysteroids. Due to this effect, it was proposed the planning and design of 60 compounds derived from 20E and the application of molecular modeling studies through molecular docking at the opioid receptors, and the study of pharmacophore. These studies were carried out in order to obtain models that allow the development of 20E derivatives with potential antinociceptive activity. The Spartan'08 software for Windows and quantum mechanics calculation methods AM1 and DFT / B3LYP with 6.31G * database were used for design, geometry optimization and conformational analysis of the compounds. The docking studies were performed using iGemdock 2.1 software. Opioid receptors μ (Mu-PDB ID: 4DKL), δ (Delta-PDB ID: 4EJ4), κ (Kappa-PDB ID: 4DJH) were downloaded from Protein Data Bank (PDB). A previous evaluation of the molecular docking allowed the selection of 12 compounds derived from 20E that may be acting with greater affinity at the opioid receptors. From this it is observed that the major interactions of the 20E derivatives at the Mu receptor occur with residues ASP-147, HIS-297, LYS-303, TYR-148, LYS-233. At the Delta receptor at ASP-128 residues, TYR-308, TYR-129, TRP-274, TYR-308, and at the Kappa receptor at residues THR-171, ALA-175, PHE-169 and LYS-174. These data are in agreement with the literature, the interaction of these amino acid residues with the 20-hydroxyecdysone compound at the Mu receptor. The pharmacophore model presented sites of hydrophobic interaction in specific spatial region that allowed its use in the selection of probable bioactive compounds.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
3.1. GERAL.....	14
3.2. ESPECÍFICOS.....	14
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS	20
5.1. COMPOSTOS DERIVADOS DO 20E E DOCKING MOLECULAR.....	20
5.1.1. Desenho e estudo de propriedades físico-químicas	20
5.1.2. Análise e ancoramento molecular (Docking).....	26
5.2. ESTUDO DE FARMACÓFORO	26
6. RESULTADOS	27
6.1. ESTUDO DE ANCORAMENTO MOLECULAR.....	27
6.2. ESTUDO DE FARMACÓFORO	32
7. DISCUSSÃO	36
7.1. ANÁLISE DO ANCORAMENTO MOLECULAR	36
7.2. ANÁLISE DO FARMACÓFORO	37
8. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

Os ecdisteróides foram descobertos como hormônios esteroidais reguladores do crescimento em insetos. Entretanto, estes esteróides existem em quase todas as outras classes de artrópodes e também em outros filões de invertebrados. Análogos estruturais dos ecdisteróides, os fitoecdisteróides são amplamente distribuídos como metabólitos secundários nas plantas (DINAN, 2001). Devido a sua similaridade estrutural com os compostos esteroides humanos, muitos apresentam atividade hormonal ou antinociceptiva semelhante. A ecdisona, precursora da 20-hidroxiecdisona (20E), é sintetizada a partir do colesterol dietético em glândulas protorácicas de insetos, e secretada para hemolinfa e oxidada a 20E em tecidos periféricos. A 20E é um importante hormônio esteróide que controla o desenvolvimento embrionário, a metamorfose e a reprodução em membros do filo *Arthropoda* (TAKEI, 2016).

Estudos relatam atividade antinociceptiva de extrato de plantas contendo ecdisteróides. LEITÃO et al. (2011) sugerem que os extratos de folhas de *Vitex cymosa* foram capazes de promover atividade antinociceptiva periférica e central mediada pelo sistema opióide.

ROSA (2017) demonstrou em seus experimentos que, pelo menos em parte, o mecanismo de ação do extrato obtido de *Sida tuberculata* envolve o sistema opióide, uma vez que seu efeito foi revertido pela Naloxona (inibidor não seletivo dos receptores opióides). Neste contexto, os principais compostos presentes no extrato em questão foram submetidos à avaliação por Docking computacional, cujos resultados demonstraram que as moléculas estudadas podem interagir principalmente com o receptor opióide Mu. Desta forma, alguns derivados de ecdisteróides se apresentam como substâncias candidatas ao desenvolvimento de agentes com ação antinociceptiva.

A modulação causada por esteróides junto à sinalização da sensibilidade à dor é bem conhecida em mamíferos (MELCANGI, 2008). A dor é um componente presente praticamente em todas as patologias clínicas e seu tratamento é um imperativo clínico fundamental para o êxito da terapêutica. Os opióides constituem uma das classes básicas utilizadas no tratamento da dor (GOODMAN & GILMAN, 2015).

A pesquisa de novas substâncias bioativas baseia-se em duas estratégias principais: Indireta e direta. A indireta é usada para se estudar a estrutura dos compostos, principalmente, e a macromolécula alvo não é conhecida. Assim, informações sobre determinadas atividades biológicas, características estruturais e propriedades físico-químicas moleculares podem ser utilizadas para se obter informações que permitam aperfeiçoar sua obtenção ou mesmo a sua atividade biológica. Entre as principais características de uma molécula que podem influenciar a atividade biológica se destacam os descritores de propriedades estereoelétrônicas, como: volume molecular, potencial eletrostático molecular, densidade eletrônica, energia e coeficiente dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, energia de ionização, ordem de ligação e momento de dipolo, grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, e de hidrofobicidade, como presença de grupos hidrofóbicos e coeficiente de partição (BARREIRO, 1997).

A estratégia direta considera as características tridimensionais de um alvo biológico conhecido, enzima ou receptor relacionado com a disfunção que se quer estudar, e a análise do complexo formado entre ligante e este alvo, identificando-se possíveis sítios preferenciais de ligação e principais modos de interação. Estes dados permitem propor modificações específicas na estrutura do ligante, com o objetivo de aumentar a afinidade e especificidade ao alvo (VAN GUNSTEREN, 1994; AJAY e MURCKO, 1995).

As técnicas de docking molecular fornecem estimativas da energia livre de ligação entre a proteína e o ligante, antes mesmo que esses sejam sintetizados. Os custos computacionais com esses estudos são bem menores, se comparados aos gastos laboratoriais, despendidos ao sintetizar e testar farmacologicamente várias substâncias. Esta importante ferramenta tem sido usada para filtrar compostos que não servem para serem designados como alvo, e desenhar os possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o sítio ativo do receptor (RODRIGUES, 2012).

A partir do docking molecular são obtidas diferentes conformações espaciais do ligante, possibilitando ao analista identificar qual dentre estas é a mais provável na interação ligante-alvo. E a partir de cada conformação espacial são obtidas energias livres de ligação, onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN, 2004).

Essa nova realidade de pesquisas e desenvolvimento busca a molécula ideal, que apresente eficácia, especificidade e o mínimo possível de reações não desejadas, tendo enfoque para doenças com maior incidência e com maior expectativa de êxito terapêutico (PALMEIRA FILHO, 2012).

O presente trabalho busca unir e aplicar as estratégias computacionais direta e indireta na pesquisa de compostos derivados do 20-hidroxicodona, direcionando-as para uma possível ação analgésica potencial atuando em receptores opióides Mu, Delta e Kappa.

2. JUSTIFICATIVA

Sabendo-se da relevância da descoberta de compostos bioativos capazes de atuar com ação analgésica potencial e das vantagens de utilizar metodologias computacionais, sugere-se a realização deste trabalho para fins de obtenção de modelos que permitam desenvolver compostos derivados do 20E com atividade antinociceptiva potencial, e, futuramente, de uma compreensão mais detalhada sobre a atividade antinociceptiva dos derivados ecdiesteroides. Os resultados a serem obtidos a partir deste estudo podem indicar a influência de grupos funcionais, estrutura química e farmacóforo dos compostos bioativos derivados do 20E, sobre a atuação destes compostos em receptores opióides (Mu, Delta e Kappa). Neste contexto, estes dados podem ser utilizados para o desenvolvimento de compostos novos candidatos a agentes terapêuticos a serem utilizados no tratamento da dor.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Trabalhar com compostos derivados do 20-hidroxiecdisona como proposta para atuar em receptores opióides (Mu, Delta e Kappa), direcionando-os para uma possível ação analgésica potencial, utilizando metodologias computacionais (*“in silico”*).

3.2. ESPECÍFICOS

- Escolher e desenhar uma série de compostos derivados do 20E;
- Minimizar a estrutura química dos derivados do 20E;
- Calcular propriedades físico-químicas dos derivados do 20E no farmacóforo;
- Realizar o estudo de ancoramento molecular dos principais derivados do 20E;
- Determinar o farmacóforo de compostos integrantes do conjunto.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Hormônios esteroidais são responsáveis por diversos aspectos do funcionamento e desenvolvimento de organismos vivos. No homem se enquadram os sistemas nervoso central e periférico, metabolismo, sistema endócrino, entre outros. Os esteróides também desempenham papéis neuromodulatórios, incluindo a regulação da sensibilidade a estímulos dolorosos em mamíferos. Em insetos, como as *Drosophilas*, os ecdisteróides são os únicos hormônios esteróides registrados e, portanto, a mosca representa um sistema modelo simplificado para explorar mecanismos de neuromodulação esteróide da nocicepção (MCPARLAND, 2015).

Procurar tratamento para a dor é uma das principais razões pelas quais os pacientes visitam seus médicos (MANTYSELKA, 2001). Devido a isto, por muito tempo, os pesquisadores investigaram os mecanismos de doenças que podem estar causando a dor, mas de algum modo negligenciaram considerar a dor como uma doença tratável (MCPARLAND, 2015).

Em 1986 a dor foi conceituada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais”. E termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de sinais dolorosos - que podem ser traumas mecânicos, térmicos ou químicos - pelo sistema nervoso, que formulam informações relacionadas à lesão (HELLEBREKERS, 2002). LUNA (2006) caracteriza a dor como sendo “o quinto sinal vital, juntamente com a função cardiorespiratória e a térmica”.

A exposição de qualquer órgão a um estímulo potencialmente nocivo induz a percepção desagradável de dor, passando a informação ao indivíduo que sua integridade física esta em perigo. Essa informação, quando processada, pode ser diferenciada como dor fisiológica ou dor patológica (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; ALMEIDA et al., 2006).

A dor fisiológica é aquela que induz respostas protetoras, como o reflexo de retirada (ou reação de fuga), com intuito de interromper a exposição ao estímulo nocivo. Este sinal é típico da dor aguda produzida por estímulos intensos na superfície da pele. Estados dolorosos prolongados estimulam persistentemente os aferentes nociceptivos induzindo alterações que aumentam os efeitos deletérios da dor crônica, introduzindo então o conceito de dor patológica. Enquanto a dor aguda é um sintoma de alguma doença, a dor crônica é uma doença propriamente dita,

sendo nociva e independente ao estímulo que a gerou (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002).

A dor persistente pode se apresentar em forma de nociceptiva e de neuropática. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação. A dor neuropática ou neurogênica origina-se devido a lesões de nervos periféricos ou do sistema nervoso central (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; ALMEIDA et al., 2006). Os dois sistemas de modulação nociceptiva mais importantes são mediados por receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e opióides, distribuídos por toda extensão do sistema nervoso central (RIEDEL e NEECK, 2001).

Acheson propôs o termo opióide para titular drogas de ação farmacológica semelhante a da morfina, mesmo com estrutura química diferente. Todavia, houve evolução no conceito do termo opióide, que passou a incluir todas as substâncias naturais, semissintéticas ou sintéticas que reagem com os receptores, agindo como agonista ou como antagonista (MARTIN, 1983). As complexas interações entre essas drogas e receptores específicos, identificados ao longo do sistema ascendente de transmissão da dor e do sistema descendente inibitório, dão consequência aos efeitos opióides (INTURRISE, 2002).

Os receptores opióides possuem seu conceito baseado na estereoespecificidade comum às drogas desse grupo farmacológico, e na possibilidade de serem diversificado em antagonistas específicos, mediante pequenas alterações químicas na estrutura do agonista (SIMON, HILLER e EDELMAN, 1973).

Em 1971, Goldstein e colaboradores, na Universidade de Stanford, deram início a tentativa de identificar os receptores opióides, quando constataram que a ligação estereoespecífica do levorfanol - em encéfalos de camundongos - representava 2% do total da droga utilizada, e limitava-se a certas frações do substrato contendo membranas. Assim, a ligação estereoespecífica deveria corresponder à realizada com receptores opióides (GOLDSTEIN, LOWNEY e PAL, 1971). Em 1973, SNYDER e colaboradores, SIMON e colaboradores, e TERENIUS e colaboradores, os dois primeiros nos Estados Unidos e o terceiro na Suécia - pesquisas independentes - confirmaram a existência dos receptores de opióides (FINCK, 1979).

Surgiram então diversos tipos e subtipos de receptores opióides, sendo que os receptores Mu, Delta e Kappa são os aceitos por todos os estudiosos do assunto. Considera-se que os opióides com maior potência analgésica são agonistas de receptores Mu, cuja ativação é também responsável pela depressão respiratória (GOZZANI, 1994).

Opióide é o termo utilizado para definir toda substância, natural ou sintética, cuja ação analgésica se dá através da interação com os receptores opióides (Mu, Delta e Kappa). A morfina, um agonista Mu, é a referência entre os opióides. Já a naloxoma é um exemplo de antagonista dos receptores opióides (MCQUAY, 1999).

A ação de cada receptor no organismo pode ser sugerida de acordo com o subtipo do receptor e da sua localização no sistema nervoso. Os receptores Delta são responsáveis pela analgesia e modulação das funções cognitivas e de dependência física. Estão localizados nos núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e nos neurônios sensitivos periféricos. Os receptores Kappa possuem as funções de nocicepção, termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina. Estão localizados no hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa na medula espinhal, além de neurônios sensitivos periféricos (DHAWAN, CESSSELIN e RAGHUBIR, 1996). Os receptores Mu regulam funções como a nocicepção, o ciclo respiratório e o trânsito intestinal. Estão localizados nas lâminas III e V do córtex cerebral, no tálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa e trato gastrintestinal. Em humanos, os genes que codificam a transcrição destes receptores estão localizados da seguinte maneira: no cromossomo 1 para os receptores Delta (δ), no braço longo do cromossomo 8 para os receptores Kappa (κ) e no cromossomo 3 para os receptores Mu (μ) (DHAWAN, CESSSELIN e RAGHUBIR, 1996).

Estes receptores são acoplados à proteína G na membrana celular. Quando estimulados por um fármaco opióide, reduz o nível intracelular de adenosil monofosfato cíclico pela inibição da enzima adenilato ciclase, reduzindo assim o nível intracelular de adenosil monofosfato cíclico. Este processo induz o fechamento dos canais de cálcio dependentes nas terminações pré-sinápticas, reduzindo a liberação de neurotransmissores, porém não os canais de potássio na membrana pós-sináptica, causando uma hiperpolarização desse neurônio, bloqueando parcialmente a transmissão do estímulo doloroso (JORDAN e DEVI, 1999).

Os opióides bloqueiam a transmissão periférica e central da via nociceptiva aferente e, por isso, tornam-se bastante eficientes no tratamento da dor inflamatória aguda. No entanto, eles não são igualmente eficazes para todo tipo de dor como, por exemplo, a dor neuropática que possui uma resposta pobre ou de curta duração aos opióides (RIBEIRO e SCHIMIDT, 2002; BASSANEZI e OLIVEIRA FILHO, 2006)

O sistema nervoso central é o principal local onde se localizam os receptores opióides. Porém, na presença de inflamação, eles possam se expressar no sistema nervoso periférico, o que gera uma nova perspectiva para o uso tópico destes medicamentos. Opióides são universalmente utilizados no tratamento da dor, embora alguns clínicos ainda resistam ao uso destes analgésicos principalmente pelo temor de uma de suas complicações, a depressão respiratória, e pela falta de conhecimento de alguns aspectos farmacológicos como a tolerância e a dependência física e psicológica (MCQUAY, 1999).

Novas perspectivas para o uso de compostos bioativos são objetos de pesquisa e desenvolvimento de teorias computacionais para explicar a atividade farmacológica que se sustentam, num primeiro momento, no modelo de “chave-fechadura” (SILVERMAN, 1992). Neste modelo, os receptores celulares são considerados como “fechaduras”, onde atuam como biomacromoléculas de extrema sensibilidade, responsáveis pelo reconhecimento molecular de espécies endógenas e exógenas capazes de apresentar atividade biológica. Esses receptores reagem com os compostos bioativos - que podem ser endógenos ou exógenos - considerados como as “chaves”, formando complexos entre receptor e composto bioativo que provocam repostas biológicas (BARREIRO e RODRIGUES, 1997).

A modelagem da estrutura molecular por métodos computacionais surgiu como uma alternativa, especialmente após o desenvolvimento de programas capazes de calcular a estrutura com um compromisso adequado entre velocidade e precisão, somados aos recursos da computação gráfica e à crescente diminuição dos custos de máquinas de alto desempenho capazes de operar estes programas e recursos (LIPKOWITZ e BOYD, 1990). Modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos (COHEN, 1988). Estas ferramentas podem ser aplicadas em estratégias de modelagem direta e indireta de novas drogas (COHEN, 1990).

Na modelagem direta, faz-se o ajuste do composto a uma estrutura de receptor conhecida, por exemplo, através de dados de cristalografia de raios-X (ABRAHAM, 1989; BOYD, 1990) ou de ressonância magnética nuclear de um receptor (FESIK, 1989; CHARRETIER, 1991).

Na modelagem indireta é feita uma análise comparativa das estruturas de moléculas, determinando um modelo farmacóforo. Existem muitas opções quanto ao método de cálculo a ser aplicado em uma determinada estratégia de modelagem molecular. Estes métodos basicamente diferem quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados (COHEN, 1990).

Utilizando métodos de modelagem molecular pode-se isolar e “congelar” uma estrutura. Estruturas com tempos de vida muito curtos, tais como intermediários de reação ou estados de transição hipotéticos, podem ser modelados e suas propriedades “medidas” com relativa facilidade (CLARK, 1985; SANT’ANNA, 1995). A possibilidade do estudo das conformações e propriedades de uma molécula isolada, simulando o estado gasoso, ou da molécula solvatada, ainda que por um número pequeno de moléculas de solvente, permite prever as conformações preferenciais em cada caso particular (BARREIRO e RODRIGUES, 1997).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta etapa a pesquisa dividiu-se em dois grandes grupos: o estudo de modelagem dos compostos derivados do 20E e docking molecular, e o estudo de farmacóforo dos compostos.

5.1. COMPOSTOS DERIVADOS DO 20E E DOCKING MOLCULAR

5.1.1. Desenho dos compostos derivados do 20E

Baseado na estrutura conhecida do composto 20E (figura 1), foram propostas modificações moleculares que resultaram em 60 derivados do 20E (figura 2). O programa computacional Spartan for Windows, versão 08, Wavefunction, Inc. USA, foi empregado para o desenho, a otimização de geometria molecular da estrutura e cálculos dos derivados do 20E com o emprego dos métodos semi-empírico AM1 e o empírico teoria do funcional de densidade (DFT) B3LYP com o emprego de base de dados teóricos 6-31G.

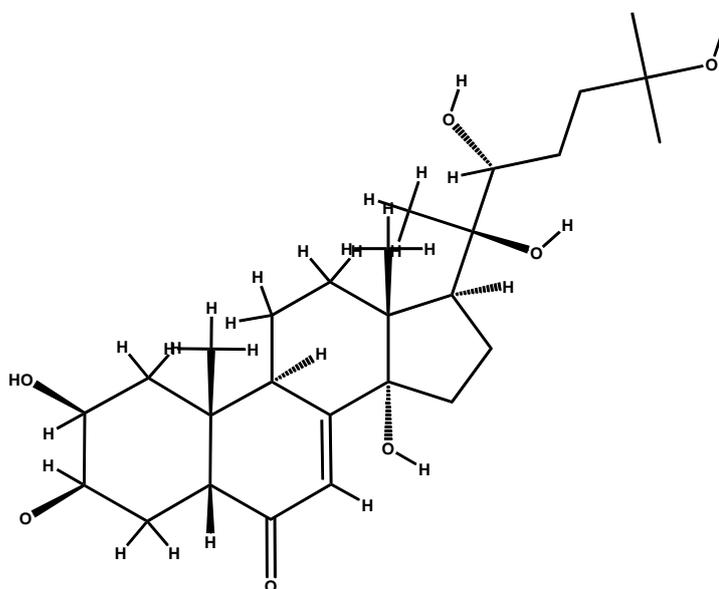
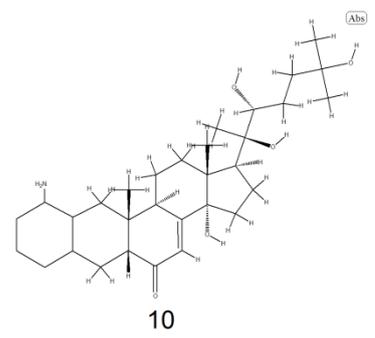
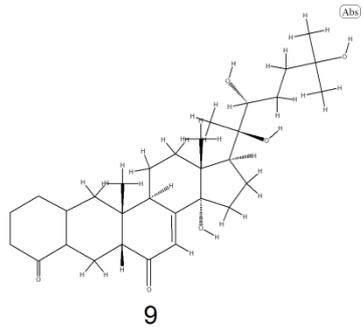
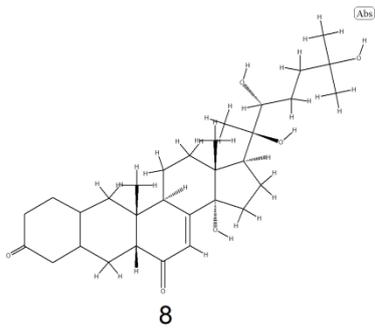
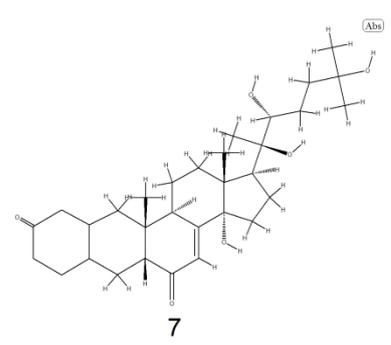
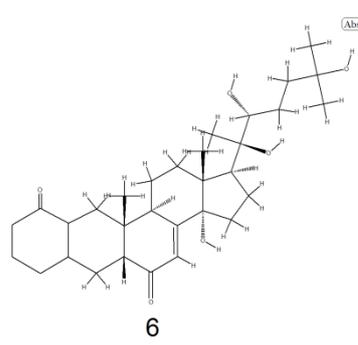
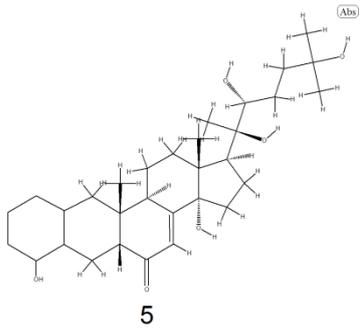
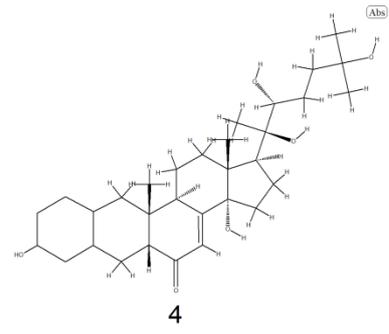
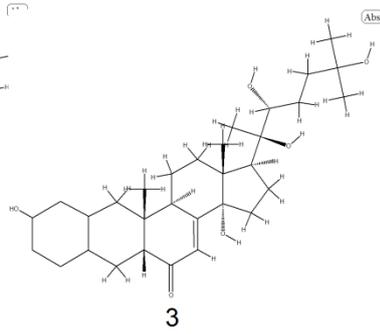
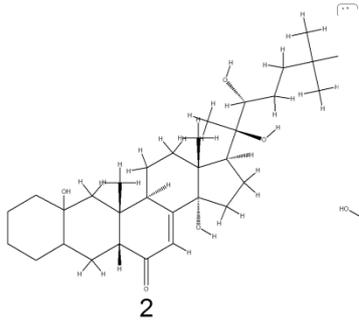
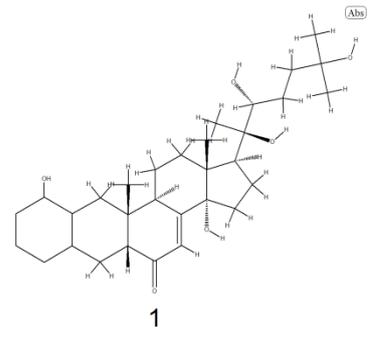
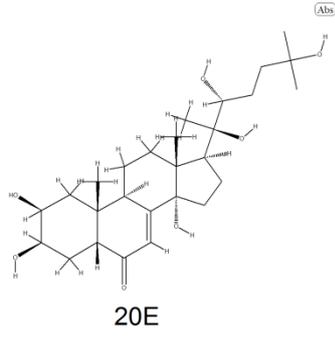
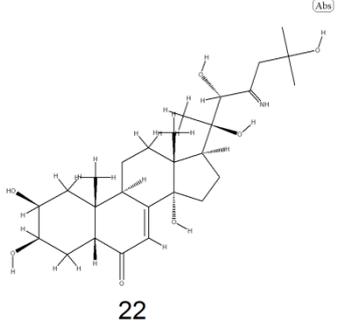
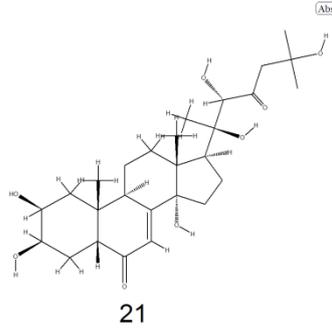
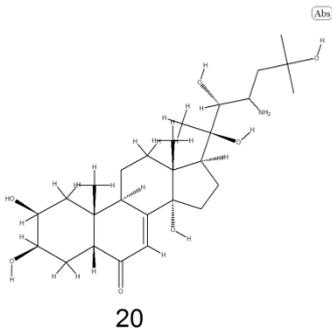
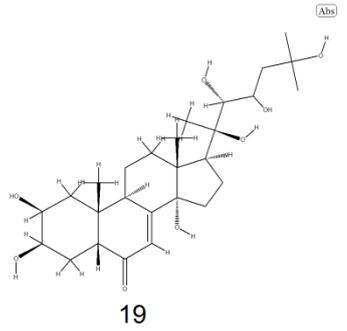
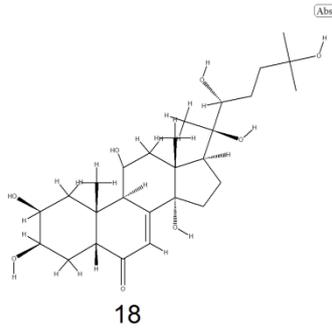
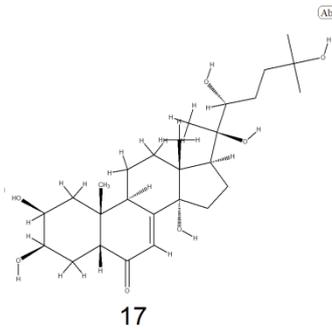
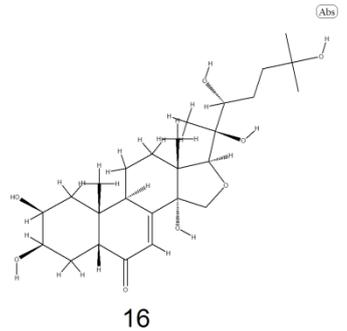
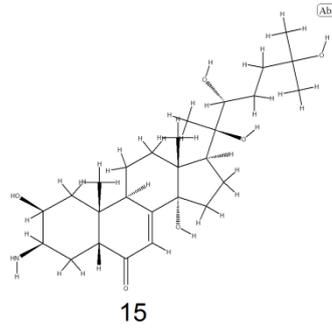
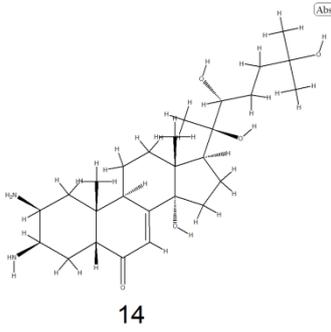
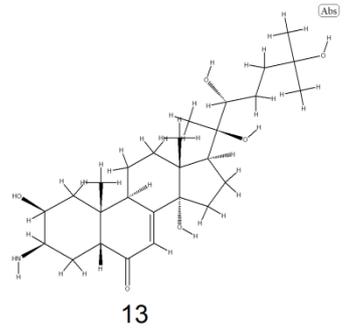
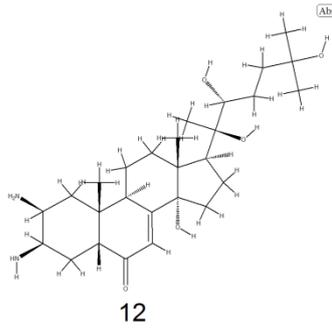
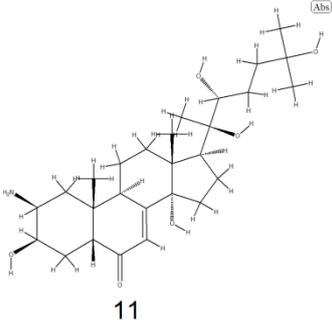
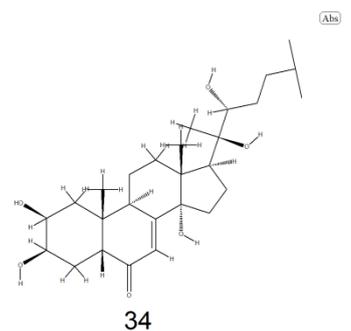
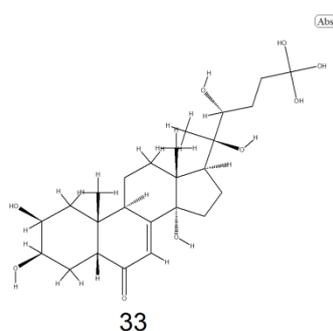
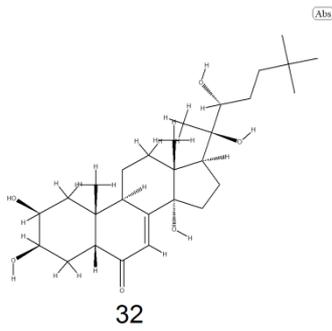
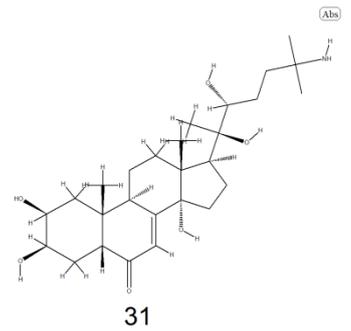
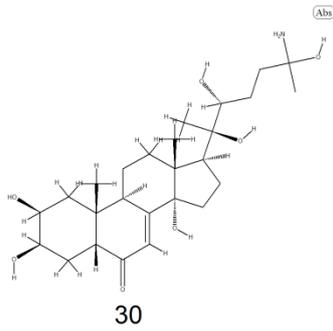
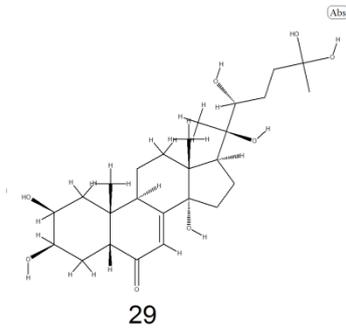
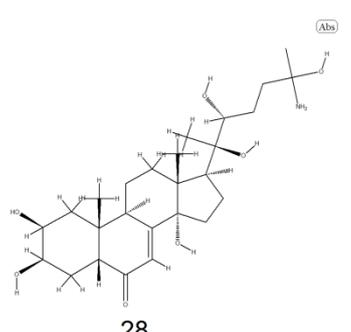
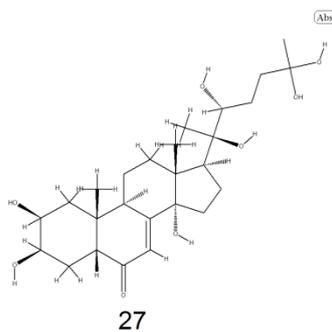
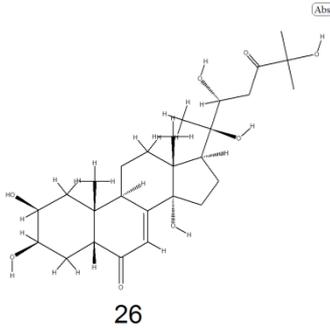
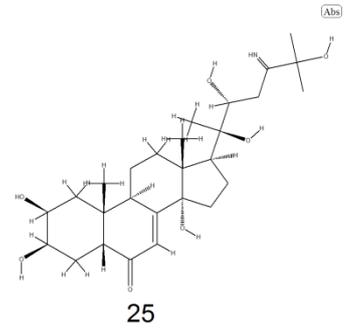
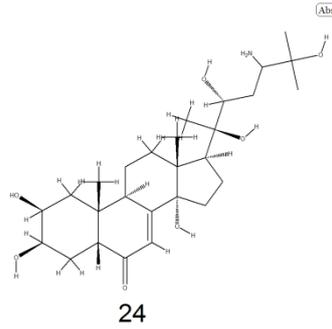
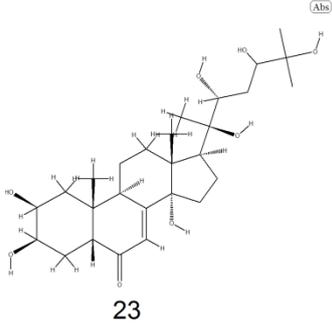
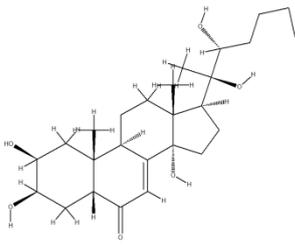


Figura 1: Estrutura da 20-hidroxicodona

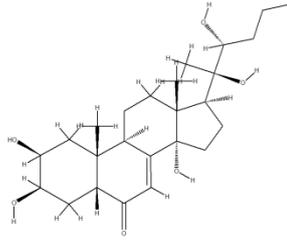




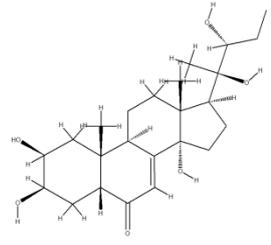




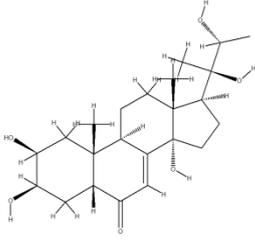
35



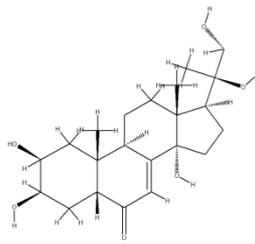
36



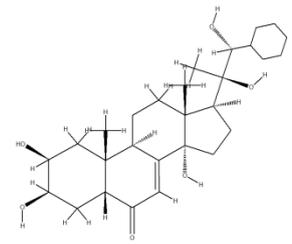
37



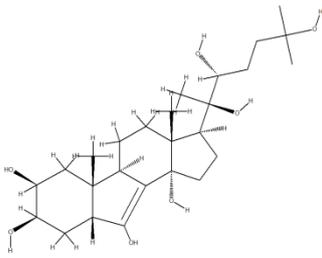
38



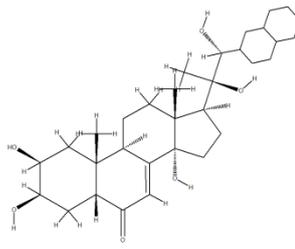
39



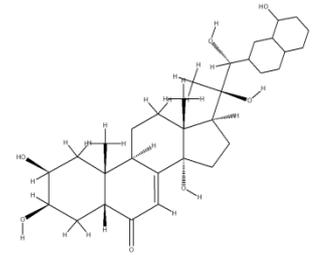
40



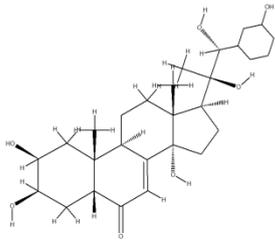
41



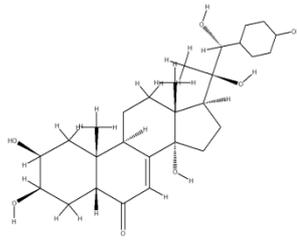
42



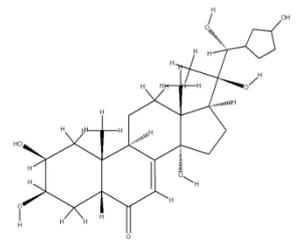
43



44



45



46

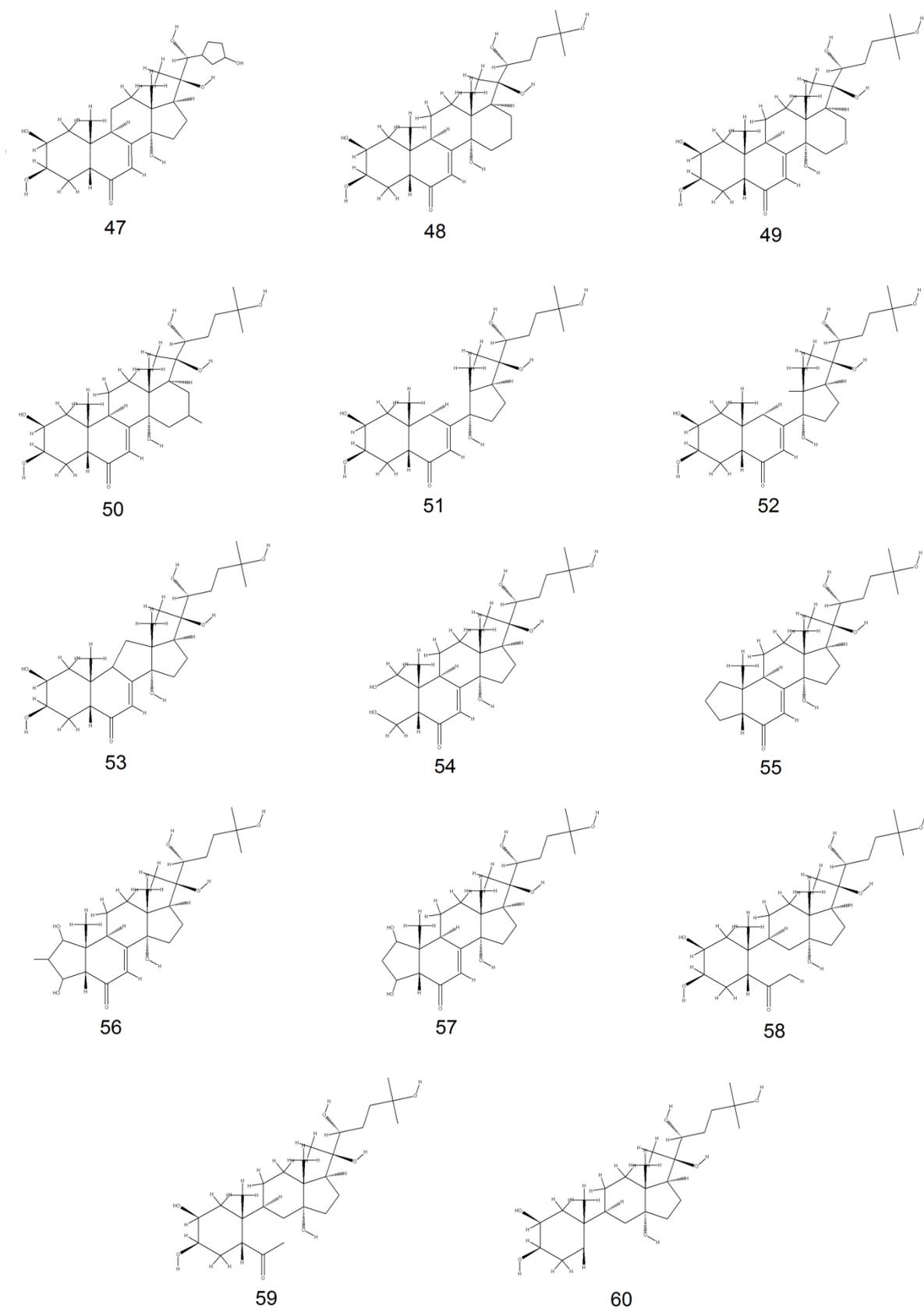


Figura 2: Estruturas das 60 moléculas derivadas do composto 20E

5.1.2. Análise de ancoramento molecular (Docking)

A análise de ancoramento molecular envolveu os estudos de interação entre composto bioativo e receptor. Para esta etapa foram utilizados os compostos com estrutura química otimizada em Programa Spartan. Foram utilizadas estruturas do receptor opióide em formato pdb (Protein Data Banking, <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>, PDB ID: 4DKL (Mu), 4Ej4 (Delta) e 4DJH (Kappa) para os estudos de ancoramento.

Estes estudos foram realizados utilizando o software iGemdock 2.1, no qual as ligações individuais dos compostos foram submetidas a ancoramento no sítio ativo das proteínas estudadas. Os cálculos de ancoragem foram realizados com parâmetros de algoritmo genético (GA) escolhidos para tamanho da população, geração e número de soluções como 200, 70 e 3, respectivamente, uso de cálculo padrão de docking, função de escore Gemdock de hidrofóbica e eletrostática (preferência 1:1), e aplicação das funções arquivo sítio de ligação do ligante. O grid (caixa de interação) de 6 Angstroms foi utilizado para todas as proteínas estudadas.

5.2. ESTUDO DE FARMACÓFORO

A série de compostos derivados da 20-hidroxiecdisona foi submetida à análise de farmacóforo com o emprego de software Pharmagist®, disponível para uso na internet (<<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/pharma/index.html>>). As estruturas em 3D, em extensão de formato digital Sybyl mol.2, foram classificadas em arquivo único (caracterizada como uma lista de moléculas) e inseridas no Pharmagist. Para o cálculo do farmacóforo, foi escolhida a molécula mais ativa da série como estrutura líder, “*pivot*”, utilizada como referência para alinhamentos, e inseridos os filtros de efeito doador ou aceptor de hidrogênio, anión ou cátion e anel aromático utilizado.

6. RESULTADOS

6.1 ESTUDO DE ANCORAMENTO MOLECULAR

Com o intuito de investigar quais dos compostos derivados do 20E apresentariam melhor interação com os receptores opióides foram realizadas simulações de ancoramento molecular. Nestes estudos, os compostos derivados do 20E foram geometricamente colocados para interagir com resíduos de aminoácidos específicos em sítios de receptores opióides, onde foram calculados os dados de ligação de hidrogênio, forças de Van der Waals (VDW) e interações eletrostáticas da energia.

Inicialmente, a análise do ancoramento molecular foi realizada com os 60 derivados do 20E, divididas em dois grupos de 30 moléculas. De cada grupo retirou-se os 6 derivados com maior afinidade pelos receptores opióides, resultando em novo grupo de 12 moléculas, que foram novamente submetidas ao docking molecular, juntamente com a 20E, nos receptores Mu (tabela 1), Delta (tabela 2) e Kappa (tabela 3). Além da energia de afinidade da interação ligante-receptor, ligação de hidrogênio e Van der Waals (VDW), o estudo de docking molecular forneceu os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação nos receptores Mu (tabela 4), Delta (tabela 5) e Kappa (tabela 6), nas cavidades e subcavidades 4DKL-BFO, 4EJK-EJ4 e 4DJH-OLC, respectivamente. Estas cavidades nas proteínas são as mesmas de ligação de fármacos como a morfina, fármaco opiáceo estabelecido.

Tabela 1: Interações farmacológicas centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados do 20E envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Mu (4DKL – BFO).

Compostos	Energia de afinidade kcal mol ⁻¹	Van der Waals	Ligação de Hidrogênio	Eletrostática
Molécula 49	-105,47	-88,38	-17,09	0
Molécula 41	-98,48	-70,43	-28,85	0
Molécula 33	-97,56	-73,13	-22,43	0
Molécula 43	-95,03	-78,31	-16,72	0
Molécula 53	-94,75	-80,07	-14,68	0
Molécula 3	-92,92	-79,45	-13,47	0
Molécula 6	-91,62	-84,03	-7,59	0
20E	-91,42	-77,62	-13,81	0
Molécula 16	-90,96	-71,66	-19,3	0
Molécula 29	-90,43	-69,35	-19,9	0
Molécula 30	-89,23	-70,01	-19,22	0
Molécula 45	-88,77	-78,7	-10,07	0
Molécula 27	-88,44	-67,88	-19,4	0

Tabela 2: Interações farmacológicas centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados do 20E envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Delta (4EJ4 – EJ4).

Compostos	Energia de afinidade kcal mol ⁻¹	Van der Waals	Ligação de Hidrogênio	Eletrostática
Molécula 6	-93,98	-84,46	-9,37	0
Molécula 49	-93,37	-75,38	-18	0
Molécula 3	-90,53	-78,74	-11,79	0
Molécula 41	-87,8	-73,28	-14,51	0
Molécula 33	-84,64	-56,62	-28,02	0
Molécula 27	-79,99	-59,42	-18,84	0
Molécula 45	-79,91	-58,09	-21,82	0
Molécula 43	-79,9	62,44	-17,45	0
Molécula 53	-79,7	-67,43	-12,27	0
Molécula 16	-78,29	-64,64	-13,65	0
Molécula 29	-72,73	-56,87	-19,84	0
Molécula 30	-75,73	-57,75	-17,98	0
20E	-74,2	-58,81	-15,39	0

Tabela 3: Interações farmacológicas centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados do 20E envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Kappa (4DJH – OLC).

Compostos	Energia de			
	afinidade kcal mol ⁻¹	Van der Waals	Ligação de Hidrogênio	Eletrostática
Molécula 49	-93,37	-74,6	-18,77	0
Molécula 41	-93,38	-76,68	-15,86	0
Molécula 3	-92,11	-86,16	-5,93	0
Molécula 16	-90,54	-84,62	-5,88	0
Molécula 33	-89,34	-73,96	-15,38	0
20E	-88,99	-75,96	-13,03	0
Molécula 53	-88,7	-76,25	-12,45	0
Molécula 6	-86,36	-72,91	-14,18	0
Molécula 27	-84,61	-72,09	-14,27	0
Molécula 45	-83,35	-72,47	-12,15	0
Molécula 30	-82,93	-66,29	-17,06	0
Molécula 29	-81,17	-70,81	-12,12	0
Molécula 43	-78,51	-68,78	-9,73	0

Tabela 4: Compostos derivados do 20E e os principais resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Mu.

Compostos	Ligação de Hidrogênio			Van der Waals	
	H-S ASP - 147	H-S HIS - 297	H-S LYS - 303	V-S TYR - 148	V-S LYS - 233
Molécula 49	-1,1	-2,2	0	-4,5	-3,9
Molécula 41	-5	-3,5	0	-4,4	3,8
Molécula 33	0	-6,9	0	-4,8	-10,1
Molécula 43	-4	-8,2	0	-12,1	-3,8
Molécula 53	0	0	0	-5,9	-5,6
Molécula 3	-2,5	-3,5	-3,5	-8,6	-2,9
Molécula 6	-3,8	-1	-2,8	-7,8	-6
20E	-3,2	0	0	-6,1	-5,9
Molécula 16	0	-8,4	-3,5	-7,4	-5,6
Molécula 29	0	-8,5	-3,4	-6,6	-4,3
Molécula 30	0	-8	-1,8	-7,3	-4,8
Molécula 45	-4,1	0	0	-5,4	-4,3
Molécula 27	0	-3,4	-3,4	-5,8	-4,2

Tabela 5: Compostos derivados do 20E e os principais resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Delta.

Compostos	Ligação de Hidrogênio			Van der Waals	
	H-S ASP - 128	H-M TYR - 308	V-S TYR - 129	V-S TRP - 274	V-S TYR - 308
Molécula 6	-2,4	0	-7,3	-14	-9,1
Molécula 49	-2,5	0	-5,1	-7	-10,3
Molécula 3	0	-3,5	-7,3	-13,5	-6,5
Molécula 41	0	-3,5	-6,9	-12,1	-4,2
Molécula 33	-5,9	-3,5	-6,6	-9	-9,4
Molécula 27	0	-3,8	-4,6	-13,7	0,8
Molécula 45	-2,6	-0,3	-2,3	-4,2	-7,3
Molécula 43	-5	-2,1	-0,9	-8,3	-9,3
Molécula 53	0	0	-7,1	-4,4	-2,7
Molécula 16	0	-2,9	-5,1	-13,9	-3,6
Molécula 29	0	-2,8	-2,7	-13,2	-0,9
Molécula 30	-2,5	0	-5,1	-9,5	-6,9
20E	-5	0	-3,3	-7,7	-14,2

Tabela 6: Compostos derivados do 20E e os principais resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação do receptor opióide Kappa.

Compostos	Ligação de Hidrogênio			Van der Waals	
	H-M THR - 171	H-M ALA - 175	H-MH OLC -1303	V-S PHE - 169	V-S LYS - 174
Molécula 49	-7,5	-14,7	-0,1	-10,8	-3
Molécula 41	-2,5	-0,2	-7,2	-15,2	-5,9
Molécula 3	-3,1	-11,2	-2,6	-12,1	-5,6
Molécula 16	0	-0,8	-6,6	-9,8	-7,4
Molécula 33	-2,8	-11,6	-4,7	-9,7	-8,9
20E	-0,3	-2,8	0	-10,4	-3,3
Molécula 53	-2,2	-11,8	-4,7	-16,6	-8,3
Molécula 6	-3,2	-12,7	-5,1	-12,7	-5,7
Molécula 27	-2,5	-3,8	-2,6	-9,7	-4,1
Molécula 45	0	-6	-6,1	0	-2,1
Molécula 30	0	-3,2	-2,7	-8,3	-0,2
Molécula 29	0	-11,3	-1,4	-9,1	-3,4
Molécula 43	0	-3,7	-4	-0	-0,4

A molécula 49 apresentou menor energia de interação com o receptor Mu, sugerindo maior afinidade. Esta interação está demonstrada na figura 3. Da mesma forma, considerando o receptor Delta, observou-se que a molécula 6 apresentou menor energia de atividade na interação com o receptor (figura 4). Para o receptor

Kappa verificou-se que a molécula 41 apresentou sua menor energia de atividade na interação, demonstrada pela figura 5. Todas as figuras apresentam a molécula 20E para fins de comparação com a molécula ativa.

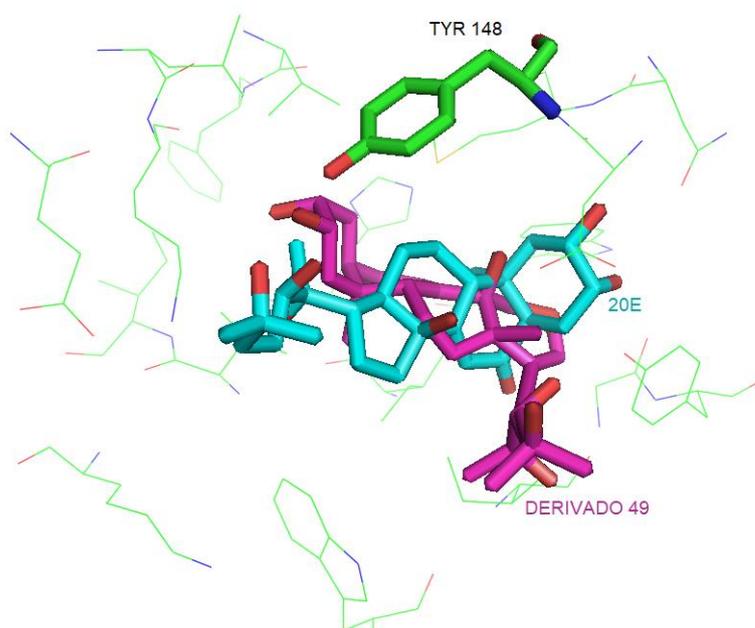


Figura 3: Interação entre o receptor Mu e os compostos 20E e molécula 49, e o principal resíduo de aminoácido envolvido.

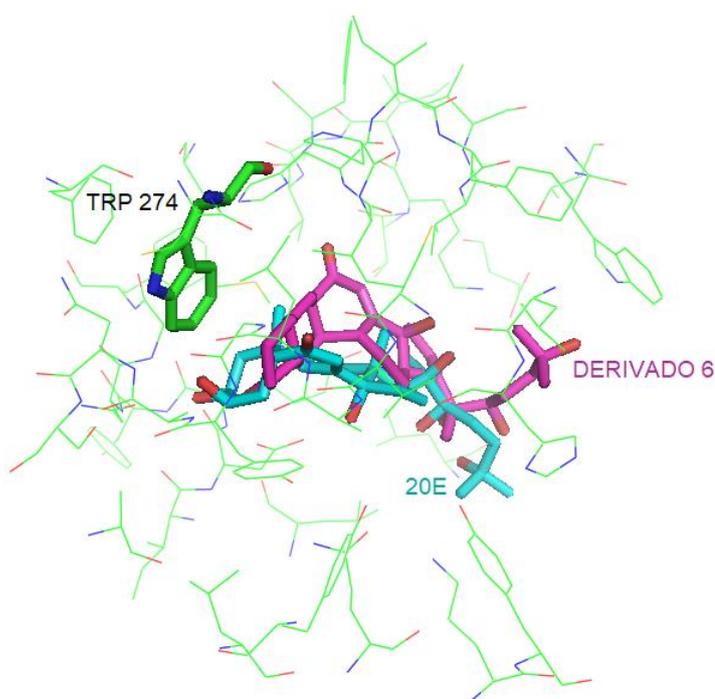


Figura 4: Interação entre o receptor Delta e os compostos 20E e molécula, e o principal resíduo de aminoácido envolvido.

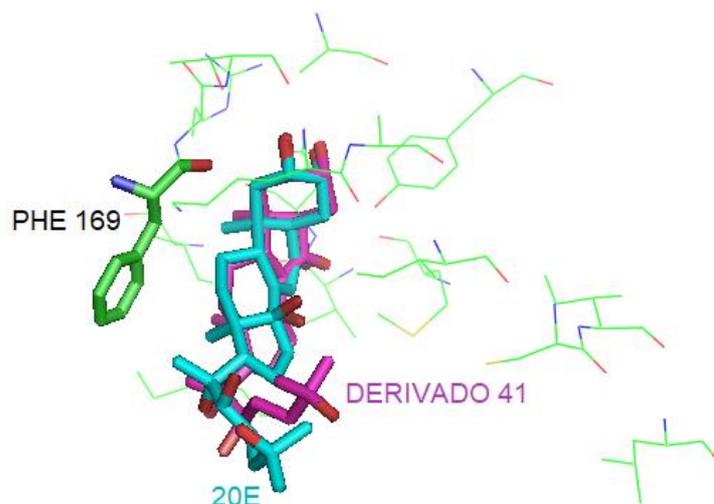


Figura 5: Interação entre o receptor Kappa e os compostos 20E e molécula 41, e o principal resíduo de aminoácido envolvido.

6.2. ESTUDO DE FARMACÓFORO

Foi gerado um modelo de farmacóforo das moléculas entre os 60 derivados do composto 20E. Para a geração desse modelo, o composto 20E foi utilizado como pivô para obtenção dos melhores alinhamentos entre as moléculas de estudo. No modelo proposto, as principais propriedades físico-químicas estruturais foram capacidade acceptora de elétrons e hidrofobicidade.

As medidas intramoleculares do farmacóforo, geradas pelo programa, são resultantes das propriedades físico-químicas e características moleculares comuns oriundas dos compostos com atividade significativa. Assim, através do algoritmo calculado pelo programa, o melhor modelo farmacóforo é escolhido, gerando as medidas farmacofóricas gerais e espaciais essenciais para uma boa atividade dos compostos.

O estudo de farmacóforo apresentou um esqueleto molecular com disposição espacial proposta de acordo com as distâncias ideais entre os átomos, demonstrado pela figura 6. Neste estudo foi realizada a comparação com os derivados do 20E, moléculas 49, 6 e 41, cujos resultados estão representados pelas figuras 7, 8 e 9, respectivamente. A relação entre o farmacóforo e a estrutura da 20E é demonstrada pela figura 10.

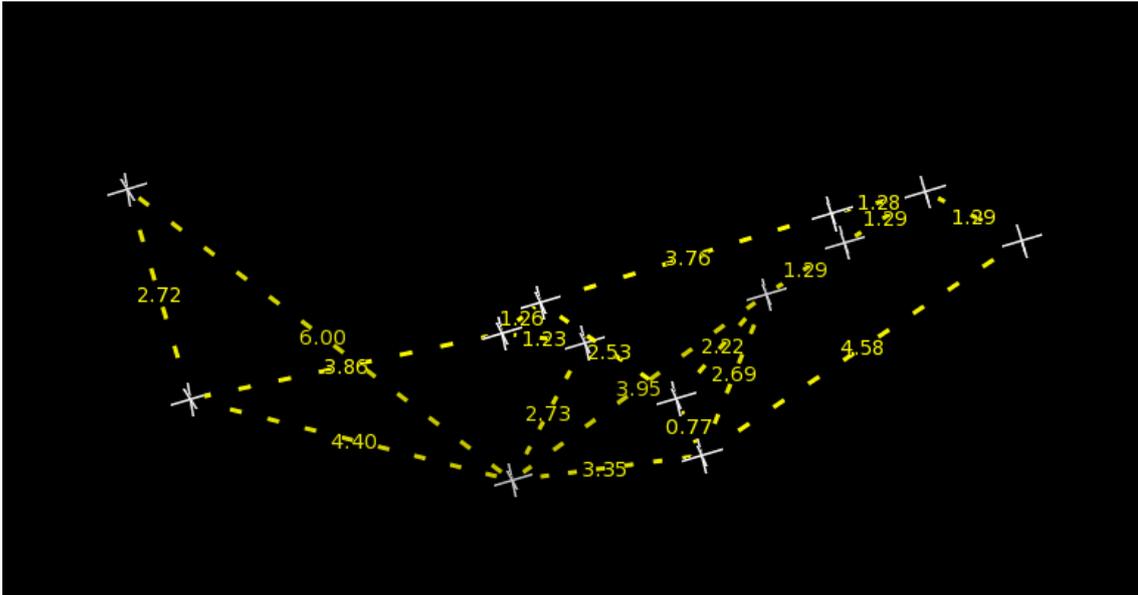


Figura 6: Esqueleto molecular do farmacóforo e suas distâncias intramoleculares.

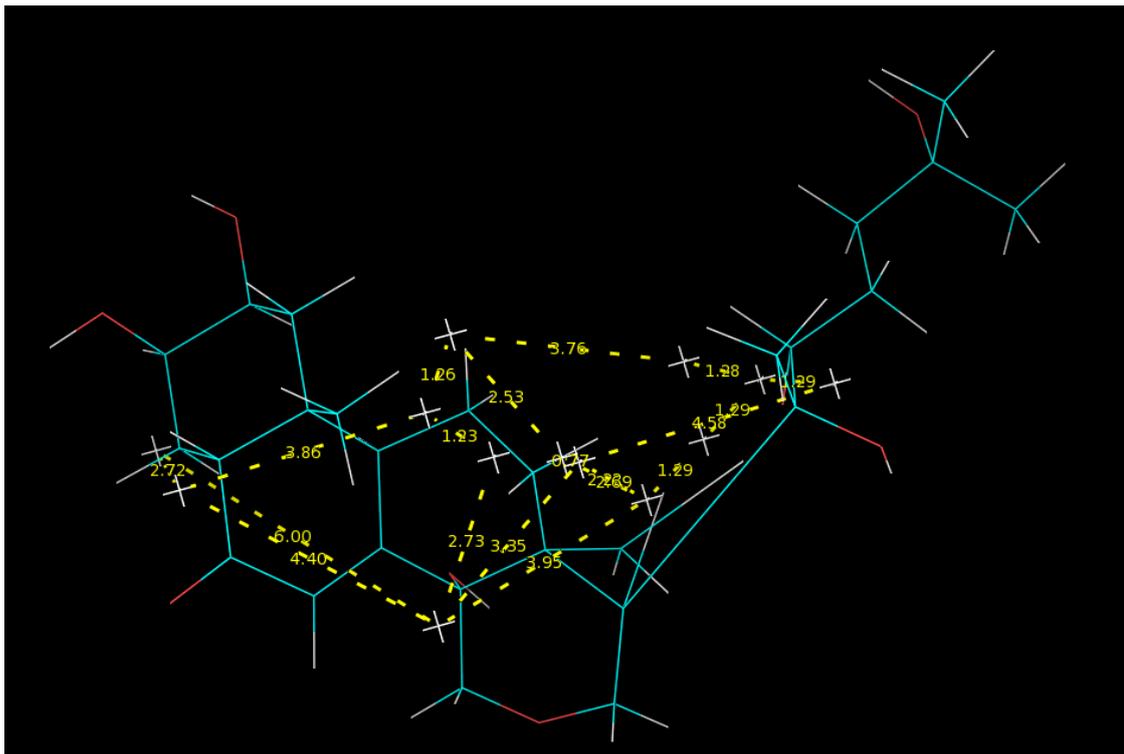


Figura 7: Sobreposição da molécula 49 no farmacóforo.

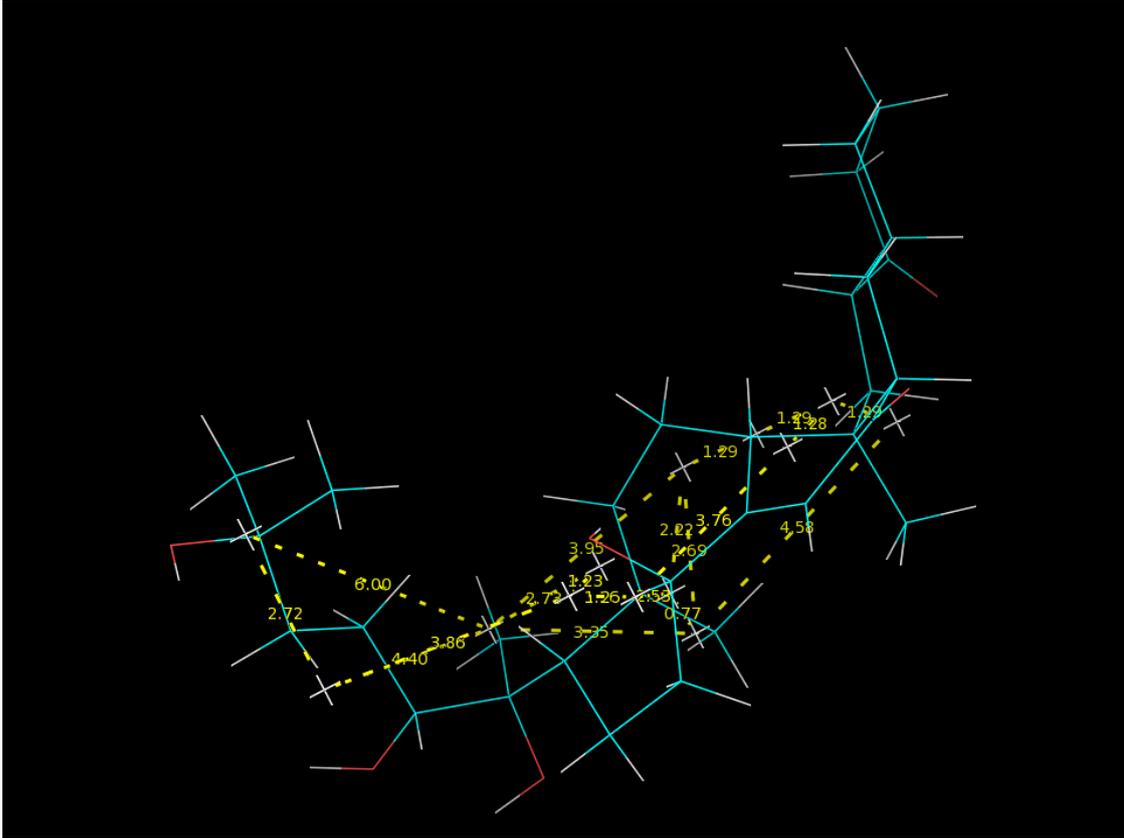


Figura 8: Sobreposição da molécula 6 no farmacóforo.

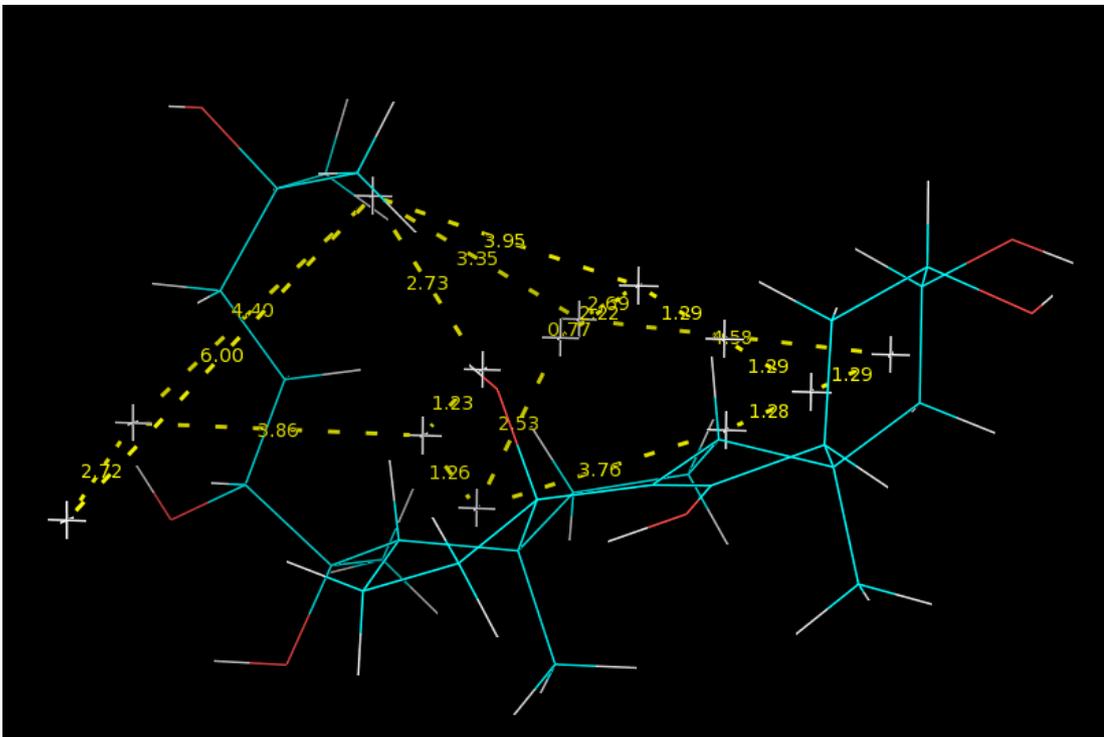


Figura 9: Sobreposição da molécula 41 no farmacóforo.

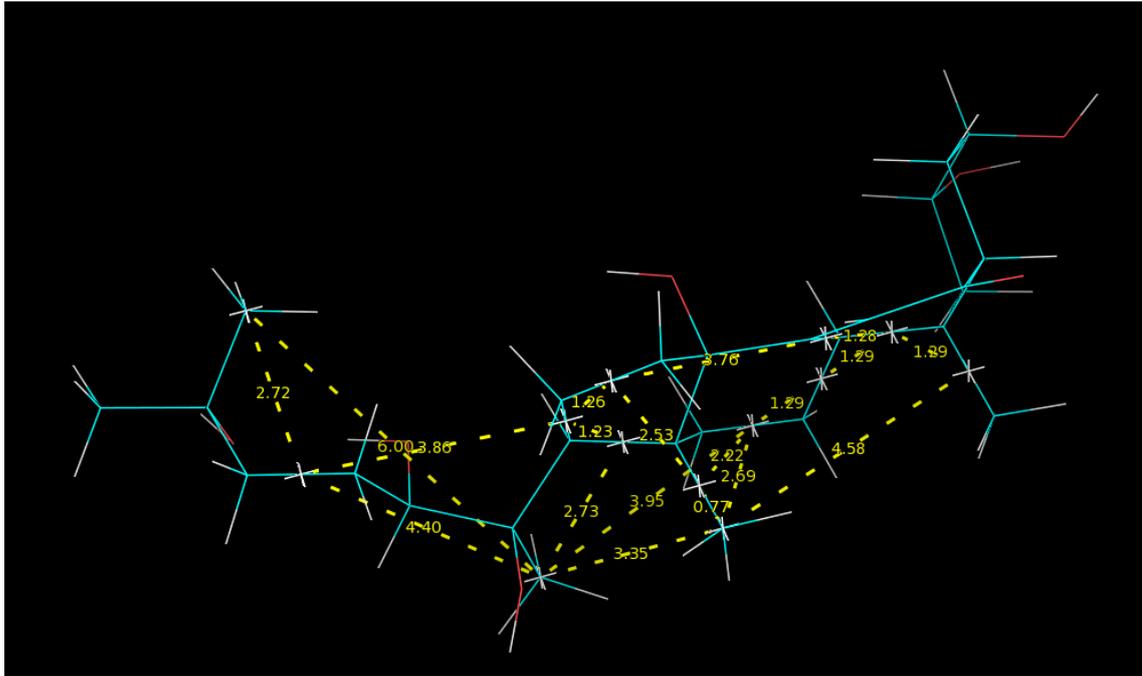


Figura 10: Sobreposição do composto 20E e farmacóforo.

7. DISCULSSÃO

7.1. ANÁLISE DO ANCORAMENTO MOLECULAR

O estudo de ancoramento molecular foi realizado para fornecer informações sobre a interação entre os compostos derivados do 20E e receptores específicos envolvidos na sinalização da via da dor. Este estudo foi realizado para sugerir uma possível interação entre as principais moléculas derivadas do 20E nos receptores opióides. Uma avaliação dos resultados obtidos a partir da interação dos compostos com os receptores de opióides: μ (Mu - IDP PDB: 4DKL), δ (Delta - IDP PDB: 4EJ4), κ (Kappa - ID PDB: 4DJH) baixados do banco de dados de proteínas (PDB), permitem-nos uma seleção de doze derivados do 20E, especificamente as moléculas 3, 6, 16, 27, 29, 30, 33, 41, 43, 45, 49, e 53. Essas moléculas foram escolhidas de acordo com os valores de menor energia de interação junto aos sítios ativos dos receptores opióides em comparação com os outros derivados do 20E. Em sua estrutura, a 20E apresenta um núcleo esteroidal, que alguns estudos têm apontado interagir com receptores opióides (Capasso & Loizzo, 2008).

Segundo resultados do ancoramento molecular, as principais interações dos derivados do 20E no receptor Mu ocorrem com os resíduos ASP – 147, HIS – 297, LYS – 303, TYR – 148, LYS – 233. No receptor Delta nos resíduos ASP – 128, TYR – 308, TYR – 129, TRP – 274, TYR – 308, e no receptor Kappa nos resíduos THR – 171, ALA – 175, OLC – 1303, PHE – 169 e LYS – 174. Após esta etapa, foi aplicada a análise pós-triagem de validação interna do software, onde o resíduo TYR 148 no receptor Mu foi determinado por Análise de Consenso para os derivados do 20E, o principal envolvido nessa interação, com Z-score 5,10 e WPharma 1,00. Para o receptor Delta, o TRP 274 foi detectado como o resíduo relevante envolvido nesta ligação ligante-receptor, com pontuação Z 3,90 e WPharma 1,00. O receptor Kappa apresentou o resíduo PHE – 169 como o principal envolvido na interação, com Z-score 5,49 e WPharma 1,00. Estas interações são as mesmas observadas na literatura (site do PDB, respectivos códigos) para composto com ação opióide.

Os resíduos que interagem no receptor Mu são os mesmos observados no sítio ativo determinado no estudo de ancoragem dos compostos presentes no extrato das folhas de *Sida tuberculata*, realizado por Rosa (2017), que sugere a ação do composto 20E no receptor Mu.

Ainda, de acordo com o ancoramento molecular, sugere-se que entre os derivados do 20E, as moléculas 49, 6 e 41 foram as que obtiveram melhor interação com os receptores opióides Mu, Delta e Kappa, respectivamente. As modificações realizadas entre as moléculas 49, 6 e 41 – em relação ao composto 20E – estão evidenciadas na figura 11.

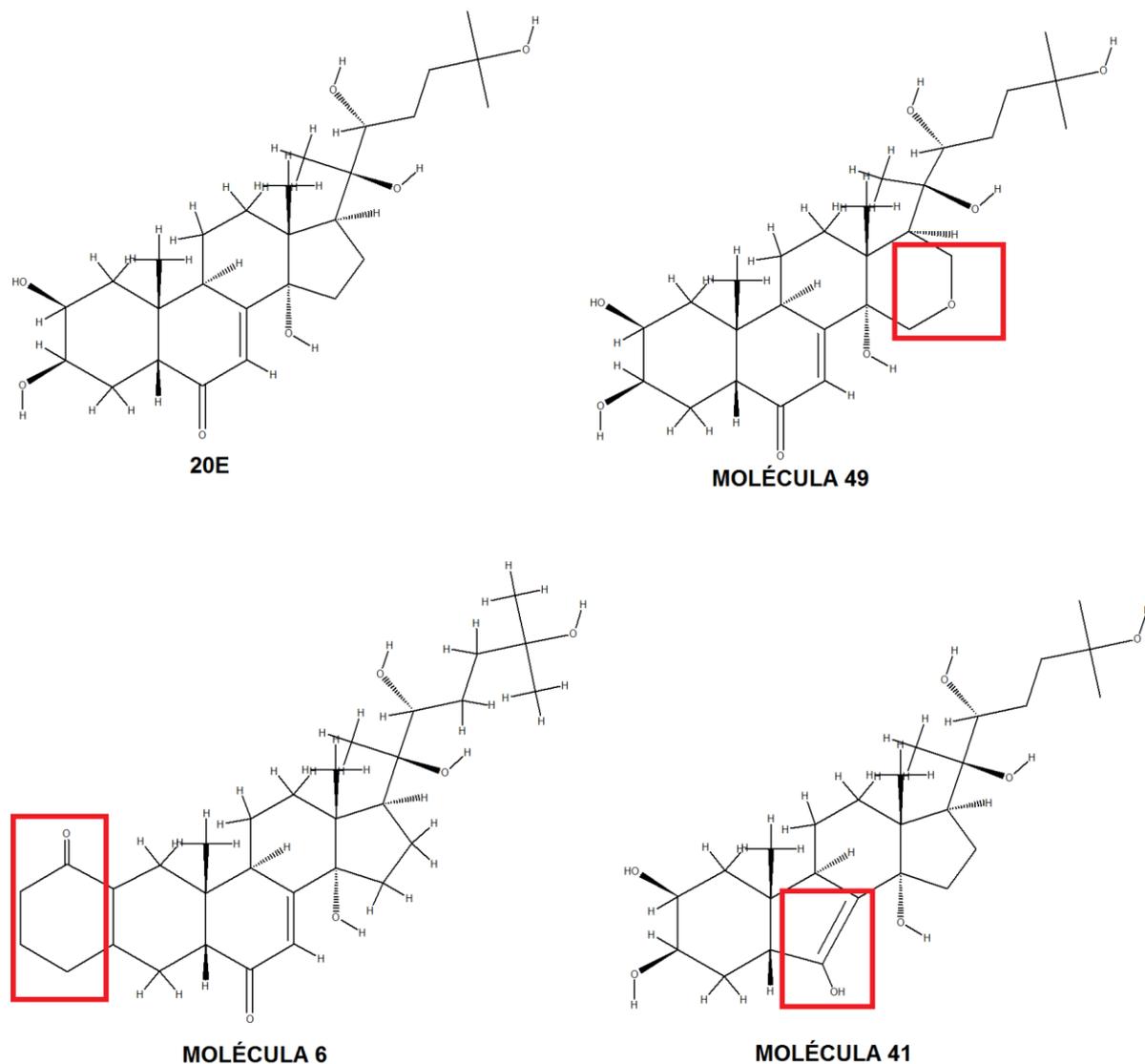


Figura 11: Estrutura do composto 20E e seus derivados 49, 6 e 41.

7.2. ANÁLISE DO FARMACÓFORO

No estudo de fármacóforo o modelo 3D obtido permitiu a análise das distâncias entre os pontos espaciais de propriedades de lipofilicidade, deceptor e de doador de ligação de hidrogênio. O melhor candidato a modelo farmacóforo foi aquele que apresentou a pontuação mais alta, score de 11,31, incluindo 13 medidas

farmacofóricas e sua construção foi baseada em 8 moléculas, o mais amplo entre todos obtidos.

Neste estudo foi possível utilizar o modelo obtido para verificar quais estruturas entre as propostas se apresentam como compostos opioides potenciais. No caso das moléculas que apresentaram melhor interação com os receptores Δ nos estudos de ancoramento, verifica-se que as mesmas se encaixam no farmacóforo proposto. Ao considerar o receptor κ , algumas moléculas que não se enquadram no modelo farmacóforo apresentam boa interação com o receptor. Estas informações podem ser utilizadas para uma nova seleção de compostos candidatos a interagir, de forma distinta, com os receptores opióides.

8. CONCLUSÃO

A otimização das moléculas seguida pelo ancoramento molecular, utilizando para tais os softwares Spartan e iGendock, respectivamente, mostraram-se como importantes ferramentas no estudo da interação ligante-receptor. Essa metodologia permitiu a seleção de doze principais derivados da 20E com possível ação antinociceptiva potencial, além de fornecer dados dos principais resíduos de aminoácidos envolvidos nesta interação, que são os mesmos observadas na literatura para compostos com ação opióide.

O método de geração de farmacóforo através do servidor Pharmagist® mostrou-se eficaz para a identificação de medidas espaciais farmacofóricas comuns entre os derivados da 20E, apresentando um modelo que demonstra a importância das características de lipofilicidade e de ligações de hidrogênio para este grupo de moléculas analisadas. Estas informações, juntamente ao estudo de ancoramento molecular, podem ser utilizadas para o planejamento de novos compostos bioativos com ação analgésica potencial.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, D. J. **X-ray crystallography and drug design**. In: Perun, T. J. & Propst, C. L. (eds) **Computer-aided drug design: methods and applications**. Marcel Dekker, New York, 1989.

AJAY and MURCKO, M. A., *J. Med. Chem.*, 38 (1995) 4953.

ALMEIDA, T. P.; MAIA, J. Z.; FISCHER, C. D. B.; PINTO, V. M.; PULZ, R. S.; RODRIGUES, P. R. C. **Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária**. *Veterinária em Foco*, v. 3, n. 2, p. 107- 118, 2006.

BARREIRO, E. J. L.; PARDINI, V. L. **Química nova**. Vol 20. Nov/Dez 1997.

BARREIRO, E. J. & RODRIGUES, C. R. **Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal**. *Química nova* 20(1) (1997).

BASSANEZI, B. S. B.; OLIVEIRA FILHO, A. G. D. E. **Analgesia pós-operatória**. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia*, v. 33 n. 2, p. 116-122, 2006.

BOYD, D. B. **Compendium of software for molecular modeling**. In: Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B. (eds) *Reviews in computational chemistry*. VCH Pub, New York, 1990.

CAPASSO A, DI GIANNUARIO A, LOIZZO A, PIERETTI S, SORRENTINO L. **Central interaction of dexamethasone and RU-38486 on morphine antinociception in mice**. Department of Experimental Pharmacology, University of Naples Federico II, Italy.

CHARRETIER, E. & GUÉRON, M. *Biochem. Cell. Biol.* 1991, 69, 322.

CLARK, T. **A handbook of computational chemistry: a practical guide to chemical structure and energy calculations**. John Wiley & Sons, Friedrich, 1985.

COHEN, N. C., BLANEY, J. M., HUMBLET, C., GUND, P. & BARRY, D. C. J. Med. Chem. 1990, 33, 883.

COHEN, N. C., BLANEY, J. M., HOWARD, A. E. & KOLLMAN, P. A. J. Med. Chem. 1988, 31, 1669.

DHAWAN BN, CESSELIN F, RAGHUBIR R, et al. International Union of Pharmacology. XII. **Classification of opioid receptors**. Pharmacol Rev 1996;48(4):567-92.

FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. **Fisiopatologia e Controle da Dor**. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em Cães e Gatos**. São Paulo: Rocca, 2002. p. 323-334.

FESIK, S. W. **Approaches to drug design using nuclear magnetic resonance spectroscopy**. In: Perun, T. J. & Propst, C. L. (eds) **Computer-aided drug design: methods and applications**. Marcel Dekker, New York, 1989.

FINCK AD - **Opioid receptor and endorphins: significance for Anesthesiology, Refresher Courses in Anesthesiology**, 1979;7:103-114.

GOODMAN, L.S & GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. McGraw Hill. 12edição. 2012.

GOLDSTEIN A, LOWNEY LI, PAL BK - **Steriospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain**. Proc Natl Acad Sci USA, 1971;68:1742-1747.

GOZZANI JL - **Opióides e antagonistas**. Rev Bras Anesthesiol, 1994;44:65-73.

HELLEBREKERS, L. J. **Dor em Animais**. São Paulo: Manole, 2002. p. 69-79.

INTURRISE CE - **Clinical pharmacology of opioids for pain.** Clin J Pain, 2002;18:(Suppl4):S3-S13.

JORDAN BA, DEVI LA. **G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function.** Nature 1999;Jun 17;399(6737):697-700.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J., **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications.** 2004.

LEITÃO, SUZANA GUIMARÃES et al. **Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts.** Brazilian journal of Pharmacognsy 21(5):874-883, Set/Oct. 2011.

LIPKOWITZ, K. B. & BOYD, D. B. (eds) **Reviews in computational chemistry.** VCH Pub, New York, 1990.

LUNA, S. P. L. **Dor, analgesia e bem estar animal.** ANAIS - I Congresso Internacional de Conceitos em Bem-estar Animal, p. 16-18, 2006. Nature Reviews, v. 3, p. 935-949, nov. 2004.

MANTYSELKA, P.; KUMUSALO, E.; AHONEN, R.; KUMPUSALO, A.; KAUKANEN, J.; VIINAMAKI, H.; et al. **Painasa reason to visit the doctor: a study in Finnish primary health care.** Pain.2001; 89(2-3):175-80. PMID: 11166473.

MARTIN WR - **Pharmacology of opioids.** Pharmacol Ver, 1983;35:283-303.

MC PARLAND, A.L.; FOLLANSBEE. T.L.; VESENKA, G.D.; PANAITIU, A.E.; GANTER, G.K. **Steroid Receptor Isoform Expression in *Drosophila* nociceptor neurons is required for normal dendritic arbor and sensitivity.** PLOSONE10(10):e0140785. doi:10.1371/journal.pone.0140785. Ano 2015.

MCQUAY H - **Opioids in pain management.** Lancet, 1999;353: 2229-2232.

MELCANGI, R.C.; GARCIA-SEGURA, L.M.; MENSAH-NYANGAN, A.G. **Neuroactivesteroids: state of the art and new perspectives.** Cell.Mol.LifeSci.2008; 65:777–797.PMID:18038216.

PALMEIRA FILHO, P.; PIMENTEL, V.; GOMES, R.; LANDIM, A.; PIERONI, J. **Saúde como desenvolvimento: perspectivas para atuação do BNDS no 14 complexo industrial da saúde, BNDS Setorial – Complexo Industrial da Saúde**, p. 301-332, 2012.

RIBEIRO, S.; SCHMIDT, A. P.; SCHMIDT, S. R. G. **O uso de opióides no tratamento da dor crônica não oncológica: o papel da metadona.** Revista Brasileira de Anestesiologia, v.52, n.5, p. 644-651, 2002.

RIDEL, W.; NEECK, G. **Nociception, pain and antinociception: current concepts.** *Zeitschrift für Rheumatologie*, v.60, n. 6, p. 404-415, 2001.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.* DA SILVA, C. H. P., **Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos**, Revista Virtual de Química, v. 4, n. 6, p.739- 736, dez., 2012.

ROSA, HEMERSON SILVA. **Caracterização fitoquímica e efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios de Sida tuberculata R.E. Fries “GUANXUMA”.**163 p. 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Uruguaiana, 2017.

SANT’ANNA, C. M. R., ALENCASTRO, R. B., BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. **J. Mol. Struct. (Theochem)** 1995, 340, 193.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of drug design and drug action.** Academic Press, San Diego, 1992.

SIMON EJ, HILLER JM, EDELMAN I - **Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H)Etorphine to rat-brain homogenate.** Proc Natl Acad Sci USA,1973;70:1947-1949.

VANGUSTEN, W. F. et al. **Computer simulation of Biomolecular Systems, Theoretical and Experimental Applications.** Leiden, 1994.pp.315-348.

TAKEI, M.; ENDO, K.; NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INONE, S.; MATSUO, S. J. Pharm. Sci. 1991, 80, 309-310.