



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

GIOVANNA ALVES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DA  
VORTIOXETINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DOCKING  
MOLECULAR EM CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE  
VOLTAGEM**

Recife  
2022

GIOVANNA ALVES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DA  
VORTIOXETINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DOCKING MOLECULAR  
EM CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dijanah Cota Machado

Recife  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Pereira, Giovanna Alves.

Avaliação do potencial anticonvulsivante da vortioxetina através da técnica de docking molecular em canais de sódio dependentes de voltagem / Giovanna Alves Pereira. - Recife, 2022.

46 : il., tab.

Orientador(a): Dijanah Cota Machado

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2022.

1. Epilepsia. 2. Reposicionamento de fármaco. 3. Nav. 4. Atracamento molecular. 5. GOLD. I. Machado, Dijanah Cota. (Orientação). II. Título.

500 CDD (22.ed.)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**



Aprovada em: 1º/11/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** DIJANAH COTA MACHADO  
Data: 02/11/2022 14:47:19-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Profa. Dra. Dijanah Cota Machado  
(Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** SILVANA CABRAL MAGGI  
Data: 01/11/2022 13:00:52-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Profa. Ma. Silvana Cabral Maggi  
(Presidente e Examinadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** JEANN FABIANN BRANCO JUNIOR  
Data: 01/11/2022 14:01:24-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Dr. Jeann Fabiann Branco Júnior  
(Examinador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Me. Artur Alves Rodrigues da Silva  
(Suplente)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a minha orientadora Dijannah Cota Machado que me acompanhou e me direcionou de maneira atenciosa e otimista para elaboração deste trabalho, bem como a todos os integrantes do Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco - Dr. Oleg Krasilnikov por terem me acolhido e disponibilizado o espaço para o aprendizado e execução das atividades, especialmente a Maria Isabel Cavalcanti pela paciência e apoio durante os experimentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – NUPIT-SG que me acompanharam ao longo de 3 anos de Iniciação científica, em especial aos meus pesquisadores preferidos, Arion Moura e Jeann Branco, que sempre tiveram muita paciência, acreditaram no meu potencial e me estimularam ao longo da jornada acadêmica.

Agradeço também a todas as minhas tias e a minha mãe por terem investido na minha educação e fornecerem todos os subsídios necessários para a minha formação pessoal e profissional.

Por fim, agradeço aos meus amigos de graduação que caminharam ao meu lado durante todo esse processo e vivenciaram comigo as melhores e as mais desafiadoras experiências que a universidade nos incumbiu. E ao meu cachorro Bento José, por ter me acompanhado de maneira leal e pura em todas as circunstâncias e mudanças que vivemos nos seus 2 anos de vida até o momento.

“ Pois Deus não nos deu espírito de covardia,  
mas de poder, de amor e de equilíbrio. ”

(2 Timóteo 1:7)

## RESUMO

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada pela manifestação de convulsões e atividade cerebral atípica resultante da hiperexcitação neuronal provocada pelo desbalanço das vias sinápticas inibitórias e excitatórias. Intrinsecamente associados à hiperexcitabilidade, os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são estruturas proteicas transmembranares que exercem um papel essencial no controle do fluxo de íons pela membrana plasmática, o que leva a propagação do potencial de ação, fenômeno responsável pela geração de impulsos nervosos e que é considerado como ponto-chave para o controle de crises epiléticas. Recentemente o antidepressivo Vortioxetina demonstrou potencial anticonvulsivante através de mecanismos ainda não elucidados. Dessa forma, o presente trabalho promoveu a avaliação comparativa do potencial anticonvulsivante da Vortioxetina com dois fármacos antiepiléticos já utilizados na clínica (Carbamazepina e Lamotrigina) em dois modelos de canais de sódio dependentes de voltagem, utilizando o método computacional de docking molecular através do software GOLD. Os resultados obtidos demonstraram padrões de interação intermoleculares semelhantes entre a vortioxetina e a carbamazepina para Nav 1.2, enquanto para Nav 1.3, o fármaco teste apresentou interações em comum tanto com a carbamazepina, quanto com a lamotrigina. Além disso, nos cálculos de afinidade realizados pelo programa a vortioxetina apresentou a melhor pontuação de interação energética em ambas as isoformas testadas. Frente aos resultados obtidos foi possível inferir que a possível atividade anticonvulsivante demonstrada pela vortioxetina em estudos prévios pode ser justificada pela sua atuação em canais de sódio dependentes de voltagem.

**Palavras-chave:** Epilepsia. Reposicionamento de fármaco. Nav. Atracamento molecular. GOLD.

## ABSTRACT

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by the manifestation of seizures and atypical brain activity resulting from neuronal hyperexcitation caused by the imbalance of inhibitory and excitatory synaptic pathways. Intrinsically associated with hyperexcitability, voltage-gated sodium channels (Nav) are transmembrane protein structures that play an essential role in controlling the flow of ions across the plasma membrane, which leads to action potential propagation, a phenomenon responsible for the generation of nerve impulses and which is considered as a key point for the control of epileptic seizures. Recently, the antidepressant Vortioxetine demonstrated anticonvulsant potential through mechanisms not yet elucidated. Thus, the present work promoted the comparative evaluation of the anticonvulsant potential of Vortioxetine with two antiepileptic drugs already used in the clinic (Carbamazepine and Lamotrigine) in two models of voltage-gated sodium channels, using the computational method of molecular docking through the software GOLD. The results obtained showed similar intermolecular interaction patterns between vortioxetine and carbamazepine for Nav 1.2, while for Nav 1.3, the test drug showed interactions in common with both carbamazepine and lamotrigine. In addition, in the affinity calculations performed by the program, vortioxetine presented the best energy interaction score in both isoforms tested. Based on the results obtained, it was possible to infer that the possible anticonvulsant activity demonstrated by vortioxetine in previous studies may be justified by its action on voltage-gated sodium channels.

**Key words:** Epilepsy. Drug repositioning. Nav. Molecular docking. GOLD.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Classificação dos tipos de crises epiléticas segundo a ILAE.	15
<b>Figura 2</b> – Etapas do potencial de ação.	17
<b>Figura 3</b> – Topologia dos canais de sódio dependentes de voltagem.	19
<b>Figura 4</b> – Representação estrutural dos ligantes selecionados.	26
<b>Figura 5</b> – Estrutura do canal Nav <sub>v</sub> 1.2 (PDB ID: 6J8E) acoplada ao ligante de referência (ID: 9Z9) destacado em amarelo.	28
<b>Figura 6</b> – Esquematização das interações intermoleculares com o canal Nav <sub>v</sub> 1.2.	34
<b>Figura 7</b> – Esquematização das interações intermoleculares com o canal Nav <sub>v</sub> 1.3.	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Coordenadas usadas no <i>grid center</i> .	28
<b>Tabela 2</b> – Valores de afinidade com Nav 1.2 (PDB ID: 6J8E).	31
<b>Tabela 3</b> – Valores de afinidade com Nav 1.3 (PDB ID: 7W7F).	31
<b>Tabela 4</b> – Resumo das interações intermoleculares entre a vortioxetina, carbamazepina e lamotrigina com a isoforma Nav1.2.	33
<b>Tabela 5</b> – Resumo das interações intermoleculares entre a vortioxetina, carbamazepina e lamotrigina com a isoforma Nav1.3.	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ChemPLP	<i>Piecewise Linear Potential</i>
DAEs	Drogas antiepilépticas
DDP	Diferença de potencial
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>
ID	Código de identificação
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
ISRS	Inibidor seletivo da receção de serotonina
Kv	Canais de potássio dependentes de voltagem
Nav	Canais de sódio dependentes de voltagem
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
SERT	Transportador de serotonina
SDF	<i>Structure-data file format</i>
SNC	Sistema nervoso central
TDM	Transtorno depressivo maior
UniProtKB	<i>Universal Protein Knowledgebase</i>
5-HT	5-hidroxitriptamina

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
mV	Milivolts
Å	Angstrom

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
2.1	EPILEPSIA: DEFINIÇÃO, INCIDÊNCIA E CLASSIFICAÇÃO.....	14
2.2	POTENCIAL DE AÇÃO E SINAPSES NEURONAIS.....	16
2.3	CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM.....	18
2.4	TERAPIAS ANTIEPLÉPTICAS.....	20
2.5	POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTICONVULSIVANTE DA VORTIOXETINA.....	21
2.6	DOCKING MOLECULAR E INTERAÇÕES LIGANTE-RECEPTOR.....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	26
4.1	OBTENÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS FÁRMACOS LIGANTES.....	26
4.2	SELEÇÃO E OBTENÇÃO DOS ALVOS MOLECULARES.....	26
4.3	ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR.....	27
4.4	ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES.....	29
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>5</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	30
5.1	PONTUAÇÕES DE AFINIDADE.....	30
5.2	DOCKING MOLECULAR Nav 1.2.....	33
5.3	DOCKING MOLECULAR Nav 1.3.....	36
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neurológica grave associada ao estigma social, que atinge cerca de 1% da população mundial. A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) define o distúrbio como a predisposição do cérebro em gerar atividades hiperexcitatórias e síncronas, decorrentes do desbalanço entre vias sinápticas excitatórias e inibitórias, que podem se manifestar através de sintomas motores ou condutas e sensações incomuns (FISHER et al., 2014).

Indivíduos acometidos pela doença, que não possuem acesso ao tratamento ou não são responsivos a eles, normalmente possuem instrumentos sociais determinantes para a qualidade de vida prejudicados, como interações interpessoais, empregos, relações familiares e atividades cotidianas (STEIGER; JOKEIT, 2017).

Os canais de sódio dependentes de voltagem, especialmente as isoformas Nav 1.1, Nav 1.2, Nav 1.3 e Nav 1.6, são estruturas proteicas presentes nas membranas de células neuronais no sistema nervoso central, que possuem papel crítico no fluxo transmembranar de íons que geram o potencial de ação e propagam os estímulos nervosos no cérebro (XU et al., 2013). Portanto, atualmente a modulação dos canais iônicos é a abordagem terapêutica mais utilizada na clínica contra a epilepsia, sendo os “bloqueadores dos canais de sódio dependentes de voltagem” as drogas anticonvulsivantes mais frequentemente aplicadas ao tratamento da doença (WANG e CHEN, 2019). Fármacos consagrados como a fenitoína, carbamazepina, valproato, lamotrigina, entre outros, são exemplos de drogas pertencentes a essa classe de atuação (ABOU-KHALIL, 2019).

Entretanto, apesar da ampla disponibilidade de medicamentos com diversos alvos moleculares, desafios relacionados a efeitos colaterais e resistência ainda são dilemas primordiais no tratamento da doença. Estima-se que cerca de 30% dos pacientes com epilepsia não respondem aos medicamentos convencionais (LAXER et al., 2014; KRONER et al., 2016). Com isso emerge a necessidade da aplicação da inovação terapêutica na descoberta e reposicionamento de fármacos que se apresentem como estratégias alternativas para superar tais dificuldades.

A vortioxetina, um novo medicamento antidepressivo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), recentemente demonstrou resultados promissores quanto a sua atividade anticonvulsivante avaliada em modelos animais de crise induzida por penicilina e pentilenotetrazol (ÖGÜN; ÇETINKAYA; BEYAZÇIÇEK, 2019; AYGUN;

AYYILDIZ, 2021). Além disso, promoveu a melhora no quadro clínico geral de paciente com depressão e epilepsia associada a sintomas visuais (escotomas), por mecanismos ainda não elucidados (ONDER; COSKUN; GOKSUNGUR, 2018).

Com os adventos da bioinformática, as técnicas computacionais de triagem virtual avançaram de maneira rápida, principalmente devido à praticidade e ao baixo custo de execução dos experimentos. Com isso, cada vez mais a comunidade científica tem se interessado em desenvolver ensaios *in silico* utilizando o docking molecular como ferramenta de investigação de vários compostos a nível molecular. De modo geral, os programas disponíveis utilizam as estruturas químicas dos ligantes a serem estudados e a estrutura cristalizada do alvo terapêutico de interesse para simular a interação ligante-receptor a fim de avaliar parâmetros como a afinidade entre eles, bem como os tipos de interação intermolecular e os resíduos de aminoácidos envolvidos (PRIETO-MARTÍNEZ; ARCINIEGA; MEDINA-FRANCO, 2018).

Considerando a importância terapêutica dos canais de sódio dependentes de voltagem para o tratamento anticonvulsivante e as recentes descobertas sobre o potencial da vortioxetina nesse quesito, abordagens baseadas em bioinformática utilizando docking molecular como ferramenta de estudo, podem oferecer percepções sistemáticas para a compreensão da base estrutural de sua interação com essas proteínas e auxiliar no entendimento de seu possível mecanismo antiepilético, promovendo perspectivas de direcionamentos para futuras investigações do seu reposicionamento voltado à esta atividade.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 EPILEPSIA: DEFINIÇÃO, INCIDÊNCIA E CLASSIFICAÇÃO

Segundo a *International League Against Epilepsy* (ILAE, em português Liga Internacional Contra a Epilepsia), a epilepsia é um distúrbio neurológico crônico caracterizado pela predisposição persistente do cérebro em gerar crises convulsivas, as quais são desencadeadas pela atividade neuronal anormal, excessiva e síncrona localizada principalmente no córtex cerebral. As crises convulsivas, atualmente chamadas apenas de “crises”, são marcadas por sensações, comportamentos e/ou movimentos atípicos, podendo levar a consequências neurobiológicas, cognitivas e psicossociais (FISHER et al., 2017).

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns em todo mundo, afetando cerca de 50 milhões de pessoas ao redor do globo. Desse montante, aproximadamente 80% dos indivíduos estão concentrados em países subdesenvolvidos, onde existe uma maior dificuldade de acesso a serviços de saúde e tratamento adequado (SEXENA; LI, 2017). As primeiras manifestações da doença podem ocorrer em diversas faixas etárias, porém a maior incidência é relatada em crianças menores de 5 anos, acometendo 60/100.000 indivíduos, seguida pela idade adulta e adolescência, com incidências de 35/100.000 e 21/100.000 indivíduos, respectivamente (RINEY et al., 2021).

De modo geral, as crises epiléticas podem se apresentar de diversas maneiras e sua classificação segue um padrão baseado nas características da crise e no ponto predominante em que a atividade elétrica distópica se iniciou no cérebro (ponto focal) (FISHER et al., 2017). As crises podem ser classificadas de acordo com seu ponto focal, divididas em: focais (anteriormente denominadas parciais), generalizadas e desconhecidas (não classificadas ou inclassificáveis). As crises focais são aquelas que tem origem identificada em um dos hemisférios cerebrais, podendo ser subclassificadas de acordo com o comprometimento da consciência do paciente em seu intercurso, designadas como “sem comprometimento da consciência” ou “com comprometimento da consciência”. Posteriormente as crises são novamente classificadas de acordo com sua sintomatologia, se as manifestações foram de origem “motora” ou “não motora” às quais são atribuídas subdesignações específicas

segundo os sintomas apresentados, como tônicas, clônicas, mioclônicas e tônico-clônicas (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018).

As crises focais com progressão tônico-clônica bilateral, são assim denominadas por terem seu início focal progredido para os dois hemisférios cerebrais. Já as crises generalizadas, possuem início difundido em ambos os hemisférios e neste caso, a classificação segundo o prejuízo da consciência está ausente nas crises motoras, uma vez que se admite que neste tipo sempre há comprometimento de consciência. Sendo assim, as crises generalizadas podem ser classificadas segundo seus sinais de forma semelhante as crises focais, divididas em “motoras” ou “não motoras”, mas recebem novas subdesignações de acordo com os sintomas. Entretanto, quando o início da manifestação epiléptica não é determinado, as crises são classificadas como desconhecidas, mas também são separadas em motoras e não motoras e ainda em não classificadas, quando não há informações suficientes sobre a manifestação de sintomas (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018). A Figura 1 apresenta um resumo dos principais tipos de convulsões segundo a ILAE.

**Figura 1** – Classificação dos tipos de crises epiléticas segundo a ILAE.



**Fonte:** adaptado de FISHER et al. (2017).

Uma vez constatado o diagnóstico de epilepsia, a etiologia é um ponto amplamente explorado, pois reflete diretamente na escolha do tratamento adequado e no aconselhamento prognóstico da doença. Quando conhecidas, as causas podem ser diversas, incluindo genética, infecciosa, metabólica, imune ou múltiplas nos casos em que se manifestam diferentes etiologias no mesmo indivíduo. (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018).

## 2.2 POTENCIAL DE AÇÃO E SINAPSES NEURONAIS

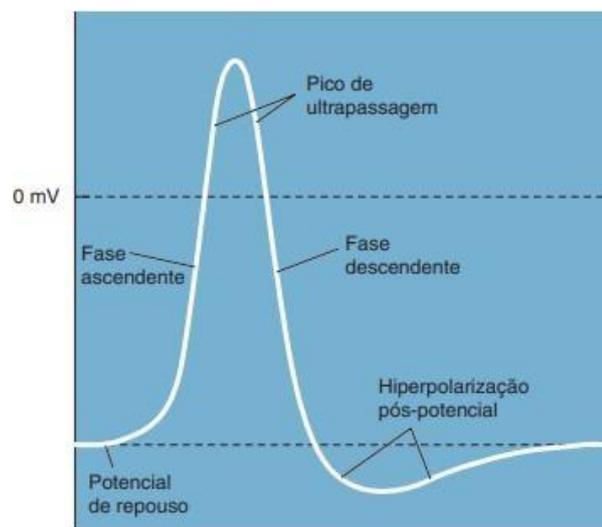
No cérebro a comunicação neuronal se dá através da condução de impulsos nervosos responsivos a estímulos, propagada pela geração de potencial de ação através de sinapses neurais. Devido a diferença da concentração de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou  $\text{Cl}^-$  dentro e fora das células nervosas, estas apresentam um potencial elétrico, também chamado de potencial de membrana, de aproximadamente  $-70\text{mV}$ . O controle do fluxo transmembrana desses íons e a consequente redistribuição de carga elétrica através da membrana é o que medeia a geração e propagação, ou ainda, a inibição de um potencial de ação. Os principais íons envolvidos no potencial de ação são o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{K}^+$ , sendo o  $\text{K}^+$  20 vezes mais concentrado que o  $\text{Na}^+$  no ambiente intracelular, ao passo que  $\text{Na}^+$  se concentra 10 vezes mais concentrado no ambiente extracelular quando comparado ao  $\text{K}^+$  (FLETCHER, 2011).

O potencial de ação se inicia quando, em resposta à ligação de um neurotransmissor em canais dependentes de ligante, a membrana axonal do neurônio atinge uma despolarização de aproximadamente  $20\text{mV}$ , levando a uma diferença de potencial (DDP) de  $-70\text{ mV}$  a  $-50\text{ mV}$ , que é chamada de “potencial limiar”. A partir desse momento ocorre a abertura abrupta de canais de sódio dependente de voltagem ( $\text{Nav}$ ) que permite um influxo rápido de  $\text{Na}^+$  para o interior da célula causando uma despolarização na membrana, processo denominado fase ascendente. Em dado momento, a DDP ultrapassa  $0\text{ mV}$  chegando até aproximadamente  $+40\text{ mV}$ , atingindo o pico de ultrapassagem ou *overshoot*. Logo em seguida, os canais de sódio começam a se fechar paralelamente à ativação dos canais de potássio dependentes de voltagem ( $\text{Kv}$ ), promovendo o efluxo de  $\text{K}^+$  e caracterizando a fase descendente do potencial de ação, em que ocorre a repolarização. Na última etapa do processo descendente a membrana se torna ligeiramente mais negativa que no potencial de repouso, processo denominado hiperpolarização pós-potencial ou *undershoot*. Ao

final, acontece a restauração gradual e eficiente do potencial de repouso pela atuação da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que faz com que a membrana saia do estado de hiperpolarização (Figura 2).

No período em que os canais de sódio estão fechados durante a repolarização, outro potencial de ação não pode ser gerado, evento chamado de período refratário absoluto. Ao passo que quando a membrana está hiperpolarizada pela abertura dos canais de potássio, mais corrente despolarizante é necessária para a geração de um potencial. A este evento se dá o nome de período refratário relativo (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002).

**Figura 2** – Etapas do potencial de ação.



**Fonte:** retirado de BEAR; CONNORS; PARADISO (2002).

No sistema nervoso central (SNC) humano desenvolvido, a maioria das transmissões sinápticas é química, ou seja, acontecem por intermédio de componentes químicos chamados neurotransmissores que se ligam a receptores ionotrópicos (canais de cátion ativados pela ligação direta dos neurotransmissores) ou metabotrópico (acoplados à proteína G). Esse tipo de sinapse pode ser de caráter excitatório ou inibitório. Isto é, quando um neurônio pré-sináptico libera neurotransmissores na fenda sináptica, estes irão se ligar a seus respectivos receptores pós-sinápticos, que podem promover a despolarização da membrana até o potencial limiar (estímulo excitatório) ou levar a sua hiperpolarização (estímulo inibitório), sendo os neurotransmissores glutamato e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) os principais representantes dos respectivos mecanismos, atuando sequencialmente nas vias glutamatérgicas e gabaérgicas (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002).

As vias inibitórias e excitatórias se apresentam criticamente balanceadas nos circuitos neurais, de modo que quando esse equilíbrio é afetado, podem ocorrer alterações neurológicas graves, como no caso da epilepsia, em que o quadro de hiperexcitabilidade sobrepõe a regulação inibitória (WANG; CHEN, 2019).

### 2.3 CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) são peças-chave na eletrofisiologia de células excitáveis, pois são as estruturas responsáveis pela geração e propagação do potencial de ação, mecanismo este que conduz os impulsos nervosos de uma célula à outra ao longo das redes neurais. Durante o potencial de repouso os Nav permanecem fechados, mas são ativados (abertos) quando a despolarização da membrana atinge um limiar elétrico (potencial limiar) detectado por segmentos que atuam como sensor de voltagem. Dessa forma, a alta seletividade dos canais ao Na<sup>+</sup> promove o influxo seletivo desse íon a favor de seu gradiente de concentração. Em seguida, a inativação dos canais de sódio de forma paralela à ativação de canais de potássio dependentes de voltagem, redefinem o campo elétrico da membrana ao estado de repouso (SHEN et al., 2017).

Topologicamente os Nav são constituídos por uma subunidade alfa ( $\alpha$ ) formadora de poro e subunidades beta ( $\beta$ ) auxiliares. Sendo a subunidade alfa formada por uma única e longa cadeia polipeptídica subdividida em quatro domínios homólogos (DI, DII, DIII e DIV), cada um contendo seis segmentos transmembranares (S1, S2, S3, S4, S5 e S6). Os segmentos S1 a S4 são os responsáveis pela formação do domínio de detecção de voltagem, ao passo que S4 é denominado “sensor de voltagem” devido a carga de resíduos positivos responsivos à despolarização da membrana, para abertura do poro. Já os segmentos S5 e S6 possuem sequências específicas de aminoácidos que formam o filtro de seletividade aos íons sódio (Na<sup>+</sup>) (Figura 3) (MANTEGAZZA et al., 2010).



expressão de canais de sódio, de modo que o potencial de ação salta rapidamente de uma área mielinizada a outra e o influxo de  $\text{Na}^+$  acontece predominantemente nos nódulos de Ranvier, minimizando as perdas elétricas e promovendo o impulso saltatório eficiente e rápido (MARTÍ; PÉREZ; MADRENAS, 2018; SCHMIDT; KNÖSCHE, 2019).

Em neurônios excitatórios, Nav 1.2 e Nav 1.6 são as principais isoformas de canais de sódio (OLIVA; BERKOVIC; PETROU, 2012) e por isso são muito importantes na regulação de potenciais de ação e liberação de neurotransmissores excitatórios, exercendo um papel central na plasticidade neural e na fisiopatologia das epilepsias (XU et al., 2013). Estudos realizados em roedores demonstraram que os canais Nav 1.3 são mais frequentes em neurônios embrionários, tendo sua expressão reduzida à medida que os canais Nav 1.1 e Nav 1.2 aparecem (CATTERALL; KALUME; OAKLEY, 2010). No entanto, sua expressão no SNC humano permanece na idade adulta e seu papel permanece essencial nos mecanismos de gerenciamento da excitabilidade neuronal, podendo provocar convulsões quando este se encontra disfuncional (MANTEGAZZA et al., 2010; XU et al., 2013).

Contrastando com os demais, os canais Nav 1.1 são expressos predominantemente em neurônios inibitórios GABAérgicos, promovendo a despolarização e ativação dessas vias. Neste caso, quando sua atividade é prejudicada, as descargas inibitórias são afetadas, o que pode causar hiperexcitabilidade e contribuir para o desencadeamento de convulsões (DUFLOCQ et al., 2008). A interação equilibrada e contrabalanceada entre Nav 1.2, Nav 1.3 e Nav 1.6 com Nav 1.1 parece se apresentar como chave para a função neuronal normal (MARTIN et al., 2007).

## 2.4 TERAPIAS ANTIEPILEPTICAS

A principal abordagem terapêutica para o controle da epilepsia atualmente está baseada no uso de drogas antiepilépticas (DAEs), que somam até o momento cerca de 30 fármacos que atuam em diferentes alvos moleculares e apresentam variados espectros de eficácia, propriedades farmacocinéticas, perfis de segurança e tolerabilidade (ABOU-KHALIL, 2019). Considerando que a fisiopatologia da doença está relacionada principalmente com a capacidade intrínseca de disparo de um neurônio mediada pelos canais iônicos dependentes de voltagem e pelas

propagações desbalanceadas entre as transmissões sinápticas excitatórias e inibitórias, atualmente, os mecanismos de ação das DAEs disponíveis no mercado podem ser classificados em três grupos gerais:

- i) Modulação dos canais iônicos dependentes de voltagem;
- ii) Inibição da excitação sináptica;
- iii) Aumento da inibição sináptica.

Desses, a modulação dos canais iônicos, em particular o bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, é a abordagem mais utilizada, principalmente no tratamento de crises focais em geral, ou focais com progressão bilateral tônico-clônica e generalizadas motoras (WANG; CHEN, 2019). As DAEs utilizadas na clínica há muito tempo como a fenitoína, carbamazepina e lamotrigina possuem tais canais como alvo e apesar de suas diferenças estruturais, é provável que seus mecanismos de bloqueio e ação farmacológica sejam semelhantes (XIE; GARTHWAITE, 1996). Acredita-se que essas drogas suprimam as convulsões através da inibição dos disparos repetitivos de alta frequência, apresentados em canais com atividade atípica nos casos de epilepsia (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

## 2.5 POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTICONVULSIVANTE DA VORTIOXETINA

A vortioxetina (1-[2-(2,4-dimetilfenil-sulfanil)-fenil]-piperazina) é um novo antidepressivo multimodal classificado como inibidor seletivo da receptação de serotonina (ISRS) aprovado em 2013 pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de transtorno depressivo maior (TDM) em adultos. Sua atuação combina o agonismo do receptor 5-hidroxitriptamina 1A (5-HT<sub>1A</sub>) com a inibição do transportador de serotonina (SERT). Além disso, também atua como um antagonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>7</sub> e como um agonista parcial dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> (D'AGOSTINO; ENGLISH; REY, 2015).

Recentemente alguns estudos publicaram resultados interessantes a respeito da atividade anticonvulsivante desse fármaco. Em um relato clínico, o uso da vortioxetina em paciente depressivo com epilepsia generalizada do lobo occipital com sintomas visuais (escotomas) apresentou resultado bem-sucedido na redução dos escotomas visuais relacionados a convulsão, bem como ao transtorno depressivo maior (ONDER; COSKUN; GOKSUNGUR, 2018). A vortioxetina também demonstrou

atividade satisfatória em modelo animal de convulsão induzida por penicilina, no qual promoveu redução na propagação de crises agudas. De forma similar, em modelos animais de convulsão induzida por pentilenotetrazol (associado principalmente a crises mioclônicas e tônico-clônicas) a vortioxetina minimizou a frequência média das crises, aumentou seu período de latência e diminuiu sua duração total. Já em modelos epiléticos de crise de ausência utilizando ratos WAG/Rij, o fármaco não causou alterações significativas na quantidade e duração das crises quando administrado em baixas doses (ÖGÜN; ÇETINKAYA; BEYAZÇIÇEK, 2019; AYGUN; AYYILDIZ, 2021).

Apesar da ação anticonvulsivante da vortioxetina ainda não ter sido de fato elucidada, a investigação de sua atuação como potencial modulador dos canais Nav é uma abordagem estratégica para a descoberta de seu mecanismo de ação na redução dos sintomas associados à epilepsia, tendo em vista seus resultados promissores em modelos de crise focal/focal com progressão bilateral, uma vez que tais condições clínicas mimetizadas por esses modelos respondem bem a moduladores de canais Nav. Além disso, a vortioxetina exibiu resultados pouco expressivos em modelo de crise generalizada não motora (crise de ausência), tradicionalmente responsivos a moléculas moduladoras de canal de cálcio do tipo T (ÇARÇA et al., 2019), reduzindo a possibilidade do seu mecanismo estar associado a esse tipo de canal.

## 2.6 DOCKING MOLECULAR E INTERAÇÕES LIGANTE-RECEPTOR

Cada vez mais cresce a necessidade por metodologias mais rápidas, eficazes e de baixo custo direcionadas a descoberta de novos candidatos a fármacos ou ao reposicionamento de medicamentos já disponíveis para outras atividades terapêuticas. Nesse contexto, a tecnologia de triagem virtual tem se desenvolvido de maneira rápida, pois trata-se de um método que permite delinear o rastreamento virtual de grandes bibliotecas de moléculas a fim de selecionar *in silico* estruturas com características desejáveis e potencialmente bioativas frente a determinados alvos farmacológicos de interesse (VERLI, 2014). Essa abordagem pode ser utilizada para complementar resultados experimentais obtidos em estudos *in vitro* e/ou *in vivo*, bem como triagem preliminar para filtrar e reduzir o número de moléculas necessárias em ensaios biológicos, de maneira a contribuir para a otimização do processo de

descoberta de um novo fármaco e seus possíveis mecanismos de ação (LI et al., 2014).

Dentro dessa categoria, o atracamento ou docking molecular é atualmente a técnica mais empregada no rastreamento e design de drogas baseada em estrutura. Essa ferramenta busca através de modelos matemáticos prever aproximadamente o modo de interação e a afinidade dos ligantes com um alvo terapêutico (FERREIRA et al., 2015). A simulação de reconhecimento ligante-proteína visa obter a via de menor energia baseada na complementariedade química do complexo que varia de acordo com as características estruturais e físico-químicas de ambas as estruturas interagentes (ABREU et al., 2015).

As características estruturais estão associadas aos arranjos espaciais moleculares, dados por variações na orientação, posicionamento espacial e rotações de ligações químicas presentes no complexo. Enquanto o grau de afinidade do ligante pelo alvo é definido pelas interações intermoleculares que dependem de suas características físico-químicas. Os principais tipos de interações incluem: ligações de hidrogênio; interações de van der Waals; interações iônicas; interações hidrofóbicas; interações do tipo cátion- $\pi$ ; interações envolvendo anéis aromáticos do tipo  $\pi$ - $\pi$  e empilhamento-T (VERLI, 2014).

A ligação de hidrogênio é uma interação de caráter atrativo entre dipolos permanentes de um átomo de hidrogênio (carregado positivamente) e um átomo eletronegativo, gerando força intermolecular intensa. A interação cátion- $\pi$  é uma interação molecular não covalente entre um sistema  $\pi$  com alta densidade eletrônica e um cátion adjacente. As interações iônicas são provindas de espécies moleculares que apresentam cargas negativas e positivas que se atraem. Enquanto que um empilhamento  $\pi$  é uma interação do tipo dipolo-dipolo, entre anéis aromáticos e/ou hetero-aromáticos, devido à polarização das nuvens eletrônicas ou em relação à atração eletrostática entre os elétrons  $\pi$  do anel aromático com carga parcial positiva  $\sigma$  em um átomo presente na estrutura. Já as interações do tipo empilhamento-T apresentam característica semelhante, mas a organização das espécies em vez de ser paralelo é perpendicular (FOKOUE et al., 2020).

As ligações de van der Waals fazem parte do grupo das interações hidrofóbicas e podem ser separadas em forças de Keesom, forças de Debye, forças entre dipolos instantâneos e forças de dispersão de London. A característica do grupo é que são

forças atrativas ou repulsivas residuais presentes entre átomos que não estão ligados covalentemente ou interações eletrostáticas (FOKOUÉ et al., 2020).

Muitos programas de docking molecular foram desenvolvidos desde a década de 80 (LI et al., 2014), entre eles, o GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) está entre os softwares mais utilizados e citados na literatura e destaca-se por seu desenvolvimento contínuo. Atualmente, o programa conta com quatro funções de pontuação (Goldscore, Chemscore, ASP e ChemPLP), que consistem em funções matemáticas utilizadas para prever de maneira aproximada a afinidade de ligação entre ligante e receptor (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anticonvulsivante da Vortioxetina (1-[2-(2,4-dimetilfenilsulfonil)-fenil]-piperazina) através da investigação *in silico* de sua atuação em canais de sódio dependentes de voltagem.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

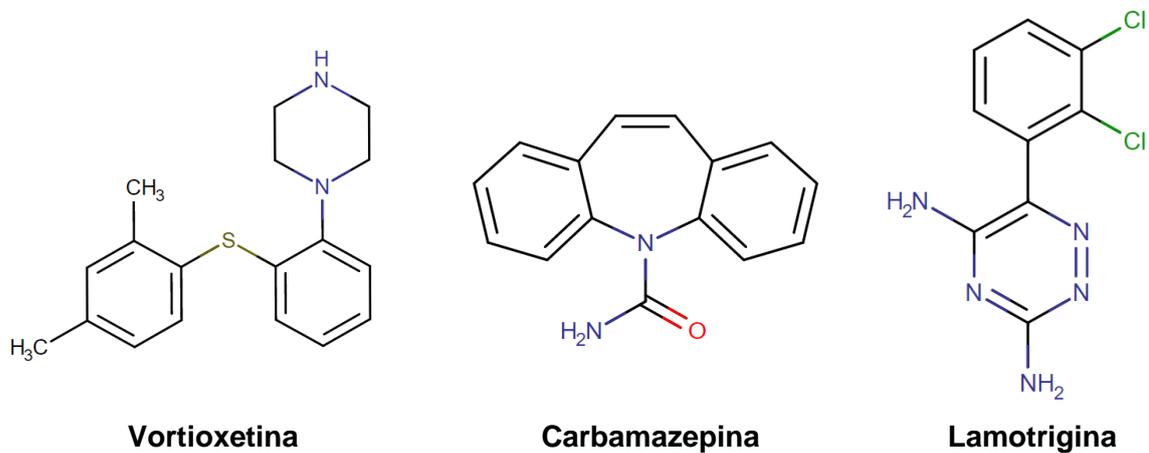
- Otimizar a estrutura do ligante teste (Vortioxetina) e dos ligantes de referência (Carbamazepina e Lamotrigina);
- Obter e tratar as estruturas proteicas cristalizadas dos canais Nav 1.2 e Nav 1.3;
- Identificar a melhor posição de ligação dos ligantes nos sítios ativos dos canais e suas respectivas pontuações de *fitness*;
- Analisar os números e tipos de interações químicas realizadas entre ligantes e receptores;
- Analisar os resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações fármaco-receptor;
- Comparar o desempenho do ligante teste, frente aos ligantes de referência em suas capacidades de interação com as estruturas dos canais selecionados.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS FÁRMACOS LIGANTES

Para o presente estudo a Carbamazepina e a Lamotrigina foram escolhidas como referências para comparação da afinidade e modos de interações intermoleculares da Vortioxetina aos modelos de Nav, uma vez que esses fármacos são anticonvulsivantes que possuem comprovadamente como alvo terapêutico os canais de sódio dependentes de voltagem (QIAO et al., 2014).

**Figura 4** – Representação estrutural dos ligantes selecionados.



Fonte: retirado de DrugBank *online* (2022).

As estruturas químicas dos três fármacos (Figura 4) foram obtidas a partir do banco de dados PubChem no formato SDF (*structure-data file format*) e submetidas ao software Avogadro (versão 1.1.3) para definição de suas respectivas conformações tridimensionais. Posteriormente, os ligantes tiveram suas energias otimizadas no próprio programa, utilizando o campo de força MMFF94 nas configurações padrões, para definição de suas conformações mais estáveis, ou seja, de menor energia livre entre seus átomos.

### 4.2 SELEÇÃO E OBTENÇÃO DOS ALVOS MOLECULARES

Com base nos dados obtidos na literatura a respeito da influência nas atividades neuronais relevantes para o desencadeamento e controle de crises epiléticas, foram selecionadas as estruturas cristalográficas de duas isoformas

promotoras de atividade excitatória de canais de sódio dependentes de voltagem predominantes no SNC disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) com o intuito de avaliar a potencialidade da atividade bloqueadora/depressora dos fármacos testados, sendo elas: Nav 1.2 (PDB ID: 6J8E) e Nav 1.3 (PDB ID: 7W7F).

Para a validação dos modelos, a princípio foi realizado um estudo utilizando a plataforma UniProtKb (*Universal Protein Knowledgebase*), onde se obtiveram as sequências de aminoácidos em formato de arquivo *fasta* das isoformas disponíveis para os canais de sódio codificados por genes humanos. Com isso, as sequências foram submetidas à ferramenta BLASTp (*protein-protein*) para alinhamento com o acervo de moléculas disponíveis no banco de dados do PDB, de modo a selecionar os cristais com maior similaridade de identidade genética e melhor qualidade de resolução disponíveis.

#### 4.3 ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR

O software GOLD (versão 2020.3.0) foi escolhido para desenvolver os ensaios *in silico* de atracamento molecular devido a sua robustez e compatibilidade com os receptores-alvo selecionados para o estudo. O programa se baseia em um algoritmo de busca genético que faz alusão à teoria evolutiva de Darwin para encaixar ligantes flexíveis em sítios de ligação de proteínas, gerando diversas conformações do ligante que são avaliadas pela função de pontuação do programa, tendendo a evoluir para a melhor solução (VERDONK et al., 2003).

As estruturas dos canais foram tratadas no próprio software através da remoção de ligantes, solventes, cofatores e demais artefatos provenientes do arquivo PDB original, além da adição de átomos de hidrogênio, que não são difratados no experimento de cristalografia de raios-X, portanto, não estão inclusos nas estruturas cristalográficas.

As coordenadas plotadas para definição do *Grid Center* (Tabela 1) foram obtidas a partir do programa *Discovery Studio Visualizer* e foi utilizada como referência a posição do ligante 9Z9 (3beta,14beta,17beta,25R)-3-[4-metoxi-3(metoximetila)butoxi]spirost-5-en), ID: 9Z9, que se trata de um detergente hidrofóbico co-cristalizado em comum nos 2 receptores (Nav 1.2 e Nav 1.3).

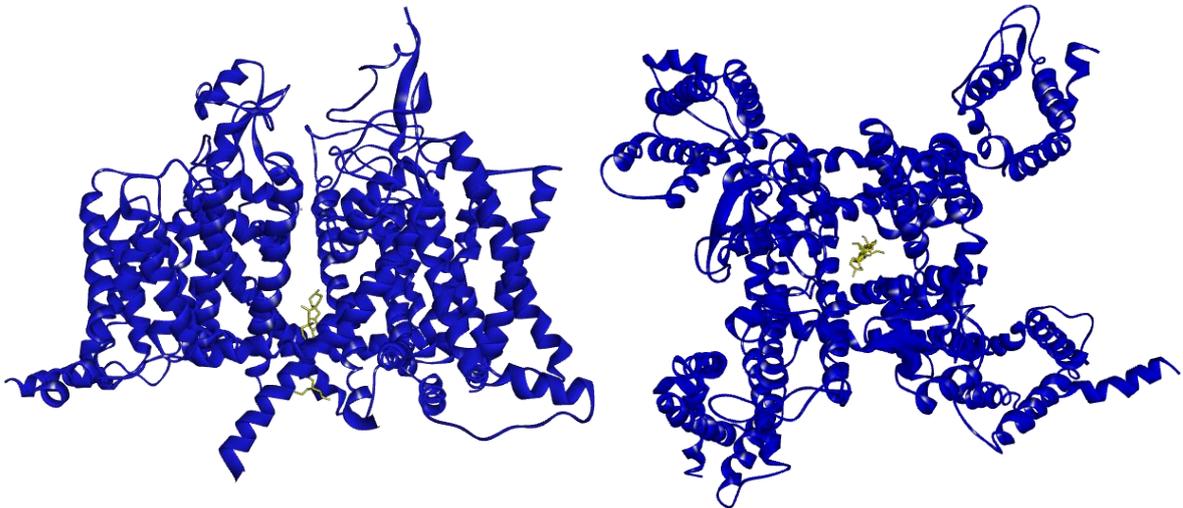
**Tabela 1** – Coordenadas utilizadas no *grid center*.

Receptor	Coordenadas		
	X	Y	Z
<b>Nav 1.2 (PDB ID: 6J8E)</b>	133,983	133,293	139,865
<b>Nav 1.3 (PDB ID: 7W7F)</b>	131,125	134,147	140,051

Fonte: Autora (2022).

Esse sítio de ligação está localizado na região de abertura do canal na face citoplasmática da proteína (Figura 5), e foi mapeado em estudos de atracamento molecular e eletrofisiologia com base na estrutura obtida em crio-microscopia eletrônica da isoforma Nav 1.4 (PDB ID: 6AGF) (CRAIG et al., 2020). Além disso, quando comparada através de cálculos de atracamento com uma região mais profunda do poro de Nav 1.5 (PDB ID: 6LQA), essa região demonstrou resultados mais favoráveis a ligação de moléculas com sistema de anéis hidrofóbicos semelhante ao ligante 9Z9 (GULSEVIN et al., 2022). O tamanho da área de análise foi considerado para átomos dentro de um raio de 100 Å.

**Figura 5** – Estrutura do canal Nav 1.2 (PDB ID: 6J8E) acoplada ao ligante de referência (ID: 9Z9) destacado em amarelo.



Fonte: Autora (2022).

Para a obtenção dos scores de pontuação, a função padrão ChemPLP (*Piecewise Linear Potential*) foi selecionada, pois demonstrou melhor desempenho para previsão de pose e triagem virtual sob condições padronizadas em experimentos comparativos de atracamento em relação às demais funções disponíveis no GOLD, além de exigir menor custo computacional para os experimentos (LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012).

Foram realizadas análises em triplicata, em que os três ligantes estudados foram submetidos simultaneamente ao *docking* com cada um dos dois receptores, a fim de se obter a média dos valores de *Fitness* para avaliação do perfil de afinidade de cada um dos fármacos e utilizou-se a pose mais bem pontuada para análise dos resultados demonstrando os modos de interação em que ocorreram as melhores condições de afinidade.

#### 4.4 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES

Os complexos gerados a partir das conformações melhor pontuadas pela função de *Fitness* foram plotados no programa *Discovery Studio Visualizer* (BIOVIA, 2021), que permitiu a visualização e análise do atracamento molecular, com o qual foi possível estudar quais foram os tipos de interações intermoleculares presentes no *docking*, além do seu perfil de carga, resíduos envolvidos, ângulos do ligante, bem como a representação gráfica das estruturas em 3D e esquematização das ligações através de diagramas em 2D.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos no *docking* foram avaliados estatisticamente no programa Origin 2020b. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pós-teste de Dunn, com nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PONTUAÇÕES DE AFINIDADE

Anticonvulsivantes típicos como lamotrigina e carbamazepina são moléculas eletroneutras que contêm grupos polares não ionizáveis e apresentam em sua estrutura um núcleo farmacofórico em comum: um anel aromático disponível para interações aromática-aromática com cadeias laterais de resíduos importantes com os canais Nav (LIPKIND; FOZZARD, 2010). Analogamente, a vortioxetina também apresenta uma estrutura eletroneutra com uma região polar não ionizável, bem como dois anéis aromáticos ligados por um tioéter, onde um desses anéis apresenta duas metilas na posição *orto* e *para*. Portanto, seu arcabouço dinâmico pode apresentar de maneira similar ligações de relevância terapêutica no sítio de ação.

Para prever a afinidade *in silico* entre um ligante e seu receptor a função ChemPLP (equação 1), utilizada pelo GOLD, calcula a energia de interação utilizando o Potencial Linear por Partes ( $f_{PLP}$ ) para modelar a complementariedade estérica do complexo. Além disso, os termos de ligação de hidrogênio e metal dependentes de distância e ângulo são considerados ( $f_{chem-hb}$ ,  $f_{chem-cho}$ ,  $f_{chem-met}$ ). A pontuação interna do ligante consiste no potencial de choque de átomos pesados ( $f_{lig-clash}$ ), bem como no potencial de torção ( $f_{lig-tors}$ ). Além disso, a função é capaz de calcular acoplamentos covalentes ( $f_{chem-cov}$ ), considerando cadeias laterais flexíveis ( $f_{chem-prot}$ ) e moléculas de água explícitas, bem como restrições de manuseio ( $f_{cons}$ ) (GOLD USER GUIDE, 2021).

$$\begin{aligned}
 Fitness_{ChemPLP} = & - (W_{PLP} \cdot f_{PLP} + W_{lig-clash} \cdot f_{lig-clash} + W_{lig-tors} \cdot f_{lig-tors} \\
 & + f_{chem-cov} + W_{prot} \cdot f_{chem-prot} + W_{cons} \cdot f_{cons}) - (f_{chem-hb} + f_{chem-cho} + \\
 & f_{chem-met})
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Os valores de pontuação *Fitness* obtidos para as isoformas Nav 1.2 e Nav 1.3 são demonstrados separadamente nas tabelas 2 e 3 respectivamente, bem como as médias e desvio padrão das análises em triplicata realizadas com cada um dos fármacos testados. A pontuação é um número adimensional e quanto maior for, indica que melhor será a interação ligante-proteína prevista (FERREIRA, 2016).

**Tabela 2** – Valores de afinidade com Nav 1.2 (PDB ID: 6J8E).

Moléculas	<i>Fitness 1</i>	<i>Fitness 2</i>	<i>Fitness 3</i>	Média ± DP
Vortioxetina	55.21	55.21	55.46*	55.093 <sup>a</sup> : ± 0.43684
Carbamazepina	48.26	51.61*	51.55	50.473 ± 1.91704
Lamotrigina	44.41*	42.50	42.93	43.28 ± 1.00195

**Nota:** os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn.

**Legenda:** \*Melhores poses rankeadas pelo GOLD no docking molecular.

<sup>a</sup> p<0,05 vortioxetina em comparação com lamotrigina.

**Fonte:** Autora (2022).

**Tabela 3** – Valores de afinidade com Nav 1.3 (PDB ID: 7W7F).

Moléculas	<i>Fitness 1</i>	<i>Fitness 2</i>	<i>Fitness 3</i>	Média ± DP
Vortioxetina	40.72	40.96	41.03*	40.903 <sup>a</sup> ± 0.16258
Carbamazepina	33.95	36.21*	31.55	33.903 ± 2.33035
Lamotrigina	39.36*	38.69	38.40	38.817 ± 0.49238

**Nota:** os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn.

**Legenda:** \*Melhores poses rankeadas pelo GOLD no docking molecular.

<sup>a</sup> p<0,05 vortioxetina em comparação com carbamazepina.

**Fonte:** Autora (2022).

Para a isoforma Nav 1.2, não houve diferença estatística significativa entre os valores de *Fitness* obtidos para a vortioxetina e a carbamazepina. Já para a isoforma Nav 1.3, não houve diferença significativa entre os valores de *Fitness* apresentados pela vortioxetina e a lamotrigina.

Os resultados compilados na docagem demonstraram uma linearidade no ranking de pontuações, tendo a vortioxetina se destacado com as maiores médias de afinidade em ambos os canais, Nav 1.2 (55.093) e Nav 1.3 (40.903), resultado indicativo do seu provável poder de ligação aos receptores estudados. Já a carbamazepina apresentou maior pontuação em Nav 1.2 (50.473), enquanto a lamotrigina se sobressaiu em sua afinidade com Nav 1.3 (38.817), quando comparada a carbamazepina neste mesmo alvo.

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a lamotrigina apresentou uma taxa de desligamento (*off-rate*) muito menor para a subunidade alfa de Nav 1.3 quando comparada a carbamazepina, o que indica que este fármaco permanece ligado por

mais tempo a este receptor pela sua maior afinidade, promovendo um período de inativação do canal maior que a carbamazepina (QIAO et al., 2014), o que possivelmente está relacionado aos tipos de interações ligante-receptor realizadas. Os resultados de afinidade obtidos pelo GOLD corroboram com essas informações e podem ser correlacionados com a realização de quatro ligações de hidrogênio (interações fortes) da lamotrigina, frente a uma única ligação de hidrogênio apresentada pela carbamazepina em Nav 1.3, como será apresentado mais adiante.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, podemos conjecturar pelas pontuações Fitness que o conjunto de interações intermoleculares realizadas pela vortioxetina (ligações carbono-hidrogênio, interações alquila, pi-alquila e pi-enxofre) em ambos os canais, apesar de mais fracas que as ligações de hidrogênio apresentadas pelas moléculas de referência (GÓMEZ-JERIA et al., 2020), promoveria uma taxa de desligamento ainda menor comparada aos outros dois fármacos e conseqüentemente sua maior permanência no sítio de ligação.

## 5.2 DOCKING MOLECULAR Nav 1.2

O resumo das interações químicas realizadas entre o canal Nav 1.2 e os fármacos está apresentado na tabela 4. A representação do complexo canal-fármaco em 3D e 2D com o perfil das interações intermoleculares envolvidas está na figura 6.

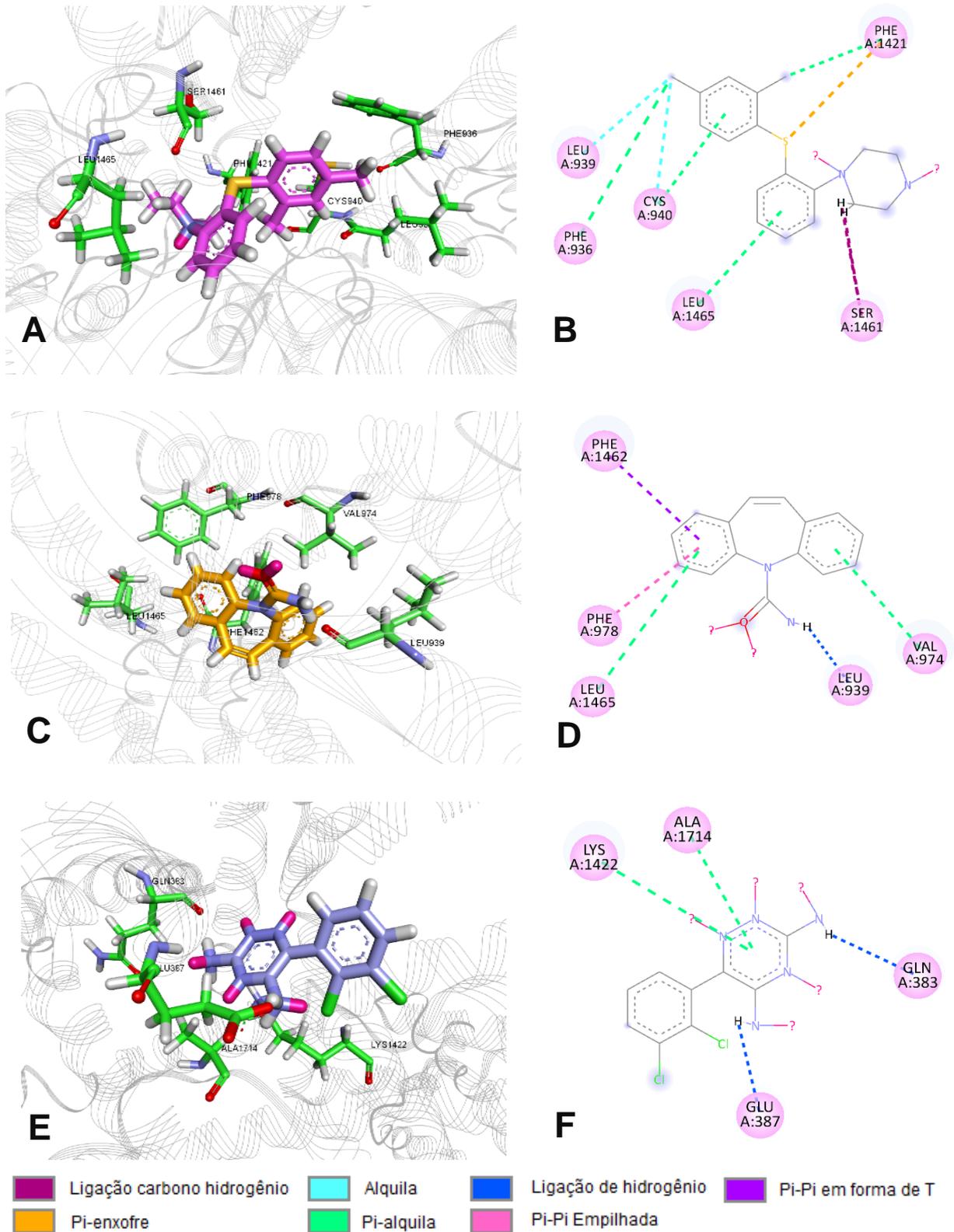
**Tabela 4** – Resumo das interações intermoleculares entre a vortioxetina, carbamazepina e lamotrigina com a isoforma Nav1.2.

Fármaco testado	Tipo de ligação	Quantidade de ligações	Resíduos do canal
Vortioxetina	Ligação carbono-hidrogênio	2	Serina 1461A
	Alquila	2	Cisteína 940A
			Leucina 939A
	Pi-Alquila	4	Leucina 1465A
			Cisteína 940A
			Fenilalanina 936A
Fenilalanina 1421A			
Pi-Enxofre	1	Fenilalanina 1421A	
Carbamazepina	Ligação de Hidrogênio	1	Leucina 939A
	Pi-Alquila	2	Leucina 1465A
			Valina 974A
	Pi-Pi em forma de T	1	Fenilalanina 1462A
Pi-Pi Empilhada	1	Fenilalanina 978A	
Lamotrigina	Ligação de Hidrogênio	2	Glutamina 383A
			Glutamato 387A
	Pi-Alquila	2	Lisina 1422A
			Alanina 1714A

**Legenda:** “A” se refere à identificação da cadeia formadora da subunidade alfa no PDB.

**Fonte:** Autora (2022).

**Figura 6** – Esquemática das interações intermoleculares entre cada fármaco com o canal Nav 1.2.



**Legenda:** (A) Complexo tridimensional Nav1.2-Vortioxetina; (B) Diagrama 2D Nav1.2-Vortioxetina; (C) Complexo tridimensional Nav1.2-Carbamazepina; (D) Diagrama 2D Nav1.2-Carbamazepina; (E) Complexo tridimensional Nav1.2-Lamotrigina; (F) Diagrama 2D Nav1.2-Lamotrigina.

**Fonte:** Autora (2022).

Na comparação dos resultados entre as três moléculas, a vortioxetina não apresentou nenhuma interação em comum com resíduos de aminoácidos apresentados pela ligação da lamotrigina a este receptor. No entanto, em comparação com a carbamazepina, a vortioxetina apresentou uma interação do tipo alquila com a Leucina 939 na metila da posição orto de um dos anéis aromáticos, o mesmo resíduo em que a carbamazepina fez ligação de hidrogênio em seu grupamento amida. Ademais, ambas as estruturas se ligaram através de interação pi-alquila com a Leucina 1465. Além das interações em comum descritas, a vortioxetina apresentou individualmente duas ligações carbono-hidrogênio (Serina 1461), interação alquila (Cisteína 940), pi-alquila (Cisteína 940, Fenilalanina 936/1421) e pi-enxofre (Fenilalanina 1421) (Tabela 4).

Previamente, um estudo de docking molecular usando um modelo de Nav 1.2 por homologia com a estrutura cristalina dos canais de potássio, rastreou interações hidrofóbicas semelhantes às encontradas no nosso estudo para carbamazepina com os resíduos Leucina 1465 próximo ao domínio DIII-S6 e Fenilalanina 978, próximo ao domínio DII-S6 localizados no centro do poro, de modo que seu anel aromático ligante a esses resíduos praticamente ocluiu o lúmen do canal (LIPKIND; FOZZARD, 2010). Dessa forma, é possível pressupor, baseado na semelhança de interação com resíduos importantes para atuação bloqueadora da carbamazepina, principalmente com a Leucina 1465, que a vortioxetina pode atuar em regiões relevantes dessa isoforma para promover atividade bloqueadora e conseqüentemente anticonvulsivante.

### 5.3 DOCKING MOLECULAR Nav 1.3

O resumo das interações químicas realizadas entre o canal Nav 1.3 e as moléculas de vortioxetina, carbamazepina e lamotrigina estão apresentados na tabela 5 e a esquematização 3D e 2D dos perfis de interação intermoleculares estão contidos na figura 7.

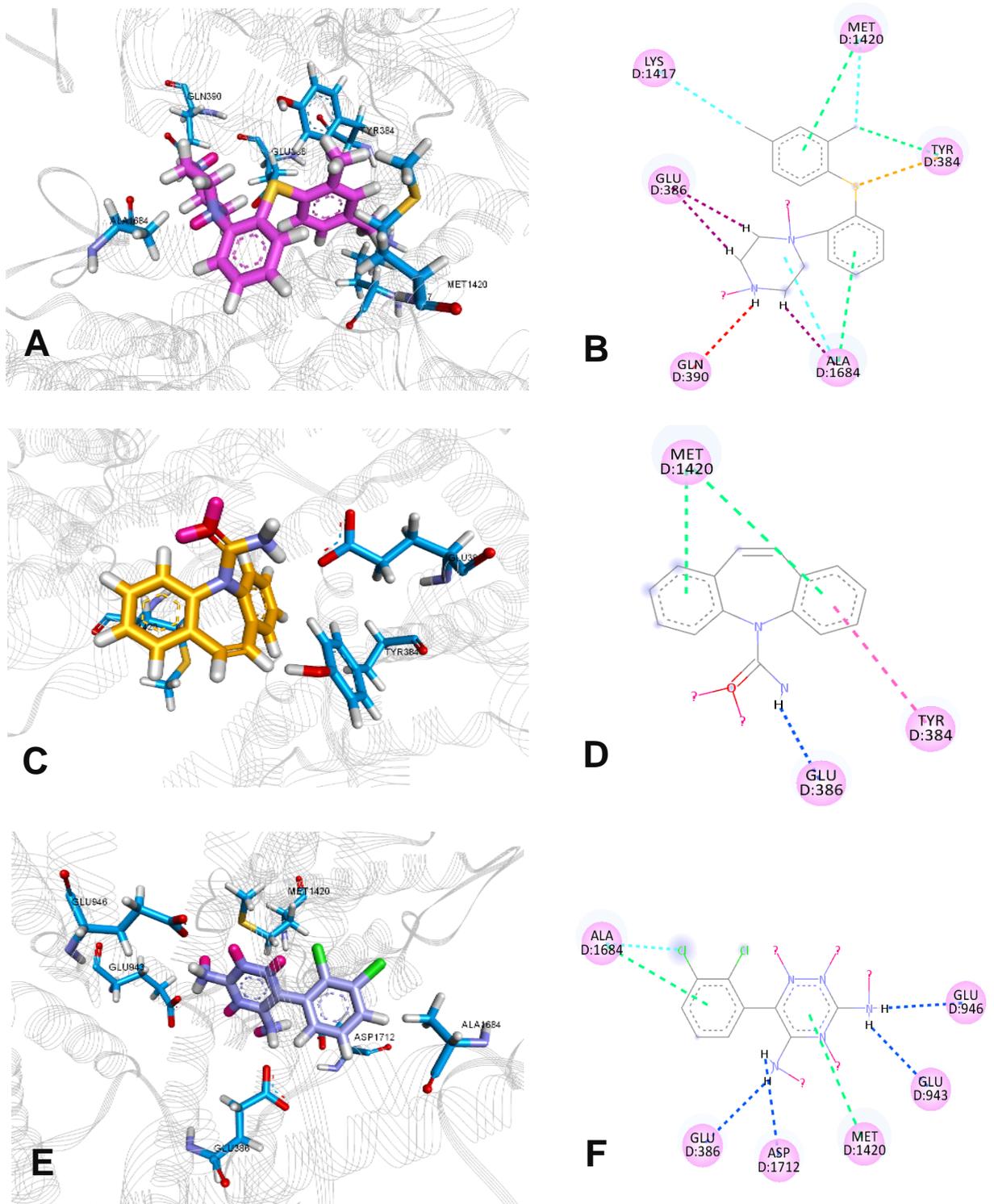
**Tabela 5** – Resumo das interações intermoleculares entre a vortioxetina, carbamazepina e lamotrigina com a isoforma Nav1.3.

Fármaco testado	Tipo de ligação	Quantidade de ligações	Resíduos do canal
Vortioxetina	Ligação carbono-hidrogênio	3	Glutamato 386D
			Glutamato 386D
			Alanina 1684D
	Alquila	3	Lisina 1417D
			Metionina 1420D
			Alanina 1684D
	Pi-Alquila	3	Metionina 1420D
			Tirosina 384D
Alanina 1684D			
Pi-Enxofre	1	Tirosina 384D	
Interação repulsiva	1	Glutamina 390D	
Carbamazepina	Ligação de Hidrogênio	1	Glutamato 386D
	Pi-Alquila	2	Metionina 1420D
	Pi-Pi Empilhada	1	Tirosina 384D
Lamotrigina	Ligação de Hidrogênio	4	Glutamato 946D
			Glutamato 943D
			Glutamato 386D
			Aspartato 1712D
	Alquila	1	Alanina 1684D
	Pi-Alquila	2	Metionina 1420D
Alanina 1684D			

**Legenda:** “D” se refere a identificação da cadeia formadora da subunidade alfa no PDB.

**Fonte:** Autora (2022).

**Figura 7** – Esquematização das interações intermoleculares com o canal Nav 1.3.



**Legenda:** (A) Complexo tridimensional Nav1.3-Vortioxetina; (B) Diagrama 2D Nav1.3-Vortioxetina; (C) Complexo tridimensional Nav1.3-Carbamazepina; (D) Diagrama 2D Nav1.3-Carbamazepina; (E) Complexo tridimensional Nav1.3-Lamotrigina; (F) Diagrama 2D Nav1.3-Lamotrigina.

**Fonte:** Autora (2022).

Por se tratar de uma estrutura cristalográfica recentemente disponibilizada em bancos de dados, para Nav 1.3 não foram encontrados registros acadêmicos que revelassem os resíduos de importância para ação anticonvulsivante em modelos deste canal. Logo, a comparação das interações dos aminoácidos semelhantes entre a vortioxetina com fármacos de referência que já possuem atividade inibitória relatada, podem fornecer informações significantes para investigação de sua atividade nesta isoforma.

A vortioxetina apresentou interações com todos os aminoácidos mapeados no docking da carbamazepina e com 3 tipos de aminoácidos atingidos pela lamotrigina, diferindo em alguns casos nos tipos de ligações químicas. A vortioxetina apresentou duas ligações carbono-hidrogênio com Glutamato 386, enquanto que a carbamazepina e a lamotrigina fizeram cada uma, uma ligação de hidrogênio. Por sua vez a vortioxetina apresentou uma ligação aquila e uma ligação pi-alquila com metionina 1420, já carbamazepina fez duas ligações pi-alquila e a lamotrigina uma ligação pi-alquila com o resíduo. A vortioxetina apresentou uma interação pi-aquila e uma pi-enxofre com a tirosina 384, já a carbamazepina fez uma interação empilhada pi-pi, porém esse resíduo não foi mapeado no atracamento com a lamotrigina. Por outro lado, a vortioxetina realizou uma ligação carbono-hidrogênio, uma interação alquila e uma pi-alquila com a Alanina 1684, enquanto a lamotrigina realizou interações alquila e pi-alquila com o mesmo resíduo e este não foi localizado no docking da carbamazepina (Tabela 5).

Neste caso, a vortioxetina exibiu similaridade com resíduos em comum tanto à lamotrigina, quanto à carbamazepina, especialmente com Glutamato 386 e a Metionina 1420 que realizaram os mesmos tipos de interações químicas com os dois fármacos padrões utilizados na terapêutica clínica, dessa forma é possível presumir que estes fragmentos façam parte do arcabouço proteico relacionado ao bloqueio do canal. Logo, o potencial anticonvulsivante demonstrado pela vortioxetina em estudos prévios (ONDER; COSKUN; GOKSUNGUR, 2018; ÖGÜN; ÇETINKAYA; BEYAZÇIÇEK, 2019; AYGUN; AYYILDIZ, 2021) também pode estar associado à sua atividade em Nav 1.3, assim como foi suposto para Nav 1.2.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no docking molecular mostraram que a vortioxetina apresentou pontuações de afinidade mais altas que os fármacos de referência em ambos os canais estudados, informação que, do ponto de vista eletrofisiológico, pode estar correlacionada com a sua maior permanência no sítio de ligação em comparação a carbamazepina e lamotrigina. Em relação às interações intermoleculares realizadas pelo fármaco teste, foram localizados resíduos semelhantes à carbamazepina para o canal Nav 1.2, especialmente com a Leucina 1465, aminoácido já mapeado em estudo prévio de docking como provável agente de importância para o bloqueio das correntes de sódio nesta proteína. Em contrapartida, para Nav 1.3, a vortioxetina apresentou interações com resíduos semelhantes aos dois fármacos usados como comparativo (lamotrigina e carbamazepina), com destaque para Glutamato 386 e a Metionina 1420, que aparecem simultaneamente nos três complexos formados com o canal e, portanto, podem estar associados ao bloqueio e inibição da atividade desta isoforma. Desta maneira, conjecturamos que o melhoramento dos sintomas associados à epilepsia manifestados pela vortioxetina em estudos anteriores, pode estar relacionado a sua atuação em canais de sódio dependentes de voltagem. Portanto, considerando o caráter meramente preditivo da triagem virtual, as informações levantadas podem ser úteis para sugerir a execução de futuros estudos eletrofisiológicos com intuito de caracterizar o papel deste fármaco na inibição dos canais de sódio e assim, delinear seu mecanismo de ação no tratamento da epilepsia.

## REFERÊNCIAS

ABOU-KHALIL, B. W. Update on antiepileptic drugs 2019. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 2, p. 508-536, 2019.

ABREU, R. A. Caracterização funcional e estrutural comparativa in silico de uma proteína PR-5 do tipo taumatina de *Poncirus trifoliata*. Monografia (Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos). Universidade Federal de Campina Grande, 2015.

AYGUN, H.; AYYILDIZ, M. Vortioxetine increases absence-like seizures in WAG/Rij rats but decreases penicillin-and pentylenetetrazole-induced seizures in Wistar rats. **Epilepsy & Behavior**, v. 116, p. 107797, 2021.

BARONI, D.; MORAN, O. Molecular differential expression of voltage-gated sodium channel  $\alpha$  and  $\beta$  subunit mRNAs in five different mammalian cell lines. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, n. 6, p. 729-738, 2011.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Artmed editora, 2002.

BIOVIA, Dassault Systemes. Discovery Studio 2019. **San Diego: Dassault Systèmes**; 2019. 2021.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. The pharmacological basis of therapeutics. **Goodman, Gilmans, editors**, v. 11, 2006.

CATTERALL, W. A.; KALUME, F.; OAKLEY, J. C. Nav1. 1 channels and epilepsy. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 11, p. 1849-1859, 2010.

ÇARÇAK, N. et al. Cav3. 2 T-type calcium channel mutation influences kindling-induced thalamic neuronal firing patterns in Genetic Absence Epilepsy Rats From Strasbourg. **Epilepsia**, v. 60, n. 7, p. 1378-1386, 2019.

CRAIG, R. A. et al. Veratridine: A Janus-Faced Modulator of Voltage-Gated Sodium Ion Channels. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 418-426, 2020.

D'AGOSTINO, A.; ENGLISH, C. D.; REY, J. A. Vortioxetine (brintellix): a new serotonergic antidepressant. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 1, p. 36, 2015.

DUFLOCQ, A. et al. Nav1.1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 39, n. 2, p. 180-192, 2008.

FALCO-WALTER, J. J.; SCHEFFER, I. E.; FISHER, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 139, p. 73-79, 2018.

FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FERREIRA, F. B. Planejamento baseado na estrutura da metaloprotease BPMP-I e avaliação de tiossemicarbazonas ativas contra a peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2016.

FISHER, R. S. et al. Relato oficial da ILAE: Uma definição prática de epilepsia. **Epilepsia**. 55v, 475-82p, 2014.

FISHER, R. S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522-530, 2017.

FLETCHER, A. Action potential: generation and propagation. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 12, n. 6, p. 258-262, 2011.

FOKOUÉ, H. H. et al. Há algo novo no reconhecimento molecular aplicado à química medicinal?. **Química Nova**, v. 43, p. 78-89, 2020.

GOLD USER GUIDE. **A Component of the CSD-Discovery Suite**. United Kingdom: Cambridge Crystallographic Data Centre, 2021.

GÓMEZ-JERIA, J. S. et al. Some remarks about the relationships between the common skeleton concept within the Klopman-Peradejordi-Gómez QSAR method and the weak molecule-site interactions. **Chemistry Research Journal**, v. 5, n. 2, p. 32-52, 2020.

GULSEVIN, A. et al. Veratridine Can Bind to a Site at the Mouth of the Channel Pore at Human Cardiac Sodium Channel Nav1.5. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2225, 2022.

HUMPHREY W.; DALKE A.; SCHULTEN K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

KRONER, B. L. et al. Epilepsy or seizure disorder? The effect of cultural and socioeconomic factors on self-reported prevalence. **Epilepsy & Behavior**, v. 62, p. 214-217, 2016.

LAXER, K. D. et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. **Epilepsy & Behavior**, v. 37, p. 59-70, 2014.

LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, p. 737–748, 2012.

LI, Y. et al. Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 2. Evaluation methods and general results. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 6, p. 1717-1736, 2014.

LI, X. et al. Structural basis for modulation of human Nav1.3 by clinical drug and selective antagonist. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2022.

LIPKIND, G. M.; FOZZARD, H. A. Molecular model of anticonvulsant drug binding to the voltage-gated sodium channel inner pore. **Molecular Pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 631-638, 2010.

MAGALHÃES, C. S. et al. Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking of Highly Flexible Ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206-224, 2014.

MANTEGAZZA, M. et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 4, p. 413-424, 2010.

MARTÍ, A.; PÉREZ, J.J.; MADRENAS, J. Action potential propagation: ion current or intramembrane electric field?. **General of Physiology and Biophysics**. 37v, 71-82p, 2018.

MARTIN, M. S. et al. The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 23, p. 2892-2899, 2007.

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

ÖGÜN, M. N.; ÇETINKAYA, A.; BEYAZÇIÇEK, E. The effect of vortioxetine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 77, n. 6, p. 412-417, 2019.

OLIVA, M.; BERKOVIC, S. F.; PETROU, S. Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, n. 11, p. 1849-1859, 2012.

ONDER, H.; COSKUN, A.; GOKSUNGUR, M. T. Recovery of visual scotomas by vortioxetine in a patient with symptomatic occipital lobe epilepsy. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 21, n. 1, p. 88, 2018.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; ARCINIEGA, M.; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular

docking: current advances and challenges. **TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 21, 2018.

QIAO, X. et al. Properties of human brain sodium channel  $\alpha$ -subunits expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 4, p. 1054-1067, 2014.

RINEY, K. et al. ILAE Classification and Definition of Epilepsy Syndromes with Onset at a Variable Age: Position Statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. 2021.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W.; RHO, J. M. Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, p. 1-28, 2016.

SCHMIDT, H.; KNÖSCHE, T. R. I. Action potential propagation and synchronisation in myelinated axons. **PLOS Computational Biology**, v. 15, p. 1-33, 2019.

SEXENA, S.; LI, S. Defeating epilepsy: A global public health commitment. **Epilepsia Open**, v. 2, p. 153-155, 2017.

SHEN, H. et al. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. **Science**, v. 355, n. 6328, 2017.

STEIGER, B. K.; JOKEIT, H. Why epilepsy challenges social life. **Seizure**, v. 44, p. 194-198, 2017.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein–ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.

WANG, Y.; CHEN, Z. An update for epilepsy research and antiepileptic drug development: Toward precise circuit therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 201, p. 77-93, 2019.

VERLI, H. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. 2014.

WELLOCK, C.; ROSS, B. J. An Examination of Lamarckian Genetic Algorithm. **Proceedings of Late Breaking Papers, Genetic and Evolutionary Computation Conference (GECCO)**, p. 474-481, 2001.

XIE, X. M.; GARTHWAITE, J. State-dependent inhibition of Na<sup>+</sup> currents by the neuroprotective agent 619C89 in rat hippocampal neurons and in a mammalian cell line expressing rat brain type IIA Na<sup>+</sup> channels. **Neuroscience**, v. 73, n. 4, p. 951-962, 1996.

XU, X. et al. Abnormal changes in voltage-gated sodium channels Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6 and in calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase II, within the brains of spontaneously epileptic rats and tremor rats. **Brain Research Bulletin**, v. 96, p. 1-9, 2013.